



HAL
open science

Caractérisation moléculaire du colorant traditionnel mésoaméricain extrait de la plante *Justicia spicigera*

Lucie Arberet

► **To cite this version:**

Lucie Arberet. Caractérisation moléculaire du colorant traditionnel mésoaméricain extrait de la plante *Justicia spicigera*. Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UP-ASF021 . tel-04507176

HAL Id: tel-04507176

<https://theses.hal.science/tel-04507176>

Submitted on 16 Mar 2024

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.

Caractérisation moléculaire du colorant traditionnel mésoaméricain extrait de la plante *Justicia spicigera*

*Molecular characterisation of the Mesoamerican traditional
dye extracted from the Justicia spicigera plant*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 571
Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et
biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie
Graduate School : Chimie. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche
Institut de Chimie Physique (Université Paris-Saclay, CNRS)
sous la direction de **Sylvie HÉRON**, maîtresse de conférences,
la co-direction de **Christine ANDRAUD**, professeuse,
le co-encadrement de **Anne MICHELIN**, maîtresse de conférences,
et le co-encadrement de **Witold NOWIK**, ingénieur de recherche.

Thèse soutenue à Paris, le 15 mars 2023, par

Lucie ARBERET

Composition du jury

Membres du jury avec voix délibérative

David TOUBOUL

Directeur de recherche, Université Paris-Saclay, ICSN UPR 2301

Émilie DESTANDAU

Professeuse, Université d'Orléans, ICOA UMR 7311

Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA

Professeuse, Université Claude Bernard Lyon 1, LEM UMR 5557

Patrick BRENAC

Docteur, Green'ing

Jana SANYOVA

Docteure, Institut Royal du Patrimoine Artistique Bruxelles

Président

Rapporteuse & Examinatrice

Rapporteuse & Examinatrice

Examineur

Examinatrice

Titre : Caractérisation moléculaire du colorant traditionnel mésoaméricain extrait de la plante *Justicia spicigera*.....

Mots clés : Matériaux du patrimoine, Colorant naturel, Élucidation structurale, Vieillesse artificielle, Chromatographie en phase liquide, Spectroscopies

Résumé : L'identification des colorants organiques naturels dans les matériaux du patrimoine est un défi analytique considérable, notamment dû à la complexité de leur composition chimique et à leur faible stabilité dans le temps. Si les méthodes chromatographiques couplées à des détecteurs d'absorption, de fluorescence ou de spectrométrie de masse sont particulièrement adaptées à l'analyse de ces mélanges complexes, leur utilisation pour l'analyse des objets du patrimoine est limitée par les possibilités de prélèvement de matière. L'identification est ainsi majoritairement réalisée par des techniques spectroscopiques non-invasives donnant accès à des signatures spectrales globales du matériau coloré analysé. Cette approche repose sur une connaissance préalable de la composition chimique des colorants susceptibles d'être rencontrés afin de relier les empreintes spectrales enregistrées aux composés présents dans les extraits naturels.

Ces travaux de thèse ont porté sur la caractérisation d'un colorant naturel employé dans le *Codex Borbonicus*, un manuscrit aztèque du 16^{ème} siècle. Celui-ci a été hypothétiquement identifié comme extrait des feuilles de *Justicia spicigera*, une plante tinctoriale originaire d'Amérique Centrale, par des techniques spectroscopiques non-invasives (spectroscopies Raman et d'émission de fluorescence) et la comparaison des signaux enregistrés pour les couches picturales du manuscrit avec des spectres publiés dans la littérature. Cependant, ce colorant a été très peu caractérisé et le manque de connaissances quant à sa composition chimique ne permet pas d'attester si les composés à l'origine de ces signaux lui sont spécifiques. Par ailleurs, ce colorant est traditionnellement employé dans le domaine de la teinture de textiles. Son identification dans un codex mésoaméricain est unique à ce jour et aucune source historique ne relate son mode de pré-

paration pour son utilisation en tant que peinture.

L'objectif du projet est d'enrichir les connaissances sur le colorant extrait des feuilles de *Justicia spicigera* via l'élucidation structurale des composés responsables de sa couleur et la caractérisation de reproductions de couches picturales, notamment vieilles artificiellement. Cela permettra notamment de valider l'identification faite dans le *Codex Borbonicus*.

Dans un premier temps, une méthode de purification par chromatographie préparative en phase liquide des principaux composés colorés de l'extrait de *Justicia spicigera* a été développée. Le caractère ionisable de ces molécules cibles a permis d'envisager une séparation bidimensionnelle hors-ligne sur une même phase stationnaire et basée sur un changement de pH de la phase mobile; l'orthogonalité entre les dimensions a été quantitativement évaluée. Puis, une approche multi techniques impliquant la spectrométrie de masse à haute-résolution, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire, des spectroscopies vibrationnelles (absorption infrarouge et Raman) et électroniques (absorption et fluorescence dans l'ultraviolet et le visible) a été mise en œuvre afin de proposer une structure moléculaire des composés purifiés. D'autre part, des couches picturales modèles ont été réalisées à partir du colorant extrait de *Justicia spicigera* et ont ensuite été soumises à un vieillissement accéléré à la lumière, afin de mettre en évidence d'éventuelles limites d'identification du colorant selon son mode de préparation ou son état de dégradation. L'ensemble des caractérisations moléculaires et spectrales réalisées dans ce travail constitue un socle de connaissances solides pour l'identification du colorant extrait de *Justicia spicigera* dans les objets du patrimoine culturel mésoaméricain.

Title : Molecular characterisation of the Mesoamerican traditional dye extracted from the *Justicia spicigera* plant.....

Keywords : Cultural heritage materials, Natural dye, Structural elucidation, Artificial ageing, Liquid chromatography, Spectroscopies

Abstract : Due to their complex composition and their instability over time, the identification of organic natural dyes in historical artefacts is a challenging task. Chromatographic methods hyphenated to UV-Vis absorption, fluorescence detection or mass spectrometry are particularly adapted for the characterisation of complex natural products; however, these techniques face limitations in their application in the cultural heritage field due to the sampling possibilities. The identification relies thus mainly on the use of non-invasive spectroscopic techniques giving global spectral fingerprint of the studied coloured material. This approach requires a preliminary in-depth knowledge of the chemical composition of the dyes to link the recorded spectral features to compounds from the natural extracts.

This work focused on the characterisation of a natural dye used in the *Codex Borbonicus*, a 16th century Aztec manuscript. The dye extracted from *Justicia spicigera* leaves, a tinctorial plant from Central America, was tentatively identified in the paint layers of the manuscript by comparison of the recorded Raman and UV-Vis fluorescence emission signals with published data. However, this dye is poorly characterised and the lack of knowledge about its chemical composition make it impossible to ensure that the compounds responsible for the spectral features are specific to this plant species. Besides, to the author's knowledge, this is the unique identification of the use of this traditional textile dyestuff in a Mesoamerican codex and no historical sources describe its preparation

to produce paint layers.

The main objective of the project is to broaden the knowledge regarding the natural dye from the *Justicia spicigera* leaves through the structural elucidation of the compounds responsible for its colour and the characterisation of paint layers mock-ups, some of them being artificially aged. In particular, this will allow to confirm its identification in the *Codex Borbonicus*.

First, a preparative liquid chromatographic method was developed for the purification of the main coloured compounds from the *Justicia spicigera* extract. The ionisability of these target compounds enabled the optimisation of an off-line bi-dimensional separation with the same stationary phase and based on a pH change of the mobile phase; the orthogonality between the dimensions was quantitatively evaluated. Then, a multi techniques approach involving high-resolution mass spectrometry, nuclear magnetic resonance, vibrational (infrared absorption and Raman) and electronic (ultraviolet-visible absorption and fluorescence) spectroscopies was carried out to propose a molecular structure of the purified compounds. In addition, model paint layers were produced from *Justicia spicigera* leaves and were artificially aged under light exposition to evaluate whether the protocol for the preparation or the degradation state of the dye could prevent its identification.

The molecular and spectral characterisations gathered in this work provide a solid base of knowledge for the identification of the *Justicia spicigera* dye in other Mesoamerican artefacts.

Remerciements

Merci à Émilie Destandau et Marie-Geneviève Dijoux-Franca d'avoir accepté de rapporter mon travail, ainsi qu'à Patrick Brenac, Jana Sanyova et David Touboul de l'avoir examiné.

Merci au DIM Matériaux Anciens et Patrimoniaux d'avoir financé mon contrat doctoral.

Merci à mes directrices de thèse, Sylvie Héron et Christine Andraud, ainsi qu'à mes encadrant-es, Anne Michelin et Witold Nowik de m'avoir permis d'en arriver là. Tout d'abord, merci de la conviction que vous avez eu de porter ce projet, me permettant de continuer mon travail de stage de M2 en thèse. Merci de la confiance et de l'entière liberté que vous m'avez accordées dans la réalisation de cette thèse, tout en étant d'un soutien sans faille à chaque épreuve. Il est indéniable que que j'ai beaucoup appris à vos côtés. J'ai énormément apprécié travailler avec vous... et j'espère bien que ce n'est pas la fin !

Merci à Alain Tchapla pour les conseils aiguisés en chromatographie et les encouragements au quotidien.

Merci à Ludovic Bellot-Gurlet et Nathalie Delaunay de m'avoir accompagnée pendant ces 3 années dans le cadre de mes comités de suivi de thèse.

Merci à Fabien Pottier d'avoir identifié *Justicia spicigera* dans le *Codex Borbonicus*, sans quoi je ne serai pas en train d'écrire ces lignes. Merci d'avoir été à l'initiative du sujet de mon stage de M2, m'amenant à pousser pour la première fois les portes du monde merveilleux du CRC.

Merci à Christophe Joulin du Jardin Botanique Val Rahmeh de Menton de m'avoir fourni, tout au long du projet, en feuilles fraîches de *Justicia spicigera*, matière première indispensable à la réalisation de mon travail, et ce, malgré les aléas de la poste.

Merci à Alain Blond du plateau technique de RMN du Muséum d'avoir analysé mes échantillons et réfléchi à mes côtés à la structure de mes composés, sans compter ses heures.

Merci à Kaouther Ben Arfa de m'avoir aidé à développer le couplage LC-MS et d'avoir passé de nombreuses heures avec moi devant l'appareil.

Merci à Estelle Loire de m'avoir permis de réaliser des expériences en FTICR avec elle.

Merci à Raphaël Gourronc et Éline Jourdan d'avoir été mes cobayes d'encadrement de stage. Merci pour les nombreux échantillons préparés et les analyses associées. Vos contributions ont été indispensables à mon travail.

Merci à Lea-Maria Ibele d'avoir accepté de réaliser des simulations de spectres à partir de mes propositions de molécules et d'avoir ainsi montré le potentiel prometteur de cette approche.

Merci à Ayoub, mon binôme de thèse à l'ICP, pour avoir partagé le même chemin (de recherche ... et de RER!) durant ces 3 années. Merci à Anouchka et Florent, d'en bas dans la vallée, pour nos petites réunions à 4 à disserter sur notre sort de doctorant·es ou à se retrouver enfermer au milieu de squelettes.

Merci aux fabuleux et fabuleuses doctorant·es du CRCC : à ceux de ma génération, Baptiste, Clara et Violaine, pour avoir surmonté les mêmes épreuves quasi en même temps; à ceux de la génération précédente, Anne-Cécile et Nathan, pour nous avoir montré la voie, et aux plus jeunes, Caroline, Clément, Emma, Gauthier, Giulia, Minjung et Pierre pour la bonne ambiance.

Merci à Marie-Claude, Marine, Myriam, Ninette, Taous, Terkia à l'ICP. J'ai mangé beaucoup de gâteaux avec vous (plus ou moins expérimentaux!) : kâak el warka, knafeh, sfouf, et bien d'autres, vont me manquer. Merci à Alice, Anne-Laurence, Aurélie, Céline, Laurianne, Maëlle, Marie, Marie-Angélique, Oulfa, Sabrina, Sophie, Stéphanie, Sylvie, et cie au CRCC. Les sucreries et la bonne humeur n'ont pas manqué dans ce labo là non plus! Et j'oublie certainement du monde, alors, je remercie plus généralement toutes les personnes que j'ai côtoyées au sein du CRC et de l'ICP pour leur sympathie qui ont fait de ces années de thèse une expérience très agréable.

Merci aux nombreux et nombreuses habitant·es, humain·es ou poules, du 26 avenue de Chateaubriand qui ont su égayer ma première année de thèse, ponctuée par les confinements à répétition, et nos deux années et demi de vie commune : Aude-Émeline, Delphine, Godelive, Léo, Louise, Marie-Fiona, Mathias, Sergio. Merci aux deux François de m'avoir cueillie au début de ma rédaction pour que je me fasse mon nouveau nid, et d'avoir su me verser des verres de vin aux moments opportuns pour que l'inspiration ne tarisse pas.

Même si peu de choses les relient directement à la réalisation de ce travail, merci à mes proches, ma famille et mes ami·es, d'avoir suivi mes aventures pendant ces années.

Pas merci au RER B ...

À la mémoire de Samuel
1999 - 2022

Table des matières

Liste des abréviations et symboles	xiii
Introduction	1
Chapitre 1 Contexte et état de l'art	5
1 Les colorants organiques naturels	7
1.1 Définition	7
1.2 Structures moléculaires et absorption	9
1.3 Familles de molécules colorées naturelles	12
2 Identification des colorants naturels dans les objets historiques	22
2.1 Approche	22
2.2 Étude de cas : Les colorants dans le <i>Codex Borbonicus</i>	24
3 <i>Justicia spicigera</i> Schltdl.	29
3.1 Présentation	29
3.2 Usages et propriétés	33
3.3 Caractérisation physicochimique	39
3.4 Les autres espèces <i>Justicia</i> colorantes	46
4 Bilan du chapitre	49
Chapitre 2 Techniques analytiques : principes et équipements	51
1 Principes théoriques	53
1.1 Techniques séparatives	54
1.2 Techniques de caractérisation	62
2 Matériel et méthodes	75
2.1 Matériel	75
2.2 Préparations des échantillons	77
2.3 Chromatographie liquide à haute performance	79
2.4 Spectrométrie de masse	83
2.5 Spectroscopies d'absorption et de fluorescence UV-Vis	85
2.6 Spectroscopies vibrationnelles	87
2.7 Spectroscopie RMN	87

2.8	Vieillisements artificiels à la lumière	88
2.9	Photographies sous UV	88
Chapitre 3 Étude de l'extrait de <i>Justicia spicigera</i>		89
1	Extraction du colorant	91
2	Caractérisation de l'extrait aqueux	95
2.1	Absorption et émission de fluorescence UV-Vis	95
2.2	Diffusion Raman	100
2.3	Composition de l'extrait	101
3	Suivi de l'évolution de l'extrait aqueux	107
3.1	Influence sur l'absorption et la fluorescence de l'extrait	108
3.2	Influence sur le signal Raman	110
3.3	Influence sur la composition moléculaire	111
3.4	Évolution de l'extrait déposé sur papier	114
4	Préparation du colorant pour une application en peinture	117
4.1	Élaboration d'un colorant en poudre	117
4.2	Préparation de couches picturales	121
5	Vieillessement artificiel à la lumière	128
5.1	Vieillessement des dépôts d'extrait aqueux	129
5.2	Vieillessement des couches picturales	132
6	Bilan du chapitre	139
Chapitre 4 Purification des molécules colorées		143
1	Principe et stratégie de développement	145
2	Développement et optimisation en chromatographie analytique	146
2.1	Mise en place des systèmes séparatifs	147
2.2	Séparation monodimensionnelle	150
2.3	Séparation bidimensionnelle hors-ligne	154
2.4	Paramètres retenus à l'échelle analytique	173
2.5	Vérification des performances de la méthode développée	173
3	Transfert vers la chromatographie préparative	175
3.1	Théorie du transfert en mode gradient	175
3.2	Paramètres retenus à l'échelle préparative	180
3.3	Purification des composés colorés d'intérêt	180
3.4	Contrôle de la pureté des composés isolés	183
4	Bilan du chapitre	184

Chapitre 5	Caractérisation des molécules purifiées	187
1	Démarche	189
2	Élucidation structurale	190
2.1	Composé X2	190
2.2	Composé X1	199
2.3	Bilan intermédiaire : structure des molécules isolées	205
3	Synthèse des caractéristiques spectrales des composés X1 et X2 purifiés	206
3.1	Absorption et émission de fluorescence UV-Vis	206
3.2	Diffusion Raman	218
3.3	Absorption infrarouge	221
4	Comparaison avec les signaux de l'extrait total	227
4.1	Absorption et émission de fluorescence UV-Vis	227
4.2	Diffusion Raman	230
5	Bilan du chapitre	233
	Conclusion et perspectives	237
	Bibliographie	243
	Annexes	265

Liste des abréviations et symboles

ϵ	Porosité de la colonne
φ_m	Phase mobile
φ_s	Phase stationnaire
α	Sélectivité
δ	Largeur du pic à mi-hauteur
ΔE_{ab}^* ou $\Delta E(76)$	Distance chromatique définie par la CIE
δ	Mode de vibration de déformation de pliage (<i>bending</i>)
δ_C ou $\delta^{13}C$	Déplacement chimique des carbones ^{13}C (ppm)
δ_H ou δ^1H	Déplacement chimique des protons 1H (ppm)
λ_{em}	Longueur d'onde d'émission
λ_{ex}	Longueur d'onde d'excitation
λ_{max}	Longueur d'onde associée à un maximum (d'absorption, d'émission)
μT	Micro-spectroscopie infrarouge en transmission
v	Vitesse linéaire réduite de la phase mobile
ν	Mode de vibration d'élongation (<i>stretching</i>)
1D	Monodimensionnel(le)
2D	Bidimensionnel(le)
1D	Première dimension
2D	Seconde dimension
A	Moyenne arithmétique
A1	Justiciamide (4-hydroxy-N-(2-hydroxy-4,5-diméthoxyphényl)-L-glutamine)

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

- A2 Acide 4-amino-3-hydroxy-N-(2-hydroxy-4,5-diméthoxyphényl)-4-oxobutanoïque
- ATR Réflexion totale atténuée (*Attenuated total reflection*)
- BV plus Basse orbitale Vacante (en anglais, LUMO pour *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*)
- C18 Greffage octadécyl
- CCM Chromatographie sur couche mince
- CD₃OD Méthanol deutéré
- CE Énergie de collision (*Collision energy*)
- CIE Commission Internationale de l'Éclairage
- COSY (*COrelated SpectroscopY*)
- D Débit de la phase mobile (mL/min)
- d_c Diamètre interne de la colonne
- d_i Distance entre les coordonnées des plus proches voisins
- d_p Diamètre des particules de la phase stationnaire (μm)
- DMSO Diméthylsulfoxyde
- DMSO-d₆ DMSO deutéré
- DRX Diffraction des rayons X
- EI Impact électronique
- ESI Ionisation électrospray
- ESI⁺ Ionisation électrospray positive
- ESI⁻ Ionisation électrospray négative
- F1 Kaempférol 3-arabinose-7-rhamnose?
- F2 Kampféritrine (kaempférol-3,7-dirhamnose)
- F3 Kaempférol-3-(3'-acétyl-rhamnose)-7-rhamnose
- FLD Détecteur de fluorescence (*FLuorescence Detector*)
- FORS Spectroscopie de réflexion diffuse par fibres optiques
- FT à transformée de Fourier (*Fourier transform*)

GT	Guatemala
H	Moyenne harmonique
h	Hauteur de plateau réduite
HCOOH	Acide formique
HCOONH ₄	Formiate d'ammonium
HEPT	Hauteur équivalente à un plateau théorique
HILIC	Chromatographie d'interaction hydrophyle (<i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i>)
HMBC	(<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>)
HO	plus Haute orbitale Occupée (en anglais, HOMO pour <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>)
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HR	Haute résolution, (spectrométrie de masse à) (<i>High-resolution (mass spectrometry)</i>)
HSQC	Corrélation hétéronucléaire à simple quantum (<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>)
ICR	Résonance cyclotronique ionique (<i>Ion cyclonic resonance</i>)
IR	Infrarouge
k	Facteur de rétention
L	Longueur de la colonne
LC	Chromatographie en phase liquide (<i>Liquid chromatography</i>)
LR	Basse résolution, (spectrométrie de masse à) (<i>Low-resolution (mass spectrometry)</i>)
MeCN	Acétonitrile
MeOH	Méthanol
MFT	Micro-décolorimétrie (<i>Microfading test</i>)
MS-MS ou MS ²	Spectrométrie de masse en tandem
MX	Mexique

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

N	Nombre de plateaux théoriques
NND	Distance entre voisins les plus proches voisins (<i>Nearest Neighbour Distance</i>)
NOESY	(<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
NPLC	Chromatographie à polarité de phases normale (<i>Normal phase liquid chromatography</i>)
prep-LC	Chromatographie préparative en phase liquide (<i>Preparative liquid chromatography</i>)
QqQ	Triple quadripôle
R_s	Résolution
RMN	Résonance magnétique nucléaire (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
ROESY	(<i>Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
RPLC	Chromatographie à polarité de phases inversée (<i>Reverse ou Reversed phase liquid chromatography</i>)
RVB	Rouge Vert Bleu
S_{eff}	Section efficace
SC-DRX	Diffraction des rayons X sur mono-cristal (<i>Single-crystal X-ray diffraction</i>)
t_0	Temps mort de la colonne (mL)
t_D	Temps de délai (<i>Dwell time</i>) (min)
t_{grad}	Temps de gradient
t_{palier}	Temps du palier isocratique avant le début du gradient (min)
t_R	Temps de rétention
THF	Tétrahydrofurane
u	Vitesse linéaire de la phase mobile
u.a.	Unité(s) arbitraire(s)
UHPLC	Chromatographie en phase liquide à ultra haute performance (<i>Ultra high performance liquide chromatography</i>)
UV-Vis	Ultraviolet et visible
V_0	Volume mort de la colonne (mL)

- V_D Volume de délai (*Dwell volume*) (mL)
- X1 Composé coloré inconnu 1
- X2 Composé coloré inconnu 2
- XRF Spectroscopie de fluorescence des rayons X

Introduction

Les colorants naturels sont fréquemment rencontrés dans les objets du patrimoine culturel : textiles, peintures sur chevalet, polychromies, manuscrits (enluminures et encres d'écriture), dessins, décorations sur bois, sur cuir ...

Leur caractérisation physico-chimique contribue, comme celle de tout autre matériau constitutif, à enrichir les connaissances sur les objets patrimoniaux ou les œuvres d'art parvenus jusqu'à nous, et ce, conjointement aux approches historiques, archéologiques, etc. Elle permet d'accéder à de précieux renseignements sur les matériaux à disposition et les technologies maîtrisées par les artistes ou artisans pour la fabrication des objets. Il est ainsi parfois possible de remonter à la compréhension de l'organisation des ateliers, des réseaux commerciaux et plus largement des sociétés à une période historique donnée. Certains matériaux artistiques peuvent également servir de marqueurs chronologiques et géographiques pour aider à la datation ou à la localisation de la provenance. Par ailleurs, l'identification des matériaux constitutifs est cruciale pour envisager des approches appropriées pour la conservation et la restauration des objets.

L'analyse physico-chimique des matériaux du patrimoine rencontre des contraintes liées à la valeur culturelle, artistique, historique ou culturelle des objets étudiés. Pour conserver leur intégrité, il n'est souvent pas possible de réaliser de prélèvement de matière et lorsque cela est toutefois permis, les échantillons sont souvent obtenus en très petite quantité. L'utilisation des méthodes séparatives (chromatographies, électrophorèse) est ainsi limitée. De plus, les objets sont souvent immobilisés dans des musées, réserves, bibliothèques, chambres fortes, et les analyses doivent, dans la mesure du possible, être réalisées *in situ*. Des instruments portables, ou a minima transportables, permettant des mesures directes, non-invasives et sans contact sont alors utilisés. Ce sont principalement des méthodes spectroscopiques donnant accès à la signature spectrale globale du matériau analysé.

Cependant, les colorants organiques naturels sont des mélanges moléculaires complexes et c'est bien souvent l'identification, voire la quantification, des différents constituants moléculaires du mélange qui permet de déterminer la source biologique de la

matière colorante. Cela n'étant pas permis par les techniques spectrales non-invasives, l'identification des colorants dans les matériaux du patrimoine reste un défi analytique considérable. Les approches développées reposent alors notamment sur la recherche de signatures spectrales spécifiques à chaque source biologique colorante. Pour ce faire, il est nécessaire d'avoir une connaissance préalable de la composition chimique des colorants susceptibles d'être rencontrés afin de relier les signatures spectrales enregistrées aux composés présents dans les extraits naturels.

Le cas d'étude de la caractérisation physico-chimique des matières colorantes du manuscrit aztèque du 16^{ème} siècle, le *Codex Borbonicus*, menée au Centre de Recherche sur la Conservation entre 2013 et 2016ⁱ, permet d'illustrer la nécessité de cette méthodologie.

En effet, dans ce contexte, l'utilisation d'un colorant naturel, hypothétiquement identifié comme extrait des feuilles de *Justicia spicigera* - une plante tinctoriale d'Amérique Centrale - a été mise en évidence pour l'obtention de peintures brunes. Des spectres Raman et d'émission de fluorescence, caractéristiques de ces couches picturales ont été obtenus *in situ* sur le manuscrit. Leur comparaison avec des spectres publiés dans la littérature pour des colorants couramment employés dans le monde pré-hispanique a permis de remonter à la source végétale du colorant. Cependant, ce colorant a été très peu caractérisé et le manque de connaissances quant à sa composition chimique ne permet pas d'attester si les composés à l'origine de ces signatures spectrales lui sont spécifiques. Par ailleurs, son identification dans un codex mésoaméricain est, à notre connaissance, unique à ce jour et aucune source historique ne relate son mode de préparation pour son utilisation en tant que peinture. Tout ceci a motivé l'analyse approfondie en laboratoire de l'extrait de *Justicia spicigera*, faisant l'objet de la présente thèse.

L'objectif est ainsi de valider l'identification de *Justicia spicigera* faite par les techniques non-invasives dans le *Codex Borbonicus* et de permettre sa détection non ambiguë dans d'autres objets du patrimoine mésoaméricain. Cela passe notamment par la caractérisation structurale des molécules colorées et responsables des signaux spectraux afin de pouvoir évaluer leur spécificité à l'espèce végétale considérée. Il s'agira également d'étudier la stabilité de ces signaux selon le mode de préparation du colorant ou son état de dégradation.

i. Dans le cadre de la thèse de Fabien Pottier [Pottier, 2017]

Ces questions ont été abordées dans le présent travail de thèse à travers plusieurs axes méthodologiques, qui seront traités dans les différents chapitres expérimentaux de ce mémoire (Figure 1). Il est divisé en cinq chapitres :

Le **Chapitre 1** est consacré à des connaissances bibliographiques notamment sur la description des colorants naturels organiques et à la stratégie analytique pour leur identification dans les matériaux du patrimoine. Les résultats obtenus dans le cas de l'analyse des matières colorantes du *Codex Borbonicus* y sont présentés. Pour clore ce chapitre, l'état des connaissances actuelles sur la plante *Justicia spicigera*, source du colorant au cœur de notre étude est décrit.

Le **Chapitre 2** détaille la méthodologie et les techniques analytiques mises en œuvre dans ce travail pour la caractérisation spectrale et moléculaire de l'extrait coloré de *Justicia spicigera* et de couches picturales produites à partir de ce colorant.

Les résultats expérimentaux obtenus sont présentés à partir du **Chapitre 3**. Ce dernier décrit les propriétés de l'extrait coloré obtenu à partir des feuilles de *Justicia spicigera*. Les signatures spectrales de l'extrait, en solution ou préparé sous forme de couches picturales (vieillies artificiellement ou non), sont analysées. Une étude préliminaire de la composition moléculaire de l'extrait permet de repérer les composés colorés majoritaires.

Le **Chapitre 4** se concentre sur le développement d'une méthode pour la purification des deux composés colorés principaux de l'extrait de *Justicia spicigera* par chromatographie préparative en phase liquide.

Le **Chapitre 5** présente l'approche multitechnique menée pour l'élucidation structurale des molécules colorées purifiées. Leur contribution à la signature spectrale de l'extrait coloré est, pour finir, évaluée.

L'ensemble des caractérisations moléculaires et spectrales réalisées dans ce travail constitue un socle de connaissances solides pour l'identification du colorant extrait de *Justicia spicigera* dans les objets du patrimoine culturel mésoaméricain.

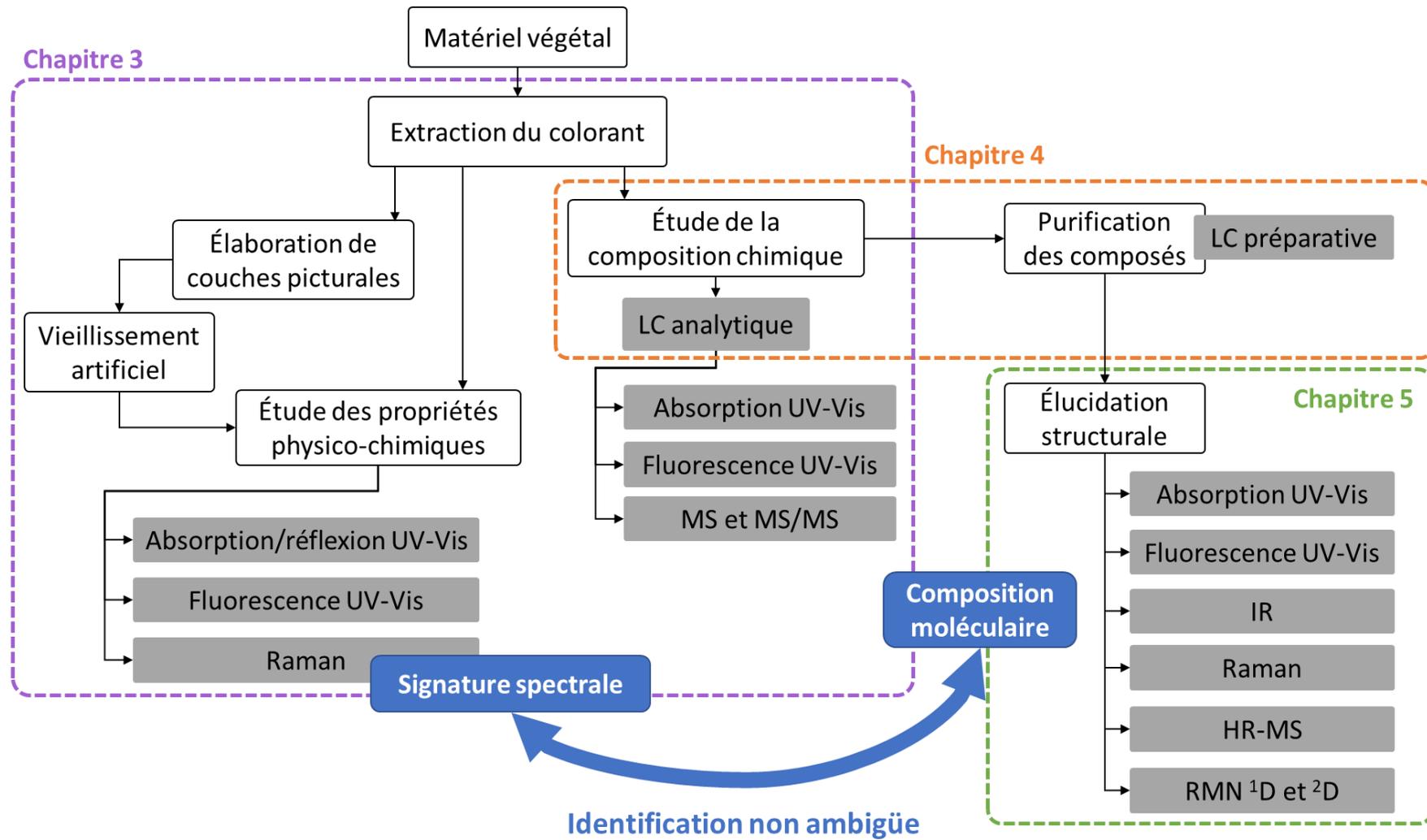


Figure 1 - Schéma de la démarche globale menée dans le travail de thèse

Chapitre 1

Contexte et état de l'art

Ce chapitre s'ouvre sur la description des colorants organiques naturels. Des éléments de théorie sur la structure de ce type de composés ainsi qu'un aperçu des principales classes de molécules rencontrées y sont présentés.

Les enjeux et la démarche analytique déployée pour leur identification dans les matériaux du patrimoine sont ensuite abordés et illustrés par le cas d'étude qui a initié ce travail de thèse, à savoir, la caractérisation des matières colorantes du *Codex Borbonicus*, manuscrit aztèque du 16^{ème} siècle.

Enfin, un bilan des connaissances actuelles sur la plante *Justicia spicigera*, source du colorant mésoaméricain rencontré dans ledit manuscrit et sur lequel a porté notre étude approfondie, est dressé.

Sommaire

1	Les colorants organiques naturels	7
1.1	Définition	7
1.2	Structures moléculaires et absorption	9
1.3	Familles de molécules colorées naturelles	12
1.3.1	Caroténoïdes	12
1.3.2	Curcuminoïdes	12
1.3.3	Alcaloïdes	13
1.3.4	Quinoïdes	14
1.3.5	Xanthonoïdes	15
1.3.6	Coumarines	15
1.3.7	Flavonoïdes	15
1.3.8	Tannins	18
1.3.9	Exemples de molécules et des sources naturelles associées	19
2	Identification des colorants naturels dans les objets historiques	22
2.1	Approche	22
2.2	Étude de cas : Les colorants dans le <i>Codex Borbonicus</i>	24
3	<i>Justicia spicigera</i> Schldl.	29
3.1	Présentation	29
3.1.1	Taxonomie, appellations botaniques et vernaculaires	29
3.1.2	Description	31
3.1.3	Distribution actuelle et habitat	31
3.2	Usages et propriétés	33
3.2.1	Données historiques	33
3.2.2	Médecine	33
3.2.3	Teinture	34
3.2.4	Autres applications	38
3.3	Caractérisation physicochimique	39
3.3.1	Premières observations générales	39
3.3.2	Études phytochimiques	42
3.4	Les autres espèces <i>Justicia</i> colorantes	46
4	Bilan du chapitre	49

1 Les colorants organiques naturels

1.1 Définition

Les couleurs qui nous entourent, lorsque leur origine est chimiqueⁱ, sont données par des matières colorantes, naturelles ou synthétiques : les **pigments** et les **colorants**. Ces composés possèdent la capacité d'absorber sélectivement les rayonnements lumineux dans le domaine du visible (380 à 780 nm). Nous les retrouvons dans les peintures, textiles, plastiques, encres, cosmétiques, produits alimentaires, etc.

La distinction entre les termes « pigment » et « colorant » fait l'objet de divergences dans les définitions rencontrées selon les domaines d'application.

Dans certains cas, les deux termes sont employés de façon générique et interchangeable au même titre que « matière colorante ». Par exemple, le Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales du CNRS [noa, a] donne les définitions générales suivantes : pigment, « toute substance colorée quelle qu'en soit l'origine, la structure et la nature » et colorant, « substance généralement colorée, capable de se fixer sur un support et de lui communiquer une coloration durable ».

En biologie, le terme pigment est utilisé pour décrire toute substance synthétisée par un organisme vivant (animal, végétal ou fongique) contribuant à la coloration de ses cellules. Diverses structures biologiques contiennent des pigments : la peau, les yeux, les cheveux, le sang, etc. Dans les organismes vivants, la couleur pigmentaire s'oppose ainsi à la couleur structurelle (ou structurale).

En chimie, la principale différence entre pigment et colorant, donnée par la norme DIN 55944 [noa, 2011], réside dans leur **solubilité** : un pigment est une substance colorée insoluble dans le milieu où il est dispersé, alors qu'un colorant est soluble dans le milieu qu'il colore. C'est sur ces définitions que nous nous baserons pour l'emploi des deux termes dans le cadre du présent document.

Les pigments sont essentiellement des composés inorganiques. Ils sont couramment employés en peinture, où ils sont fixés à la surface de l'objet. Se présentant sous forme de poudre insoluble, pour les appliquer sur un support, il est nécessaire de les disperser au préalable dans un liant (huile, résines acrylique ou vinyliques, gomme arabique ...). La couleur obtenue n'est que peu affectée par le milieu dans lequel ils sont dispersés.

Quant aux colorants, ce sont principalement des composés organiques. Ils sont utilisés en solution (souvent aqueuse) et la couleur qu'ils confèrent peut être affectée.

i. En opposition, à la couleur structurelle (ou structurale), physique.

tée par la nature physicochimique du solvant (par exemple, son pH) et du support sur lequel ils sont appliqués. On retrouve leur utilisation fréquemment en teinture (de textiles, papiers, cuirs, ou autres substrats); leur solubilité dans le bain de teinture permet leur fixation sur les fibres lors de leur immersion. Ils sont absorbés par le support et s'unissent chimiquement aux entités qu'ils colorent. Un mordant, souvent des sels métalliques, peut être ajouté pour améliorer la fixation du colorant aux fibres en créant un pont chimique entre les deux.

Il faut noter que certains composés colorés peuvent jouer le rôle de colorant ou de pigment selon la façon dont ils sont utilisés. En effet, pour des facilités de stockage et d'application en couches picturales, les colorants organiques peuvent être fixés sur une poudre minérale pour les rendre insolubles et obtenir ainsi un pigment, dit « pigment laqué ». La laque de garance ou la laque de cochenille sont les exemples les plus connus de ce type de pigments.

On distingue les colorants naturels, extraits de **sources naturelles végétales, animales ou fongiques**, des colorants synthétiques, issues de la chimie moderne.

Les molécules colorées organiques sont abondantes dans les règnes végétal et animal. Dans les plantes, ce sont des métabolites secondaires, c'est-à-dire des composés remplissant des fonctions non essentielles pour la survie. On peut les trouver dans les fleurs, les feuilles, les fruits, les racines, les tiges, l'écorce ou encore le bois. Chez les animaux (insectes, mollusques), on les rencontre dans les glandes, sucs ou œufs.

On peut distinguer les cas où les molécules se trouvent directement à l'état coloré dans les organismes (par exemple, dans les pétales des fleurs) et ceux où le procédé d'extraction permet la transformation par hydrolyse, oxydation, condensation, etc. de précurseurs incolores en la matière colorée d'intérêt.

Les colorants organiques naturels couvrent une large gamme de couleurs. On peut citer des exemples connus de colorants naturels tels que la garance dont on extrait un colorant rouge, la gaude pour les jaunes ou l'indigo pour les bleus.

Les colorants naturels sont des **mélanges complexes** de molécules organiques; toutes ne contribuent notamment pas directement à la coloration de l'extrait. Par ailleurs, certaines molécules colorées sont très répandues et ainsi très peu spécifiques d'une source biologique. La détermination de l'origine d'un colorant naturel repose alors souvent sur l'identification, voire la quantification, des différents constituants moléculaires du mélange.

Pour finir, on notera que le terme « colorant » décrit aussi bien la molécule de colorant que le produit colorant, extrait de la source naturelle. Ainsi, par exemple, on extrait

de la cochenille un colorant rouge - le mélange coloré - dont le colorant principal est l'acide carminique - la molécule colorée.

1.2 Structures moléculaires et absorption

La couleur des molécules organiques colorées dépend grandement de leur structure [Dieval et Fafet, 2021].

Selon la théorie de Witt (1876), la coloration des molécules organiques résulte de la présence de groupes insaturés, les **chromophores** (du grec, « porte couleur ») et de groupes ionisables, les **auxochromes**, n'étant pas directement à l'origine de la couleur, mais ayant la faculté d'intensifierⁱⁱ ou de changer la couleur d'un chromophoreⁱⁱⁱ.

Les chromophores contribuent à la formation de doubles liaisons conjuguées permettant une délocalisation électronique dans les structures moléculaires. Les principaux groupes chromophores sont les suivants : C=C, C=O, C=S, C=N, N=N, N=O, NO₂ [Merlin, 2002, Dieval et Fafet, 2021].

Les auxochromes sont des groupements ionisables fixés sur un groupe chromophore, jouant le rôle de donneur ou d'accepteur d'électrons. On rencontre des auxochromes acides (OH, SO₃H, COOH), basiques (NH₂, NO₂, N(CH₃)₂) ou halogénés (Cl, Br, I) [Dieval et Fafet, 2021].

Pour réussir à expliquer plus finement l'absorption des molécules organiques complexes, possédant simultanément plusieurs chromophores et auxochromes, il est nécessaire de se tourner vers la théorie des **orbitales moléculaires**.

Les orbitales moléculaires sont des combinaisons linéaires d'orbitales atomiques permettant de représenter la mise en commun d'un doublet électronique lors de la formation d'une liaison. Les électrons responsables de la formation des liaisons simples sont placés dans des orbitales σ , qui se situent sur l'axe reliant deux atomes. Les électrons formant les liaisons doubles se trouvent dans des orbitales π , occupant l'espace au-dessus et au-dessous de l'axe interatomique. Aux orbitales σ et π sont associées des orbitales d'énergie supérieure, σ^* et π^* , dites antiliantes; elles sont vides quand la molécule est à son niveau fondamental. Les électrons non engagés dans des liaisons remplissent des orbitales moléculaires non liantes, n . À chaque orbitale moléculaire correspond un niveau d'énergie et en règle générale, pour les molécules non conjuguées, on les retrouve dans l'ordre d'énergie croissant suivant : $\sigma < \pi < n < \pi^* < \sigma^*$ [Merlin, 2002].

ii. Effet hyperchrome.

iii. Effet bathochrome, pour un décalage vers les longueurs d'onde supérieures.

L'absorption de la lumière résulte de transitions électroniques entre un état fondamental et un état excité de la molécule. Ces transitions électroniques ont lieu entre des orbitales moléculaires liantes (σ et π) et non liantes (n), remplies, vers des orbitales moléculaires antiliantes, non remplies (σ^* et π^*) (Figure 1.1). Plus la différence d'énergie entre les orbitales impliquées dans la transition électronique est petite, plus la longueur d'onde d'absorption est grande.

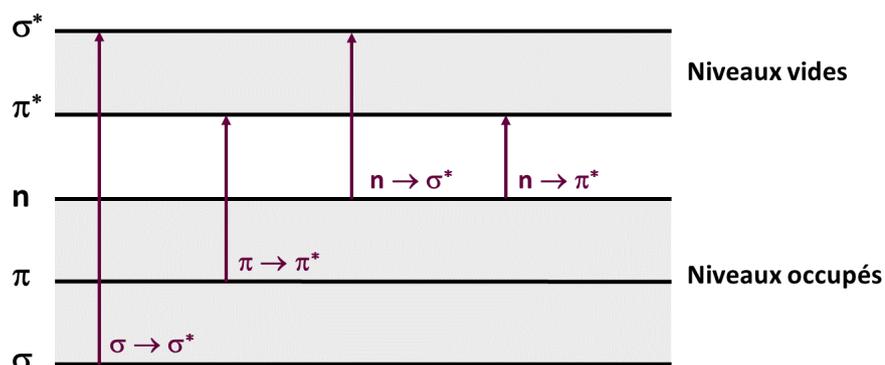


Figure 1.1 – Principales transitions électroniques.

Pour une molécule organique, plusieurs transitions peuvent se produire. La transition de plus basse énergie correspond au passage d'un électron de la plus haute orbitale occupée (HO) à la plus basse orbitale vacante (BV). Elle dépend de la structure de la molécule et il s'agit de la transition :

- $\sigma \rightarrow \sigma^*$ pour les composés ne comprenant que des liaisons simples (hydrocarbures saturés),
- $n \rightarrow \sigma^*$ pour les composés saturés comportant des atomes avec des paires d'électrons non liants (O, N, S, X) (alcools, amines, dérivés halogénés),
- $\pi \rightarrow \pi^*$ pour les composés avec des groupements fonctionnels insaturés (alcènes, alcynes, aromatiques),
- $n \rightarrow \pi^*$ pour les composés insaturés avec des atomes porteurs de doublets électroniques (aldéhydes, cétones, etc.).

Ainsi, les alcanes, ne comportant que des niveaux σ et σ^* , ont des absorptions dans l'UV lointain ($\lambda < 190$ nm). Les molécules saturées avec hétéroatome, présentent des transitions $n \rightarrow \sigma^*$ à plus basse énergie mais toujours en dehors du proche UV (λ dans la région 150-250 nm). Les alcènes ont des absorptions à la limite du proche UV (λ vers 180-220 nm, selon leur substitution). Les dérivés carbonyles ont quant à eux une bande $n \rightarrow \pi^*$ dans le proche UV (205 à 230 nm pour les esters, acides, anhydrides et 270 à 300 nm pour les aldéhydes et cétones).

Dans le cas de doubles liaisons conjuguées, la délocalisation des électrons π le long de la chaîne carbonée modifie les énergies des niveaux électroniques π et π^* . L'écart énergétique entre les orbitales HO et BV est réduit et la longueur d'onde d'absorption correspondante est augmentée.

Par exemple, les bandes d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ des hydrocarbures linéaires conjugués avec un nombre de liaisons conjuguées croissantes sont les suivantes : λ_{\max} (éthylène) = 165 nm < λ_{\max} (butadiène) = 214 nm < λ_{\max} (hexatriène) = 253 nm [Fleming et Williams, 2019]. En général, une absorption dans le visible est constatée à partir de sept doubles liaisons conjuguées.

De la même façon, pour les hydrocarbures aromatiques, l'extension de la conjugaison décale l'absorption dans la gamme du visible : le naphthalène et l'anthracène sont incolores, le naphtacène est jaune-orange et le pentacène est bleu (Figure 1.2) [Fleming et Williams, 2019].

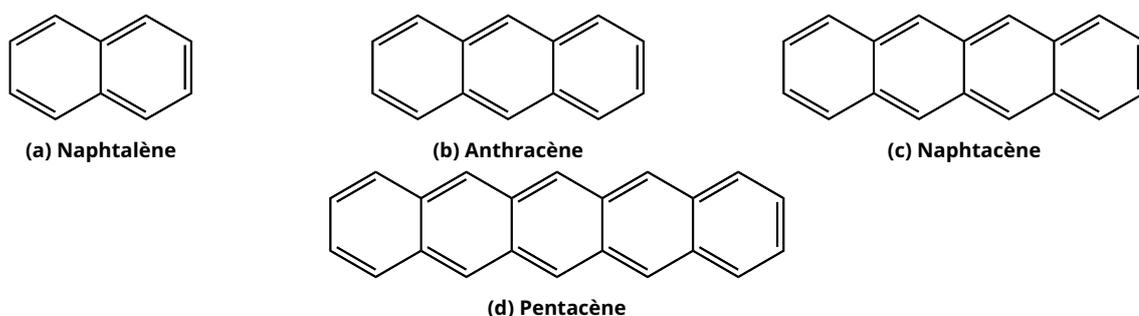


Figure 1.2 – Exemples de composés aromatiques polycycliques.

La présence d'auxochrome modifie également les diagrammes des niveaux d'énergie des orbitales moléculaires. Il en résulte une diminution de l'écart énergétique entre les orbitales HO et BV impliquées dans la transition électronique et donc une augmentation de la longueur d'onde d'absorption correspondante (effet bathochrome).

Les molécules organiques colorées sont donc des composés possédant un système conjugué étendu, linéaire ou aromatique. La présence de groupements auxochromes (OH, NH₂ ...) rattachés aux chromophores influe sur la coloration finale observée.

1.3 Familles de molécules colorées naturelles

Les composés colorés naturels se répartissent dans des familles de molécules diverses. Les principales familles sont décrites dans les sous-parties qui suivent (1.3.1 à 1.3.8). En fin de partie, des exemples de molécules et de sources biologiques associées sont mentionnés.

1.3.1 Caroténoïdes

Les caroténoïdes, les tétraterpénoïdes les plus connus, sont des colorants responsables de couleurs jaune, orange et rouge. Ils dérivent du lycopène (Figure 1.3), constitué de huit unités d'isoprène^{iv} [Yusuf *et al.*, 2017, Fernández-López *et al.*, 2020].

Ils peuvent être cycliques ou acycliques. Ils sont divisés en deux sous-groupes : les **carotènes**, purs hydrocarbonés, et les **xanthophylles**, oxygénés.

Par extension, on classe également dans cette famille les **apocaroténoïdes**, produits d'oxydation des caroténoïdes.

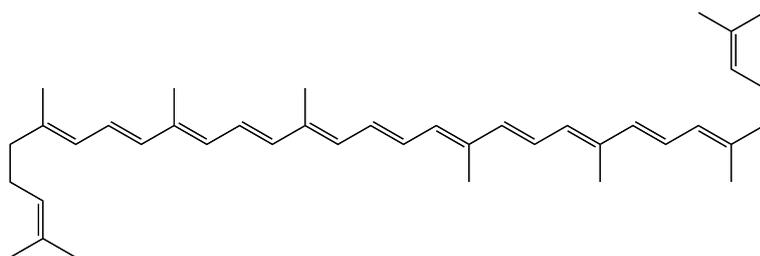


Figure 1.3 - Lycopène, structure de base des caroténoïdes.

1.3.2 Curcuminoïdes

Les curcuminoïdes sont des dérivés de la curcumine (Figure 1.4), responsables de colorations jaunes [Ferreira *et al.*, 2004, Cardon, 2014].

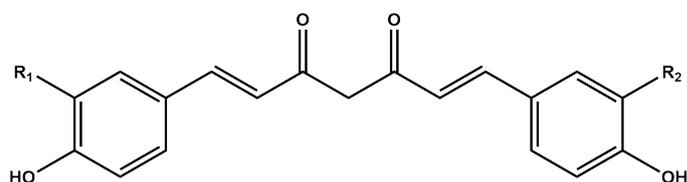


Figure 1.4 - Curcumines I, II et III.
Respectivement, R1 = R2 = OCH₃, R1 = H et R2 = OCH₃, R1 = R2 = H.

iv. Isoprène = 2-méthylbuta-1,3-diène.

1.3.3 Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés à bases azotées, très souvent hétérocycliques. Ils représentent une grande variété de composés et sont très abondants dans les végétaux. On rencontre notamment dans cette famille :

- Les **indigoïdes**, qui sont des dimères d'indole (Figure 1.5a) et qui donnent des colorations bleu, rouge et violette [Sequin-Frey, 1981, Ferreira *et al.*, 2004, Nowik, 2013, Cardon, 2014, Yusuf *et al.*, 2017].
- Les **bétalaïnes**, qui sont des dérivés de tyrosine, dont l'acide bétalamique est le chromophore commun (Figure 1.5d). On distingue les sous classes des **bétaxanthines** ou des **bétacyanines**, selon le résidu ajouté. Les teintes obtenues vont du jaune au rouge-violet [Fernández-López *et al.*, 2020].
- Les **phénoxazones**^v, qui sont des composés tricycliques, constitué d'un noyau d'oxazine central (hétérocyclique à six atomes contenant un atome d'oxygène et un atome d'azote) entouré par deux noyaux benzéniques dont l'un contient une cétone de façon à former une quinone imine (Figure 1.5c). Leur coloration varie du rouge au violet-bleu [Ferreira *et al.*, 2004, Nowik, 2013, Cardon, 2014].
- Les **protoberbérines**, qui sont des composés à quatre cycles de six atomes dont deux noyaux benzéniques, un noyau pyridinique et un cycle saturé (Figure 1.5b) et donnent une coloration jaune [Sequin-Frey, 1981, Nowik, 2013, Yusuf *et al.*, 2017].
- Des dérivés d'hermidine, une pipéridine dione, amine hétérocyclique à six atomes contenant deux cétones (Figure 1.5e), donnant des couleurs jaune ou bleu [Nabais *et al.*, 2020].

v. On rencontre également les appellations phénoxazinones, phénoxazin-3-ones ou encore 3H-phénoxazin-3-ones.

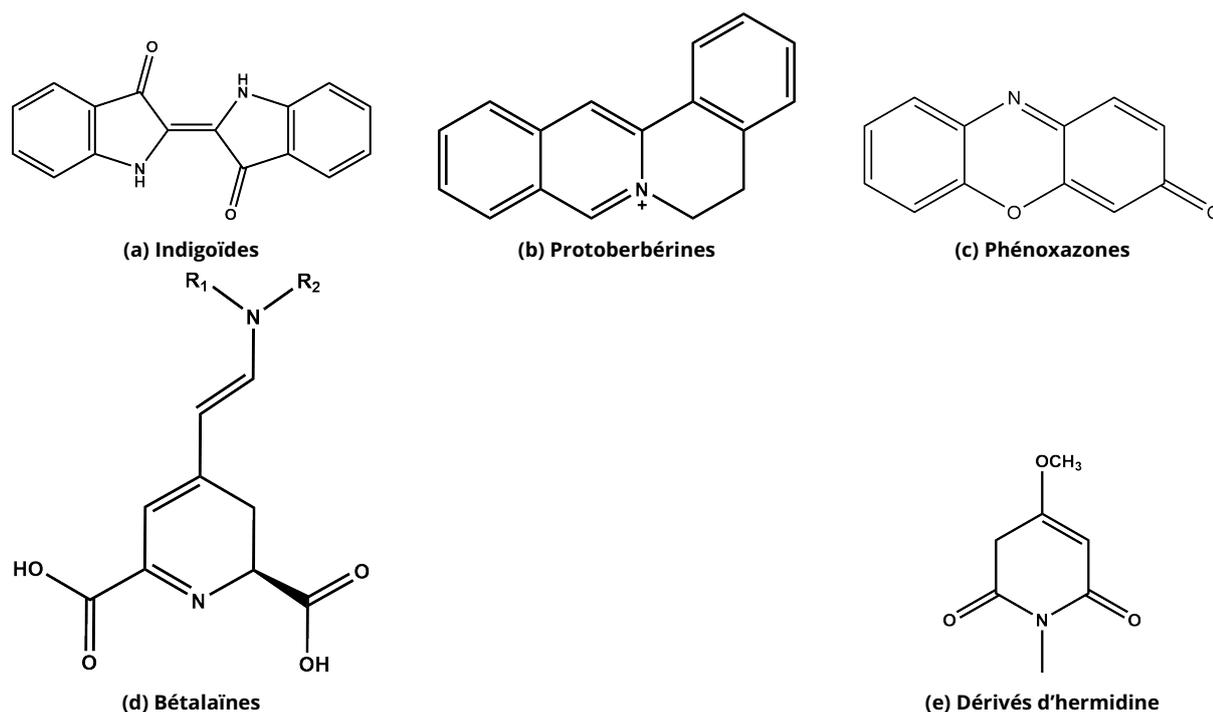


Figure 1.5 – Exemples de sous-familles d'alcaloïdes.

1.3.4 Quinoïdes

Les quinoïdes sont des diones cycliques entièrement conjuguées. On distingue les benzoquinones, monocycliques, les naphtoquinones, bicycliques et les anthraquinones, tricycliques (Figure 1.6). Les squelettes non substitués de ces molécules sont incolores et ce sont les substituants qui leur donnent leur coloration, pouvant aller du jaune-brun au rouge [Sequin-Frey, 1981, Ferreira *et al.*, 2004, Nowik, 2013, Cardon, 2014, Yusuf *et al.*, 2017].

Les **naphtoquinones** permettent l'obtention de teintes brunes à rouges. Les colorants à **anthraquinones** sont des colorants rouges. Les anthraquinones d'origine animale présentent des substitutions sur les deux cycles alors que les végétales ne sont substituées que sur un des cycles [Ferreira *et al.*, 2004, Cardon, 2014].

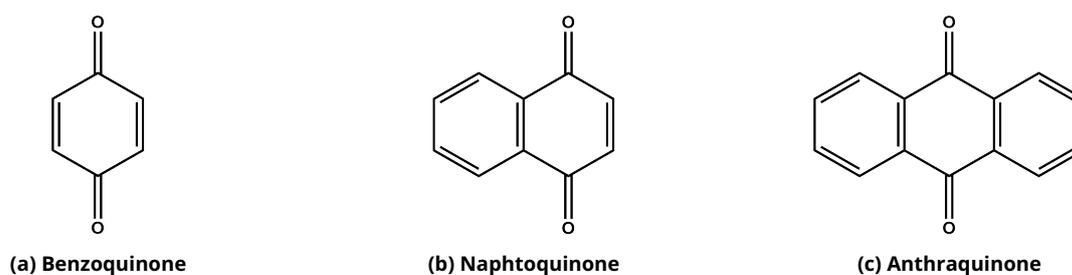


Figure 1.6 – Structure de base des quinoïdes.

1.3.5 Xanthonoïdes

Les xanthonoïdes sont des dérivés de la xanthone, composé tricyclique, constitué d'un noyau pyrone central (hétérocycle à six atomes contenant un atome d'oxygène et un groupement cétone) entouré de deux noyaux benzéniques (Figure 1.7). Ce sont des colorants jaunes [Aral et Rameshkumar, 2017, Ayele et al., 2020].

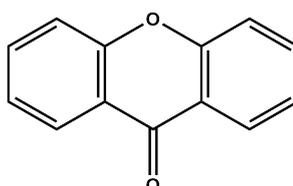


Figure 1.7 – Xanthone, structure de base des xanthonoïdes.

1.3.6 Coumarines

Les coumarines sont des dérivés de la coumarine, composé bicyclique constitué d'un noyau pyrone (hétérocycle à six atomes contenant un atome d'oxygène et un groupement cétone) et d'un noyau benzénique (Figure 1.8). Elles permettent l'obtention de colorations jaune à vert-brun [Vankar et al., 2009, ?].

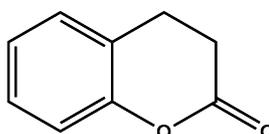


Figure 1.8 – Structure de base des coumarine.

1.3.7 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques. Au sens strict (*stricto sensu*), défini par [Bruneton, 2009], ce sont des composés de structure $C_6-C_3-C_6$ contenant deux cycles benzéniques (A et B) liés par un hétérocycle (C) à trois atomes de carbone et contenant une cétone (Figure 1.9a). Un sens plus large de l'appellation flavonoïde regroupe toute structure $C_6-C_3-C_6$ composée de deux cycles aromatiques reliés par trois atomes de carbone (Figure 1.9b).

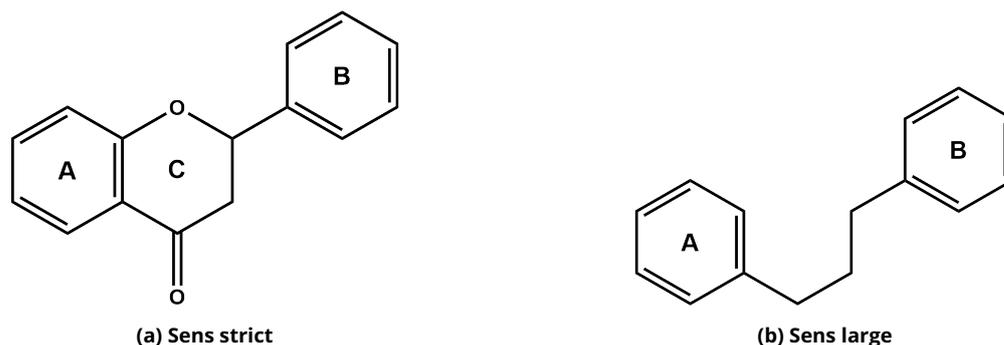


Figure 1.9 – Structure de base des flavonoïdes au sens strict [Bruneton, 2009] et au sens large.

Sens strict Les trois principaux sous-groupes des flavonoïdes *stricto sensu* sont les flavones (et flavonols), les isoflavones et les flavanones (et flavanonols) (Figure 1.10). Ils sont à l'origine de colorations jaunes (du latin *flavus*, jaune) [Sequin-Frey, 1981, Nowik, 2013, Cardon, 2014, Yusuf *et al.*, 2017]. On les trouve très souvent dans les plantes sous forme de sucres (glycosides) et sont hydrolysés lors du procédé d'extraction. Certains flavonoïdes sont très répandus et se retrouvent dans beaucoup de plantes tinctoriales; ils sont ainsi peu souvent marqueurs d'une espèce [Ferreira *et al.*, 2004, Cardon, 2014].

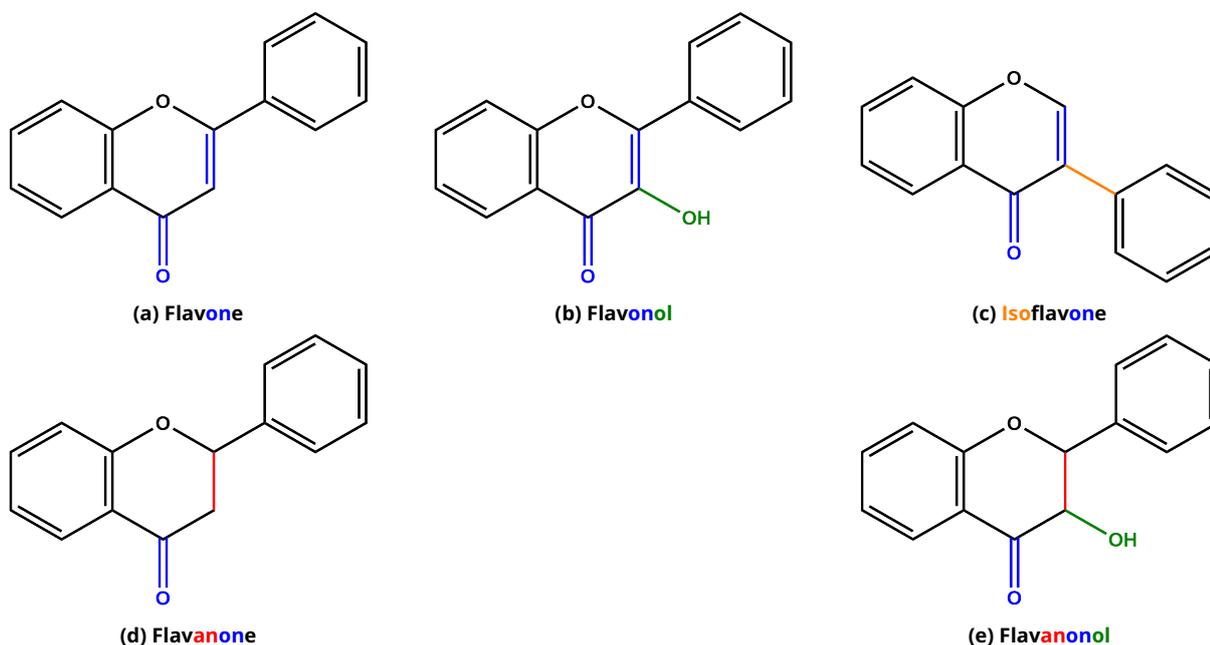


Figure 1.10 – Structures de flavonoïdes au sens strict.

Sens large Les flavanoïdes (dérivés de flavanes : flavanols, isoflavanes, homoisoflavonoïdes), les aurones, les chalcones et les anthocyanes font partie de la famille des flavonoïdes au sens large.

Les **flavanoïdes** (Figure 1.11) sont responsables de colorations du jaune, aux brun et rouge [Sequin-Frey, 1981, Ferreira *et al.*, 2004, Nowik, 2013, Cardon, 2014].

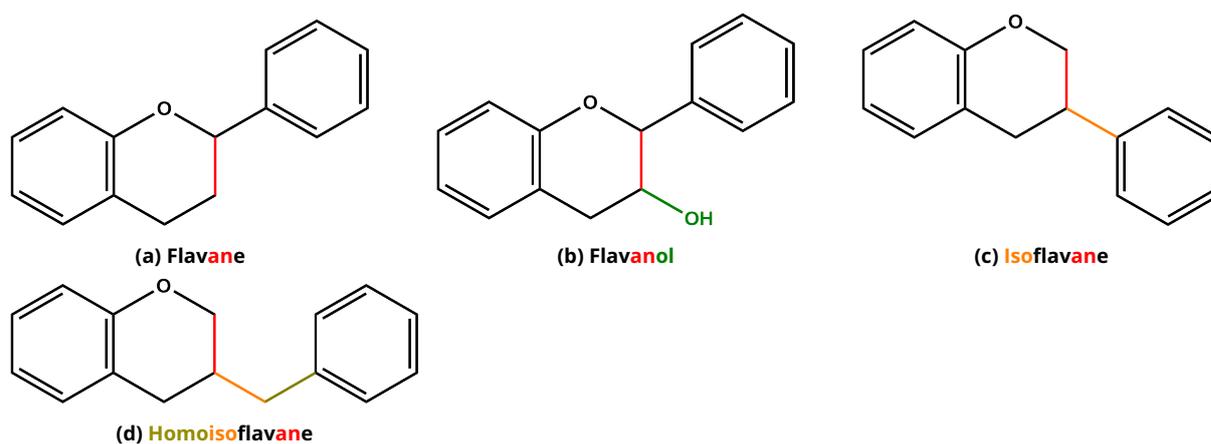


Figure 1.11 – Structure de flavanoïdes au sens large : les flavanoïdes.

Les **chalcones** (Figure 1.12a) et les **aurones** (Figure 1.12b) donnent des nuances orangées-jaunes [Sequin-Frey, 1981, Ferreira *et al.*, 2004, Nowik, 2013, Cardon, 2014].

Les **anthocyanes**^{vi} et **anthocyanidines**^{vii} sont des dérivés de l'ion flavylum (Figure 1.12c). Les anthocyanes et anthocyanidines présentes dans les fruits donnent des teintures bleues ou violettes, celles dans les fleurs des teintes rouges et violacées. On peut en trouver également dans les graines de certaines plantes [Ferreira *et al.*, 2004, Nowik, 2013, Cardon, 2014, Yusuf *et al.*, 2017].

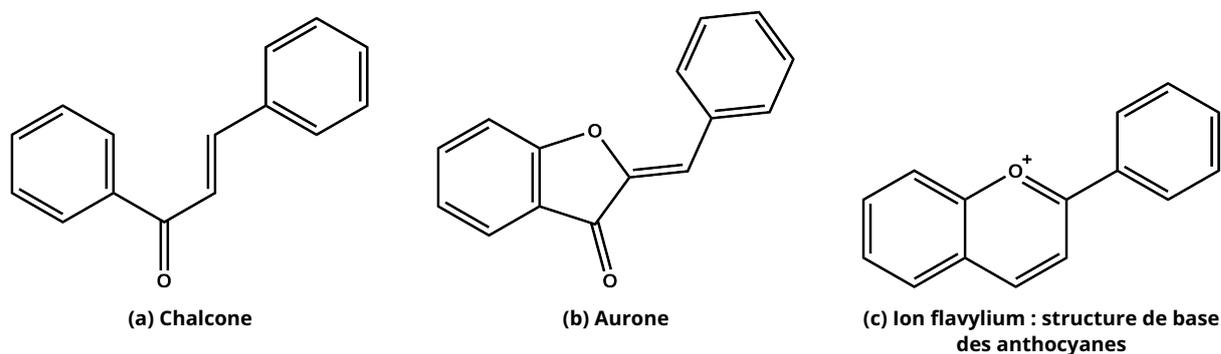


Figure 1.12 – Structures de flavanoïdes au sens large.

vi. Anthocyane est l'appellation de l'hétéroside : aglycone + sucre(s).

vii. Anthocyanine est l'appellation de l'aglycone seul.

1.3.8 Tannins

Les tannins sont des composés polyphénoliques, surtout connus pour leur utilisation dans les procédés de mordantage^{viii} et de tannage^{ix}; ils donnent également des colorations brunes à noires. On distingue les tannins condensés des tannins hydrolysables [Sequin-Frey, 1981, Ferreira *et al.*, 2004, Cardon, 2014, Yusuf *et al.*, 2017].

Les **tannins hydrolysables** sont des esters de sucres et d'acide gallique ou di-gallique, les **gallotannins** ou d'acide ellagique, les **ellagitannins** (Figure 1.13).

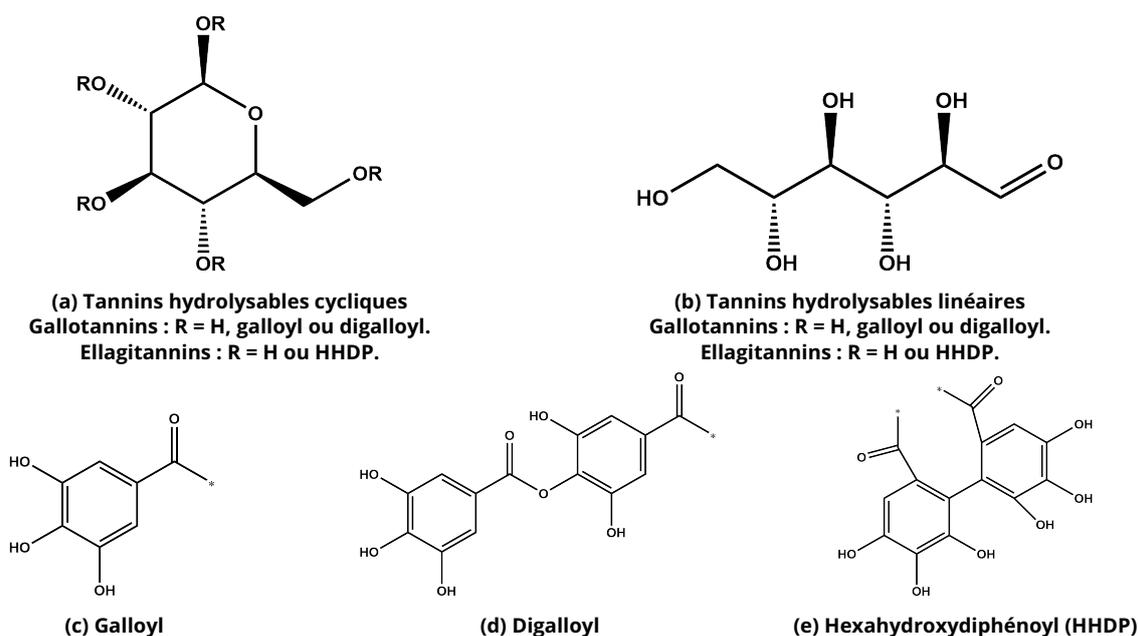


Figure 1.13 – Tannins hydrolysables.

Les **tannins condensés** (ou proanthocyanidines) sont des oligomères ou polymères de flavanols (Figure 1.14). Ils donnent des tons rouges foncés à bruns [Ferreira *et al.*, 2004, Cardon, 2014].

viii. Imprégnation des fibres d'un mordant en vue de leur teinture, pour améliorer la fixation du colorant.

ix. Procédé de transformation des peaux pour les transformer en cuirs souples et imputrescibles.

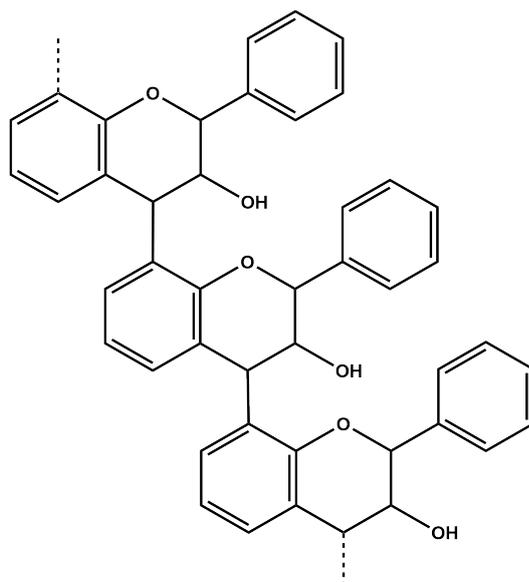


Figure 1.14 – Tannins condensés.

1.3.9 Exemples de molécules et des sources naturelles associées

L'ensemble des grandes familles présentées dans cette partie sont rencontrées dans des sources naturelles de colorants. Les tableaux qui suivent récapitulent ces familles et présentent des exemples de molécules appartenant à chacune d'entre elles. Des exemples de sources biologiques dans lesquelles on peut les rencontrer sont également citées [Sequin-Frey, 1981, Ferreira *et al.*, 2004, Cardon, 2014, Deveoğlu et Karadağ, 2019, Yusuf *et al.*, 2017]. Il faut noter que les colorants issus de ces sources sont généralement des mélanges complexes de molécules et que le colorant ne se réduit en aucun cas à l'unique molécule consignée dans ces tableaux.

Figure 1.15 – Exemples de molécules colorées par famille et sources biologiques associées.
NB Représentation de la couleur donnée à titre indicatif.

Famille	Sous classe	Molécule	Source biologique	Origine
Caroténoïdes	Carotènes	α -carotène	Carotte (<i>Daucus carota</i>)	Racine
	Xanthophylles	Lutéine	Rose d'Inde (<i>Tagetes erecta</i>)	Fleurs
	Apocaroténoïdes	Bixine	Rocou (<i>Bixa orellana</i>)	Graines
Curcuminoïdes		Curcumine	Curcuma (<i>Curcuma longa</i> , <i>C. domestica</i>)	Racine
Alkaloïdes	Indigoïdes	Indigotine	Indigotiers (<i>Indigo tinctoria</i> , <i>I. suffruticosa</i>)	Feuilles
		Indirubine	Pastel (<i>Isatis tinctoria</i>)	
		Dibromoindigo	Coquillages <i>Murex</i>	
	Bétalaïnes	Bétanine	Betterave (<i>Beta vulgaris</i>)	Racine
		Indicaxanthine	Figuier de barbarie (<i>Opuntia lasiacantha</i>)	Fruits
	Protoberbérines	Berbérine	Epine vinette (<i>Berberis vulgaris</i>)	Racine, écorce, tige
	Phénoxazones	Amino et hydroxy-orcéines	Lichens (<i>Rocella tinctoria</i> , <i>Lassalia pustulata</i> , <i>Ochrolechia tartarea</i>)	
Dérivés d'hermidine	Chrozophoridine	Croton des teinturiers (ou folium, <i>Chrozophora tinctoria</i>)	Fruits	
Quinoïdes	Naphtoquinones	Lawsonie	Henné (<i>Lawsonia inermis</i>)	Feuilles
		Juglone	Noyer (<i>Juglandaceae</i> sp.)	Brou
	Anthraquinones	Acide carminique	Insectes coccidés (<i>Coccoidea</i>)	Œufs
		Alizarine	Garance des teinturiers (<i>Rubia tinctorum</i>)	Racine
Xanthonoïdes		Mangiférine	Manguier (<i>Mangifera indica</i>)	Feuilles
		Acide gambogique	Gamboge (<i>Garcinia hanburyi</i>)	Gomme-résine

Famille	Sous classe	Molécule	Source biologique	Origine
Coumarines		Daphnétine	<i>Daphne sp.</i>	Racines, feuilles
Flavonoïdes, sens strict	Flavone	Lutéoline	Gaude (<i>Reseda luteola</i>)	Tiges, feuilles, graines
	Isoflavone	Génistéine	Genêt des teinturiers (<i>Genista tinctoria</i>)	Fleurs
	Flavonol	Quercétine	Quercitron (ou chêne du teinturier, <i>Quercus velutina</i>)	Écorce
	Flavanone	Naringénine	Agrumes (<i>Citrus sp.</i>)	Fruits
	Flavanonol	Fustine	Fustet commun (ou sumac des teinturiers, <i>Cotinus coggyria</i>)	Bois
Flavonoïdes, sens large	Flavanol	Catéchine	Acacia à cachou (<i>Accacia catechu</i>)	Écorce
	Homoisoflavanoïdes	Hématoxyline	Bois de Campêche (<i>Haematoxylum campechianum</i>)	Duramen
		Braziline	Bois de Brésil (<i>Caesalpinia echinata</i>)	Duramen
	Aurone	Sulfurétine	Fustet commun (ou sumac des teinturiers, <i>Cotinus coggyria</i>)	Bois
	Chalcone	Isoliquiritigénine	Robinier (<i>Robinia pseudacacia</i>)	Bois, jeunes rameaux
	Anthocyanidines	Delphinidine, Pélargonidine	Vigne (<i>Vitis vinifera</i>)	Fruits
			Rose trémière (<i>Alcea rosea</i>)	Pétales
Sorgho des teinturiers (<i>Sorghum vulgare</i>)			Graines	
Tannins	Hydrolysables	Trigalloylglucose	Chêne d'Alep (<i>Quercus infectoria</i>)	Galles
		Castaline	Chataigniers (<i>Castanea sp.</i>)	Bois
	Condensés	(-)-épicatéchine-(+)-catéchine	Chênes (<i>Quercus robur</i> , <i>Q. petrae</i>)	Écorce

2 Identification des colorants naturels dans les objets historiques

Les colorants naturels ont été abondamment employés par les artisans et artistes depuis l'âge de pierre^x et jusqu'au développement de la chimie industrielle au 19^{ème} siècle. On les retrouve ainsi dans de nombreux objets patrimoniaux, issus de disciplines artistiques variées : peinture, céramique, habillement, décoration d'intérieur (moquette, rideaux, tapisserie , etc.) [Nowik, 2013, Pauk *et al.*, 2014, Zasada-Kłodzińska *et al.*, 2020].

2.1 Approche

Comme évoqué en introduction, les contraintes propres au domaine de l'analyse des objets du patrimoine mènent à une utilisation préférentielle des techniques spectroscopiques non-invasives. L'identification des colorants naturels historiques par ces techniques représente un défi analytique considérable en raison de leur complexité moléculaire. S'ajoute également à la réponse spectrale globale du mélange colorant, la contribution éventuelle du support et d'additifs propres au mode de fabrication de l'objet (liants, charges minérales), complexifiant la tâche. De plus, les colorants naturels présentent une faible stabilité dans le temps; les espèces colorées peuvent ainsi se retrouver en faible quantité dans les matériaux historiques analysés et la présence de produits de dégradation n'est pas à écarter.

Les méthodes d'identification basées sur les techniques non-invasives s'appuient ainsi sur la recherche de signaux spectraux spécifiques à chaque source colorante naturelle. Elles nécessitent une connaissance préalable de la composition chimique des extraits colorés naturels et de la spécificité des différents constituants, ainsi que de leur réponse spectrale. Avant toute identification dans un objet historique, des études préliminaires en laboratoire sur des colorants de référence dont la source biologique est précisément connue sont donc menées.

Dans un premier temps, il s'agit d'identifier les structures des molécules colorantes dans les extraits colorés de référence. Cela est généralement réalisé grâce aux méthodes séparatives couplées à des détecteurs d'absorption, de fluorescence ou de spectrométrie de masse. Il peut être nécessaire de purifier les molécules cibles afin de réaliser des analyses structurales telles que la spectroscopie RMN ou la diffraction des rayons X pour obtenir les structures moléculaires.

x. Période de la préhistoire s'achevant entre 3000 et 2000 avant J.C.

Les signatures spectrales pour les différentes techniques non-invasives envisagées sont ensuite enregistrées pour les différents constituants identifiés (via des standards s'ils sont disponibles, ou via les composés purifiés du mélange) et elles sont comparées à celle du mélange colorant afin d'établir la contribution de chacun d'eux à la signature spectrale globale. Il est ainsi possible d'évaluer si la réponse spectrale du mélange coloré est générée par des composés qui lui sont spécifiques. Ceci est nécessaire pour garantir une identification fiable du colorant par ces techniques. Il n'est cependant pas à exclure que la signature spectrale soit dominée par la contribution d'un constituant, coloré ou non, non spécifique du colorant analysé. Pour cette raison, les techniques spectrales non-invasives ne permettent souvent qu'une identification partielle.

Par la suite, la mise en forme du colorant telle qu'on peut le rencontrer dans les objets historiques est généralement considérée : fibres textiles teintées, couches picturales colorées, etc. Des échantillons modèles sont préparés en faisant varier les supports, les modes d'extraction et de préparation du colorant (selon des recettes historiques, par exemple), les additifs (liant, mordant, charge minérale). Leur influence sur les spectres enregistrés et les possibilités d'identification de la source colorante sont évaluées.

Enfin, l'influence du vieillissement et de la dégradation du colorant sur les possibilités d'identification n'est pas à négliger et doit être aussi étudiée. Des études de vieillissement accéléré sont menées sur des échantillons modèles en prenant en compte des facteurs comme l'exposition à la lumière, la température, l'humidité. Un suivi des propriétés spectrales caractéristiques du colorant analysé au cours du vieillissement est réalisé.

Dans la pratique, pour des colorants considérablement étudiés (cochenilles, indigo), la démarche décrite n'est généralement pas réalisée dans son ensemble et les méthodes d'identification sont développées en s'appuyant sur les connaissances communes accumulées.

Si les données analytiques seules ne permettent pas de déterminer la source colorante précise, les coupler avec des considérations historique et géographique peut permettre de suggérer une attribution en fonction du contexte de fabrication de l'objet.

La démarche d'identification de colorants par les techniques non-invasives est illustrée dans le paragraphe suivant pour le cas d'étude du *Codex Borbonicus*.

2.2 Étude de cas : Les colorants dans le *Codex Borbonicus*

Le *Codex Borbonicus* est un manuscrit aztèque, conservé depuis 1826 à la bibliothèque de l'Assemblée nationale (Paris) et dont il tire son nom, d'après le Palais Bourbon^{xi}.

Ce codex est constitué d'une bande d'un support fibreux d'environ 14 mètres de long, pliée en accordéon pour former 36 pages d'environ 40 x 40 cm. Il est peint uniquement sur son recto.

Il contient des calendriers et représentations de cérémonies religieuses. Il est composé de quatre sections présentant : un *tonalpohuallí* - calendrier divinatoire de 260 jours aztèques, un *xiuhmolpillí* - cycle de 52 années solaires, un *xiuhpohuallí* - représentation des principales cérémonies religieuses de l'année solaire aztèque et un autre *xiuhmolpillí* [Anders *et al.*, 1991]. Deux parties de styles très différents peuvent être identifiées (Figure 1.16).

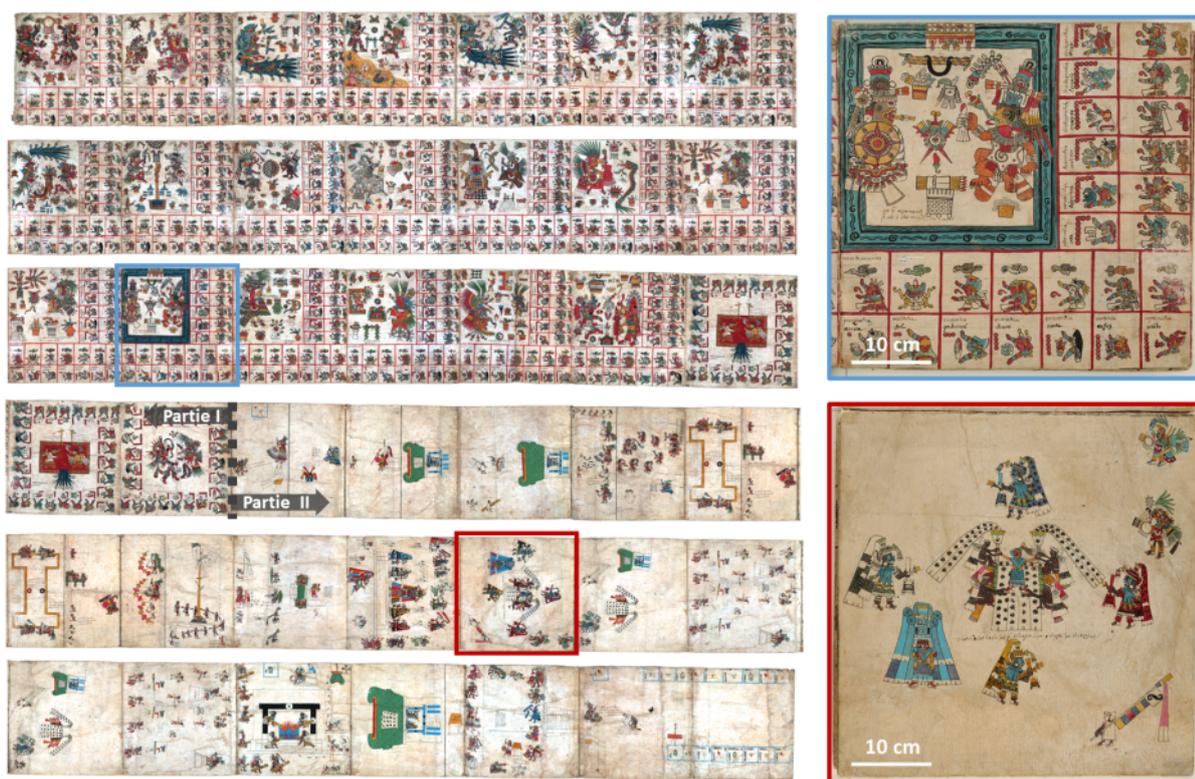


Figure 1.16 – Le *Codex Borbonicus* : À gauche, l'ensemble du document. À droite, détails de deux pages issues des deux parties de style distinct, pages 16 (en bleu) et 31 (en rouge). ©Assemblée Nationale

xi. Nom du bâtiment abritant l'Assemblée nationale.

Il aurait été réalisé dans la vallée de Mexico-Tenochtitlan au début du 16^{ème} siècle, au moment de la conquête espagnole. Son contexte précis de fabrication fait débat : les principales interrogations se concentrent notamment sur la potentielle influence européenne dans la production de ce document. Les analyses stylistiques, seules, ne permettant pas de conclure, analyser les matériaux constitutifs du manuscrit prend alors tout son sens pour mettre en évidence des choix techniques et culturels pouvant être propres à une civilisation.

Les différentes matières colorantes du manuscrit ainsi que le support et les couches préparatoires ont été analysés *in situ* par des techniques spectroscopiques non-invasives. Quand cela a été nécessaire, ces analyses ont été complétées par la réalisation d'échantillons modèles en laboratoire pour comparer les réponses spectrales obtenues et valider les identifications faites [Pottier, 2017, Pottier *et al.*, 2017, Pottier *et al.*, 2018, Pottier *et al.*, 2019].

Le substrat du manuscrit est un aplat fibreux sur lequel est imprégné un aprêt de gypse en quantités variables.

Les matières colorantes employées dans les deux parties mettent en jeu de nombreux extraits organiques (Figure 1.17). Si certains sont fréquemment rencontrés dans les manuscrits précolombiens comme la cochenille ou le bleu maya, d'autres sont beaucoup moins répandus. C'est le cas de l'extrait de *Commelina coelestis*, uniquement identifié dans les codices *Selden* et *Bodley* [Grazia *et al.*, 2018, Grazia *et al.*, 2020] et de celui de *Justicia spicigera*, à ce jour, unique au *Codex Borbonicus*.

**Figure 1.17 – Synthèse des propositions d'identification des matériaux constitutifs des deux parties du *Codex Borbonicus*, extrait de [Pottier, 2017].
x = absent**

Constituant	Partie I	Partie II
Substrat	Gypse Polymères végétaux	Gypse Polymères végétaux
Badigeon de correction	Gypse	x
Peinture rouge	Laque de cochenille (+ colorant jaune ?)	Laque de cochenille (+ colorant jaune ?)
Peinture bleue	Bleu Maya	Bleu Maya
Peinture jaune	Colorant organique (+ alun)	Colorant organique (+ alun)
Peinture brune	Préparation de cochenille et d'argile	Extrait de <i>Justicia spicigera</i>
Peinture orange	Peinture rouge + peinture jaune	Peinture rouge + Peinture jaune
Peinture bleu-gris	x	Extrait de <i>Commelina coelestis</i>
Peinture rose	Laque de cochenille	Laque de cochenille + calcite
Peinture mauve	x	Laque de cochenille + calcite
Peinture verte	Peinture bleue + peinture jaune	Peinture bleue + peinture jaune
Peintures bleue et verte foncées	x	Superposition de peinture bleu- gris sur peintures bleue et verte
Peinture noire	Noir de charbon	Noir de charbon
Peinture grise	Noir de charbon	Noir de charbon
Ecriture des commentaires coloniaux (XVI^{ème} siècle ?)	Encres métallo-tanniques	Encres métallo-tanniques

Le colorant extrait de la plante *Justicia spicigera* a hypothétiquement été identifié dans les peintures brunes de la partie II du *Codex Borbonicus*. Les éléments picturaux correspondant sont notamment les peintures corporelles sur le visage, les bras et les jambes des dieux comme *Uitzilopochtli* ou *Tezcatlipoca*, des éléments de leur parure (couvre-chef, boucliers, capes), le masque et le costume du guerrier coyote noir (Figure 1.18a) ou encore la peau des prêtres (Figure 1.18b) [Anders et al., 1991].



(a) Le guerrier coyote noir



(b) Un prêtre

Figure 1.18 – Détails de couches brunes de la page 30 du *Codex Borbonicus*. ©Assemblée Nationale

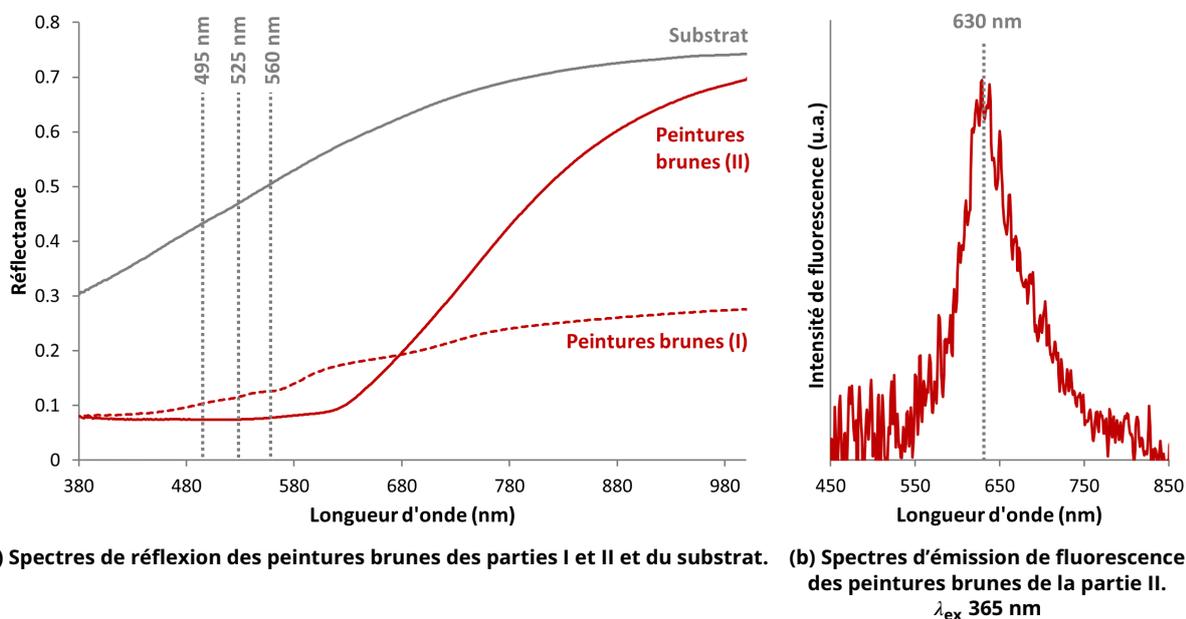
Contrairement aux couches brunes de la première partie du *Codex Borbonicus* présentant des bandes d'absorption à 495, 525 et 560 nm, caractéristiques de colorants à anthraquinones animales comme la cochenille, le signal enregistré en spectroscopie de réflexion pour celles de la seconde partie ne présente aucune caractéristique permettant de le rapprocher de colorants connus (Figure 1.19a). Aucun élément chimique spécifique n'est détecté en spectroscopie XRF, ce qui suggère la présence d'un colorant organique seul, sans ajout de charge minérale dans la préparation de la peinture. Une fluorescence intrinsèque centrée à 630 nm est détectée pour ces peintures brunes (Figure 1.19b). Il est intéressant de noter que c'est le seul colorant du *Codex Borbonicus* à présenter une fluorescence intrinsèque [Pottier, 2017].

Les peintures brunes de la partie II se caractérisent également par une signature Raman avec des bandes de diffusion enregistrées entre 500 et 1700 cm^{-1} (Figure 1.20).

Dans le but d'identifier le colorant correspondant à ces signaux, les sources de colorants utilisées par les populations aztèques à cette période ont été inventoriées à partir de sources historiques telles que le Codex de Florence^{xii} [Anderson, 1963, Wal-

^{xii}. ou *Historia General de las Cosas de Nueva España* est un encyclopédie rédigée en nahuatl et en espagnol, par le moine franciscain Bernardino de Sahagún, entre 1558 et 1577, qui décrit les coutumes de la Nouvelle Espagne. Le livre XI, qui est un traité d'histoire naturelle, contient notamment les noms et caractéristiques de divers matériaux colorants utilisés par les peintres et les teinturiers.

lert, 1995] et d'études analytiques sur d'autres codices mésoaméricains [Miliiani *et al.*, 2012, Domenici *et al.*, 2014]. Une bonne corrélation des spectres Raman des peintures brunes de la partie II du *Codex Borbonicus* et de laine teinte avec des feuilles de *Justicia spicigera* [Casanova-González *et al.*, 2012] a été observée (Figure 1.20).



(a) Spectres de réflexion des peintures brunes des parties I et II et du substrat. (b) Spectres d'émission de fluorescence des peintures brunes de la partie II. λ_{ex} 365 nm

Figure 1.19 – Spectres de réflexion et d'émission de fluorescence des peintures brunes du *Codex Borbonicus*.

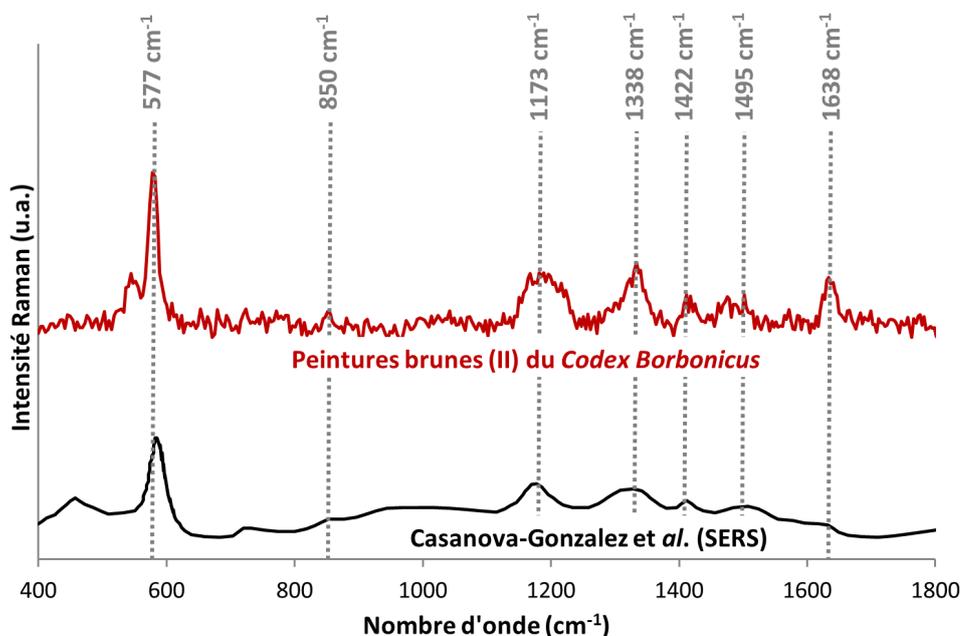


Figure 1.20 – Spectre Raman des peintures brunes de la partie II du *Codex Borbonicus* (Laser 532 nm, Soustraction de la ligne de base) et spectre SERS d'un extrait de *Justicia spicigera* [Casanova-González *et al.*, 2012].

Le *mohuitli*, terme en nahuatl pour *Justicia spicigera*, est cependant décrit dans le Codex de Florence comme une source de colorant bleu. Aucune source historique ne relate son mode de préparation pour une utilisation en tant que peinture pour manuscrits et aucun rapport analytique ne mentionne sa présence dans d'autres manuscrits mésoaméricains. Ces particularités ont ainsi motivé une étude approfondie de ce colorant, faisant l'objet de cette thèse.

Avant de rentrer dans le détail du travail expérimental effectué, la fin de ce chapitre est consacrée à la description de l'état des connaissances sur la plante tinctoriale *Justicia spicigera*.

3 *Justicia spicigera* Schltld.

3.1 Présentation

3.1.1 Taxonomie, appellations botaniques et vernaculaires

L'espèce *Justicia spicigera* Schltld. ^{xiii} fait partie de la famille des Acanthacées. Selon les données de *Plants of the World Online* ^{xiv}, 18 synonymes botaniques coexistent (Tableau 1.1). D'après la plateforme GBIF (*Global Biodiversity Information Facility*) ^{xv}, les plus couramment employés sont *Jacobinia spicigera*, *Jacobinia mohintli* et *Jacobinia neglecta* (Figure 1.21).

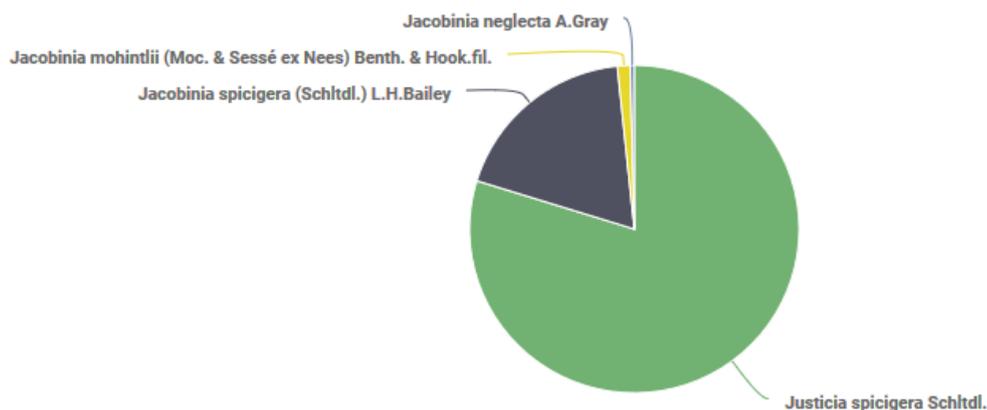


Figure 1.21 – Noms employés dans les occurrences sur la plateforme GBIF [noa, b].

xiii. Schltld. (ou Schlecht.) pour Diederich Franz Leonhard von Schlechtendal.

xiv. Base de données des Jardins botaniques royaux (*Royal Botanic Gardens*) de Kew (Royaume-Uni) mettant à disposition les noms scientifiques acceptés et les synonymes botaniques d'une grande sélection de plantes à graines.

xv. Plateforme rassemblant des bases de données de collections d'histoire naturelle et d'observations dans la nature pour la description de la biodiversité (plantes, animaux ou organismes unicellulaires).

Tableau 1.1 – Classification et synonymes botaniques de *Justicia spicigera*, d'après *Plants of the World Online* [noa, d].
 ≡ pour les synonymes homotypiques (ou nomenclaturaux) et = pour les synonymes hétérotypiques (ou taxinomiques).

Règne	Plantae
Phylum	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Acanthaceae
Genre	<i>Justicia</i> L.
Espèce	<i>Justicia spicigera</i> Schltld.
≡	<i>Jacobinia mohintli</i> Hemsl.
≡	<i>Jacobinia spicigera</i> (Schltld.) L.H.Bailey
≡	<i>Sericographis mohintli</i> Nees
=	<i>Aphelandra ghiesbreghtiana</i> (Lem.) Lem.
=	<i>Cyrtanthera ghiesbreghtiana</i> (Lem.) Decne.
=	<i>Drejera willdenowiana</i> Nees.
=	<i>Jacobinia atramentaria</i> (Benth.) S.F.Blake
=	<i>Jacobinia ghiesbreghtiana</i> Benth. & Hook.f.
=	<i>Jacobinia neglecta</i> A.Gray
=	<i>Jacobinia scarlatina</i> S.F.Blake
=	<i>Justicia atramentaria</i> Benth.
=	<i>Justicia ghiesbreghtiana</i> Lem.
=	<i>Justicia ghiesbreghtii</i> Lem.
=	<i>Justicia liebmanii</i> V.A.W.Graham
=	<i>Justicia mohintli</i> Moc. & Sessé ex Nees
=	<i>Justicia scarlatina</i> (S.F.Blake) V.A.W.Graham
=	<i>Sericographis ghiesbreghtiana</i> (Lem.) Nees
=	<i>Sericographis neglecta</i> Oerst.

On la trouve également sous de nombreuses appellations locales vernaculaires, comme *mohintli*, *muicle*, *muitle*, *sacatinta*, etc. (détails en Annexe B). Les traductions entre les langues indigènes et l'espagnol, ainsi que les attributions botaniques ont pu entraîner avec le temps certaines confusions [Anderson, 1963, Espejo Muriel, 2019].

Par exemple, selon [Hernandez, 1959], le colorant bleu extrait de la plante à indigo des Amériques (*Indigofera suffruticosa* ou *xiuhquilitl* en nahuatl) était nommé par les indigènes *tlacehoili*, *tlaceluilli* mais aussi *mohuitli*, appellation aujourd'hui réservée au colorant extrait de *Justicia spicigera*.

Par ailleurs, sous l'appellation *sacatinta* (en espagnol, *sacar* : enlever et *tinta* : le colorant), nous retrouvons deux autres espèces très similaires du genre *Justicia* : *J. tinctoriella* et *J. macrantha*^{xvi}. Leur utilisation en teinture est très proche ce qui peut expliquer qu'elles ne soient pas distinguées [Parkin, 1905, Alexander, 1937, Roquero, 2006, Cardon, 2014].

3.1.2 Description

Justicia spicigera est un arbuste mesurant de 1 à 1,5 mètre de haut. Il présente de nombreuses branches d'un demi-centimètre à un centimètre d'épaisseur, recouvertes d'un léger duvet. Ses feuilles sont persistantes ; elles sont d'un vert mat foncé, de cinq à sept centimètres de longueur et trois centimètres de diamètre, lancéolées^{xvii} et au pétiole court. Elles poussent de manières opposées, alternant par paires. Les fleurs sont oranges ou rouges, tubulaires, en « forme de trompette », d'environ trois centimètres de longueur. Elles poussent groupées à la jonction de la tige et de la feuille ou en partie terminale de la plante (Figure 1.22). La floraison a lieu de décembre-janvier à mai-août. Les fruits ont une forme de capsule, ils sont discrets, d'environ deux centimètres ; la fructification est rare, de mars à mai [Thomas, 1866, Argueta *et al.*, 1994, Pena Aguero, 2010, Cardon, 2014, Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014].

3.1.3 Distribution actuelle et habitat

L'arbuste de *Justicia spicigera* est originaire du Mexique, notamment des états du sud (Chiapas, Hidalgo, Mexico, Morelos, Nayarit, Puebla, San Luis Potosí, Tlaxcala, Yucatán). On le retrouve principalement dans d'autres pays d'Amérique Centrale (Belize, Honduras, Costa Rica, Salvador, etc.) ainsi que dans certaines régions d'Amérique du Sud et des États-Unis (Figure 1.23) [Pena Aguero, 2010, Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014].

Il est présent dans des climats chauds, semi-secs, secs et tempérés, depuis le niveau de la mer jusqu'à 3000 m d'altitude ; on le trouve dans les taillis^{xviii} humides ou secs, les forêts tropicales caduques, semi-caduques et persistantes, les forêts de nuage (*bosque mesófilo de montaña*)^{xix}, les forêts de chênes, de pins et mixtes chênes-pins. On peut aussi noter sa présence dans des zones désertiques (*matorral xerófilo*). Il est très fréquemment cultivé dans les jardins familiaux près des villages et pousse également le

xvi. Synonymes botaniques en Annexe C (Tableau C.1).

xvii. En forme de fer de lance.

xviii. Partie d'un bois ou d'une forêt, composée d'arbres de petit diamètre que l'on coupe périodiquement, et qui croissent à partir des anciennes souches, par des rejets ou drageons.

xix. Type de forêt humide en milieu tropical de montagne.

long des routes [Argueta *et al.*, 1994, Cardon, 2014].



(a) Photographie d'un spécimen de *Justicia spicigera*.
©FloraPix.



(b) Schéma d'une tige *Justicia spicigera*,
extrait de [Alexander, 1937].
1. Une tige fleurie 2. La base de la fleur, avec bractées et calyce 3. Pointe de la lèvre inférieure 4. Une étamine, x10
5. Un pistil x10.

Figure 1.22 – *Justicia spicigera*



Figure 1.23 – Distribution géographique de *J. spicigera*, d'après *Plants of the World Online* [noa, d].
En vert : plante native. En violet : plante introduite.

3.2 Usages et propriétés

Cette plante a été utilisée au Mexique dès l'époque préhispanique pour ses propriétés thérapeutiques et colorantes.

3.2.1 Données historiques

Les premières données ethnographiques sur son utilisation remontent à la seconde moitié du 16^{ème} siècle. Après son voyage au Mexique, dès 1570, le médecin et botaniste Francisco Hernández témoigne de l'usage de la plante par les Aztèques en teinture et en médecine : l'eau dans laquelle elle a été trempée et écrasée soigne la dysenterie et la gale, stoppe les flux menstruels excessifs et teint la laine en violet (« Cura las disenterías y detiene el flujo menstrual excesivo tomando cuantas veces sea necesario el agua donde se haya remojado, machacada, por algún tiempo; cura la sarna, y tiñe las lanas de color purpura. ») [Hernandez, 1943, Hernandez, 1959].

Outre-Atlantique, des rapports datant du 18^{ème} siècle indiquent l'utilisation de la plante pour l'obtention d'un colorant bleu à l'Académie de San Carlos (Espagne) [Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2017].

Les sous-parties suivantes décrivent les usages de la plante dans les pratiques actuelles.

3.2.2 Médecine

Dans la médecine traditionnelle de la péninsule du Yucatán, l'infusion des feuilles de *Justicia spicigera* est décrite comme un remède contre les maux de tête, les troubles digestifs ou encore l'hypertension et l'épilepsie. La décoction des feuilles et des branches, voire des fleurs, est indiquée pour le traitement des maladies de la peau (érysipèle, syphilis ...), contre la fièvre ou encore les infections pulmonaires [Ortiz-Andrade *et al.*, 2012].

Diverses études pharmacologiques ont été menées afin de mettre en évidence les propriétés anti-oxydantes [Sepulveda-Jimenez *et al.*, 2009, Garcia-Marquez *et al.*, 2012, Awad *et al.*, 2015, Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2017], anti-diabétiques [Ortiz-Andrade *et al.*, 2012], anti-hypertensives [Esquivel Gutierrez, 2013], anti-dépressives [Cassani *et al.*, 2014, García-Ríos *et al.*, 2019], anti-cancer [Alonso-Castro *et al.*, 2012] ou encore anti-inflammatoires [Perez Gutierrez *et al.*, 2018] de l'extrait de *Justicia spicigera*.

3.2.3 Teinture

Le colorant extrait de *Justicia spicigera* est utilisé dans l'artisanat local (vannerie, teinture de textiles) pour la production de nuances allant du rouge au bleu. Il a été employé par les peuples huastèque, maya et nahua^{xx} durant l'époque préhispanique, la période coloniale et l'est toujours actuellement [Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014].

Plusieurs procédés de teintures sont rencontrés selon les applications et les régions. Différents exemples de pratiques de teinture actuelles sont présentés ici.



Figure 1.24 – Carte du sud du Mexique et Guatemala.

Dans la région de Veracruz (MX), les feuilles de *Justicia spigera* sont principalement utilisées dans le domaine de la **vannerie** pour teindre des paniers. Les feuilles fraîches ainsi que les fibres végétales (roseau ou « vigne », *bejuco*) à teindre sont mises à bouillir dans des cuves en cuivre durant toute une journée ou une nuit. Dans les communautés nahuas de Hueycuatitla (Benito Juárez, Veracruz) et Alahualtitla (Chicontepec, Veracruz) (Figure 1.24), deux types de *muitle* ont été introduits d'Hidalgo et sont utilisés : *Justicia spicigera* pour les teintures rouges et une autre espèce de *Justicia* non classifiée botaniquement pour les teintures bleues [Hernandez Ramos, 2009, Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014].

Pour la teinture de **textiles**, on peut distinguer deux cas : l'utilisation de ***Justicia spicigera* seule** ou **conjointement à de l'indigo**. Pour commencer, voici les différents procédés de teinture utilisant *Justicia spicigera* seule.

Justicia spicigera est considérée comme l'une des plus anciennes plantes tinctoriales utilisées par les artisans tisserands de Santa María Atzompa (Oaxaca, MX) (Figure 1.24).

xx. Les Aztèques font partie des Nahuas.

Ils l'utilisent pour obtenir des teintes bleu-grises [Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]. Si les feuilles restent à macérer dans de l'eau pendant une semaine, on peut obtenir des tons violet et bleu. Si une couleur rosée est désirée, du citron est ajouté; pour les gris, de la chaux ou du bicarbonate de soude [Terrazas Mata, 2012].

Une recette traditionnelle du Chiapas (MX) (Figure 1.24) consiste à faire macérer et fermenter les feuilles fraîches dans de l'eau pendant 21 jours. Les feuilles sont ensuite retirées et les fibres préalablement mordancées sont plongées dans le bain de teinture qui est chauffé jusqu'à 80-90 °C de 30 min à une heure. Cela permet l'obtention de bleus-violet intenses sur laine mordancée à l'alun et de violets pâles ou mauves sur coton mordancé à la lessive de cendre, l'acétate d'alun et la poudre de craie [Ovarlez, 2008, Cardon, 2014].

À Teotitlán del Valle (Oaxaca, MX) (Figure 1.24), les feuilles détachées des branches et coupées, ainsi que les fibres à teindre sont mises dans de l'eau dans un récipient en cuivre ou en aluminium et sont chauffées avec un léger bouillonnement quelques heures. Au bout d'une heure de chauffage, un bleu intense est déjà obtenu [Behan, 2021].

Une pratique populaire chez les teinturières nahuas consiste à faire macérer les branches de *mohuitli* dans le bouillon récupéré de la cuisson du maïs (*nejayote* ou *agua de nixtamal*), pour laquelle de la chaux est ajoutée afin d'attendrir les grains. Après avoir retiré les branches, les fils de coton ou de la laine sont plongés dans le bain résultant. La teinte bleue intense est obtenue par oxydation à l'air lorsque l'on ressort les fibres de la cuve. Les artisans nahuas de Hueyapan (Puebla, Mexique) (Figure 1.24) préparent aussi le colorant en utilisant la plante avec un mordant à base d'alun et de vinaigre pour obtenir de teintes brunes-verdâtres [Roquero, 2006]. Des exemples de tests de teintures selon ces pratiques réalisés par Ana Roquero (communication personnelle) sont présentés dans le Tableau 1.2).

Tableau 1.2 – Tests de teintures réalisés par Ana Roquero (communication personnelle).
©Ana Roquero

Préparation	Fibre	Couleur	Photographie
Sans mordant, 3 jours de macération	Coton	Bleu ciel	
Bichromate de potassium	Laine	Bleu foncé	
Alun + vinaigre	Laine	Vert	
Alun + <i>agua de nixtamal</i> + citron	Coton	Violet	
Carbonate de sodium + eau chaude, récipient fermé, 12 heures	Coton	Violacé	
Carbonate de sodium + <i>agua de nixtamal</i> + eau bouillante, récipient fermé, 8 heures	Coton	Bleu-violet, rose	

À San Juan La Laguna au bord du lac Atitlán (GT) (Figure 1.24), se trouve une grande communauté très active de femmes tisserandes. Pour la teinture de fibres, les plantes locales sont utilisées, notamment *sacatinta*. Dans la coopérative « Tz'utujil », les fibres de coton à teindre sont d'abord trempées dans un bain où des écorces de bananiers ont préalablement bouillies pendant 2 à 3 heures; cela joue le rôle de mordant. Soit les feuilles (et parfois les branches, voire les fleurs) de *sacatinta* sont mises à bouillir seules pendant 30 min et retirées avant de tremper dans le bain les fibres à teindre, soit elles sont bouillies directement avec les fibres (Figure 1.25). Plusieurs nuances de couleur peuvent être obtenues selon la saison, la quantité utilisée, la température du bain ou encore le temps d'immersion. Concernant l'influence de la saison, la présidente Maria Gloria explique que s'il y a beaucoup de pluie, la teinture obtenue sera bleue claire, car les feuilles contiennent beaucoup d'eau et si c'est une saison sèche, ce sera plutôt une teinture grise. Une fois sorties du bain de teinture, les fibres sont essorées, rincées ou lavées avec du savon et suspendues pour séchage avant d'être tissées. Le processus allant de la récolte des plantes tinctoriales à l'obtention de la fibre teinte prête à être tissée peut prendre jusqu'à 20 jours [noa, c, Sinisterra, 2018, Diggins,]



Figure 1.25 – Préparation du bain de *sacatinta* par les tisserandes de Tz'utujil. [noa, e]

Par ailleurs, dans de nombreuses localités, *Justicia spicigera* est utilisée **mélangée à de l'indigo**.

Au Guatemala, dans la ville de Salcajá (Figure 1.24), les cuves d'indigo sont montées avec des branches fraîches de *sacatinta*, achetées au marché de la ville ou cultivées dans les jardins familiaux. Les proportions sont les suivantes : environ 45 kg de branches de *Justicia* pour 9 kg d'indigo en carreaux, importé du Salvador [Cardon, 2014].

Un procédé similaire de cuve aux *Justicia* et à l'indigo était utilisé par les tisserands de couvertures de laine dans la région de Momostenago (GT) (Figure 1.24) [Cardon, 2014].

À Tehuantepec (Oaxaca, MX) (Figure 1.24), Miguel Ordononez et sa fille teignaient le coton à froid avec de l'indigo et du *muicle*. D'une part, une cuve avec de la cendre de feuille de bananier, de la chaux et de l'indigo en poudre était préparée et laissée à macérer dans de l'eau pendant quatre jours. D'autre part, dans un autre récipient, le *muicle* était écrasé avec une pierre et macéré dans de l'eau; on le recouvrait et on le laissait fermenter pendant quatre jours. Après quoi, il était filtré et ajouté à la cuve d'indigo : le bain de teinture était prêt pour recevoir les fibres de coton à teindre [Terrazas Mata, 2012].

Une famille de teinturiers à l'indigo de Pinotepa de Don Luis (Oaxaca, MX) (Figure 1.24) explique aussi que *Justicia spicigera* était anciennement mélangée à des cuves d'in-

digo pour obtenir une couleur bleue plus soutenue [Klein, 1997].

Les raisons sont diverses. La première est de réduire le coût de fabrication lié à l'utilisation de l'indigo en le substituant en partie par *Justicia spicigera*, poussant localement et abondamment, étant donc une ressource peu chère [de Avila, 2009]. La seconde est liée au double rôle de colorant et agent réducteur que peut jouer *sacatinta* dans les cuves d'indigo : la fermentation des feuilles de *Justicia* accélérerait la réduction du bain de teinture, nécessaire pour la fixation de l'indigo sur les fibres, tout en ajoutant de la couleur [Terrazas Mata, 2012, Cardon, 2014]. On retrouve un procédé similaire en Europe avec l'utilisation du pastel dans les cuves d'indigo [Cardon, 2014].

De manière plus anecdotique, on peut citer l'usage de *Justicia spicigera* mélangée à de la cochenille dans la région de Tehuantepec (Mexique) pour obtenir du violet [Roquero, 2006].

On peut noter que lorsqu'il est utilisé seul, le colorant de *Justicia spicigera* est décrit comme peu résistant à la lumière [de Avila, 2009, Terrazas Mata, 2012, Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014].

Le colorant extrait de *Justicia spicigera* est ainsi employé pour l'obtention de teintes variées allant du rouge au bleu-violet passant par le vert, dépendantes des modes d'extraction et de préparation (pH du bain, ajout de mordant) mis en œuvre. Selon les pratiques, ce colorant est utilisé seul ou conjointement à de l'indigo.

3.2.4 Autres applications

Comme l'indigo, *Justicia spicigera* est aussi employée, du Guatemala à la Colombie pour l'azurage du linge après la lessive : une simple infusion à froid dans l'eau de rinçage permet de blanchir les tissus [Roquero, 2006, Cardon, 2014, Zarate Betancourt, 2016].

Plus récemment, dans le domaine agroalimentaire, en plus de son potentiel de colorant, l'extrait de *muicle* est utilisé pour la formulation d'aliments fonctionnels^{xxi} à forte teneur en anti-oxydants comme des yaourts, des gelées ou *tortillas* [Pavón-García et al., 2011, Jiménez Ortega et al., 2018, Alvarez-Poblano et al., 2020, Castro-Alatorre et al., 2021].

Les extraits de *Justicia spicigera* ont aussi été utilisés dans des voies vertes de synthèse de nano-particules et de nano-alliages d'argent [Bernardo-Mazariegos et al., 2019,

xxi. Les aliments fonctionnels (ou alicaments) sont des aliments qui offrent des avantages pour la santé au-delà de la nutrition de base, car ils contiennent des composants qui ont le potentiel d'améliorer la santé, physique ou mentale, et de réduire le risque de certaines maladies ou problèmes de santé.

Ruíz-Baltazar, 2020] ainsi que de nano-particules d'oxyde de zinc [Soto-Robles *et al.*, 2021].

3.3 Caractérisation physicochimique

3.3.1 Premières observations générales

Les premières observations chimiques sur l'extrait de *Justicia spicigera* ont été menées par François-Joseph Thomas, pharmacien et aide-major lors de son voyage au Mexique à la fin du 19^{ème} siècle [Thomas, 1866]. Il rapporte que lorsque les feuilles fraîches de *mohitli* sont mises dans de l'eau, on observe l'apparition d'une teinte rosée au bout de quelques minutes, virant au bleu après quelque temps. L'intensité de la couleur augmente au cours de la macération. Si les feuilles sont préalablement broyées, l'apparition de la couleur est bien plus rapide. Un liquide coloré similaire peut être également obtenu par infusion^{xxii} ou décoction^{xxiii} des feuilles. Après avoir retiré les feuilles, lorsque l'on examine à la lumière le liquide coloré obtenu, il apparaît bleu violet par transparence et rouge carmin par réflexion. Thomas propose un protocole pour extraire efficacement la matière colorante des feuilles : macération de feuilles fraîches pendant 24 h, filtration grossière de la solution, chauffage jusqu'à ébullition, de nouveau filtration, plus fine cette fois, puis évaporation de la solution jusqu'à siccité. La matière sèche obtenue peut-être ensuite réduite en poudre. Il note qu'en utilisant les mêmes feuilles, il faut répéter le protocole trois fois pour extraire toute la matière colorante. Pour ses propriétés tinctoriales, Thomas note une certaine proximité avec les bois de teinture ou l'orseille.

Il met en évidence à travers deux expériences la nécessité de présence d'oxygène pour que la coloration bleue violette soit observée (Figure 1.26). Premièrement, si la macération des feuilles est réalisée dans un récipient hermétique totalement rempli avec de l'eau préalablement bouillie pour la dégazer, le liquide présente une teinte verdâtre. Au bout de quelques heures, un précipité vert floconneux est repéré. Lorsque que la solution est exposée de nouveau à l'air libre et agitée, la teinte bleue violette réapparaît. Par ailleurs, si l'on verse goutte-à-goutte la solution colorée bleue violette dans du chlorure d'étain SnCl₂, agent réducteur, on remarque dans un premier temps, la décoloration complète de la teinture. Puis à force d'ajouts, une coloration verdâtre apparaît et un précipité vert foncé floconneux se forme.

xxii. Extraction consistant à verser sur les plantes de l'eau ayant été portée à ébullition.

xxiii. Extraction consistant à porter à ébullition de l'eau et des plantes.

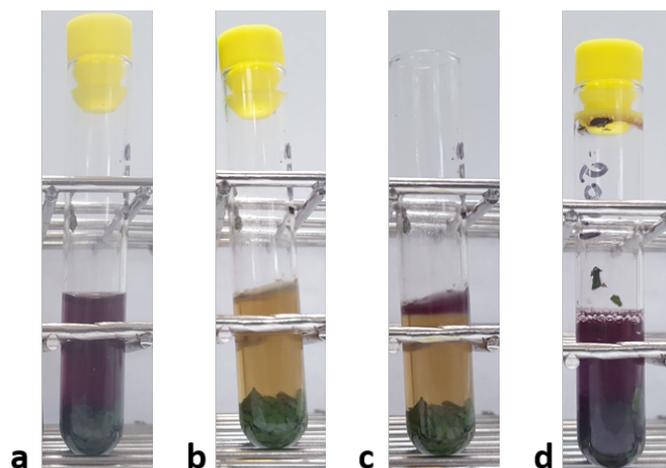


Figure 1.26 – Reproduction des observations de Thomas vis-à-vis de l'oxydo-réduction de la solution de *Justicia spicigera*.

- (a) Solution obtenue après une macération à l'air libre pendant une demi-journée (violet).
- (b) Solution obtenue après 6 jours bouchée hermétiquement (décoloration).
- (c) Solution obtenue après exposition à l'air libre pendant 10 min (coloration violette en surface).
- (d) Solution obtenue après agitation pendant 30 secondes (violet).

Par ailleurs, Thomas fait le rapprochement entre le comportement de la solution colorée de *Justicia spicigera* et celui de la teinture de tournesol (ou *litmus* en anglais) en présence d'acides ou de bases. La teinture de tournesol est un indicateur coloré de pH composé d'un mélange de composés colorés extraits de lichens dont la majorité contiennent le chromophore 7-hydroxy-phénoxazin-3-one. Dans des conditions acides, la forme protonée rouge est prédominante ; pour des valeurs de pH supérieures à 7, c'est la forme déprotonée, bleue, qui prédomine. La forme neutre est quant à elle violette (Figure 1.27) [Beecken *et al.*, 2003].

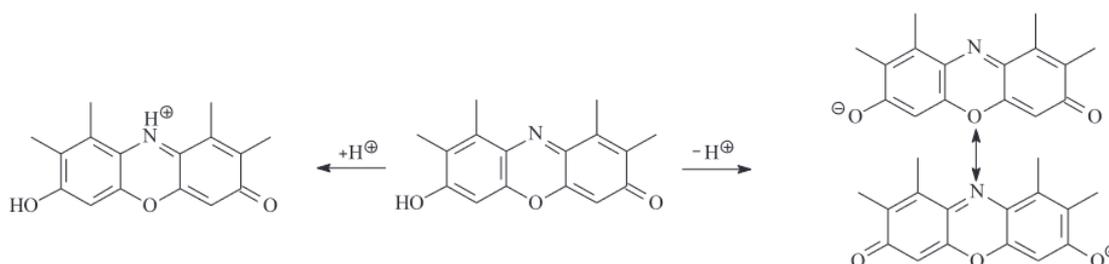


Figure 1.27 – Équation acido-basique pour le chromophore 7-hydroxy-phénoxazin-3-one, extrait de [Beecken *et al.*, 2003].

Thomas propose un mécanisme de formation du colorant à partir d'un précurseur incolore présent dans les feuilles, la *mohitline* qui se dissoudrait et s'oxyderait lors la mise en contact avec de l'eau pour donner la *mohitléine*. Elle s'oxyderait à son tour en acide *mohitlique* qui, combiné avec les bases des sels alcalins de l'eau ou de la plante

produirait la matière colorante bleue (Figure 1.28.)

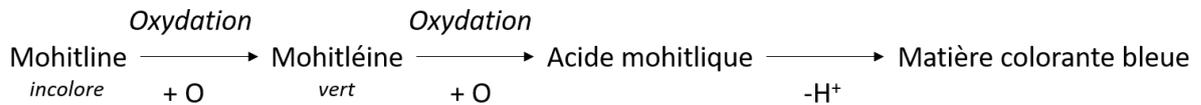


Figure 1.28 – Mécanisme de formation du colorant de *Justicia spicigera*, d'après les descriptions de [Thomas, 1866].

Un peu plus tard, Parkin complète les observations de Thomas [Parkin, 1905]. Ses commentaires s'appliquent aussi bien à l'espèce *Justicia spicigera* (dans le texte, *Jacobinia mohintli*) qu'à *Justicia tinctoriella* (*Jacobinia tinctoria*)^{xxiv}. Comme Thomas, il décrit la couleur de l'extrait obtenu comme violette en lumière transmise et rouge en lumière réfléchie ; il ajoute dans sa description la notion d'impression de fluorescence de la solution. Il note également la variation de couleur selon le pH : si un ajout d'acide « prive la solution d'une partie de sa couleur », l'ajout d'alcalin fait virer la solution au bleu, voire au vert. Les agents réducteurs comme le chlorure d'étain, ainsi que les micro-organismes en absence d'oxygène, décolorent la solution. La couleur originale revient en exposant de nouveau la solution à de l'oxygène.

Selon lui, le colorant n'existerait pas tel quel dans la plante vivante. Il se formerait par réaction enzymatique et la présence d'oxygène serait nécessaire à sa formation. Il fait le parallèle avec la formation de l'indigotine : les deux précurseurs incolores dans les feuilles des plantes à indigo, l'indican et l'isatan B, subissent lors de l'extraction une hydrolyse enzymatique pour former deux entités d'indoxyl qui, par oxydation, donnent l'indigotine (Figure 1.29). Ainsi, par analogie, il suggère que le chromogène de *Justicia spicigera* soit aussi un glycoside. Ce dernier et son enzyme se trouveraient dans deux endroits différents au sein des cellules vivantes de la plante (par exemple, dans le protoplasme et la sève) et quand la cellule est détruite, les deux entités rentreraient en contact. Il se formerait d'abord un intermédiaire incolore qui se transformerait en colorant lors de son exposition à l'air (possiblement assisté par l'action d'un oxydase). La différence notable est la solubilité du colorant bleu obtenu : alors que l'indigotine est insoluble dans l'eau, la matière colorée extraite des *Justicia* est soluble.

xxiv. Pour rappel, espèces botaniques souvent confondues, que l'on trouve sous l'appellation commune *sacatinta* et dont les usages en teinture sont proches.

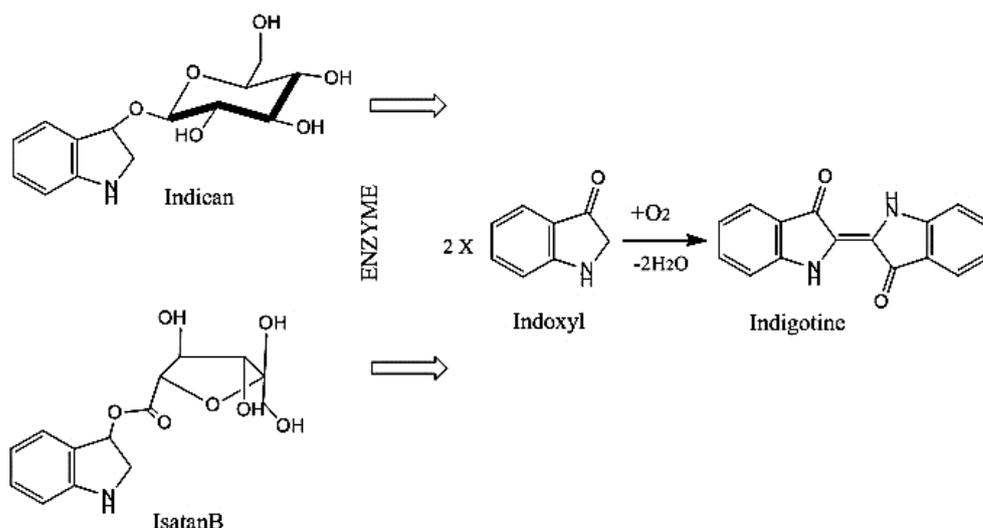


Figure 1.29 – Formation de l'indigotine à partir des précurseurs indican et isatan B, extrait de [Raji *et al.*, 2020].

Ces diverses observations seront reprises et approfondies lors du travail expérimental réalisé sur l'extrait de *Justicia spicigera* dans le cadre de cette thèse.

3.3.2 Études phytochimiques

L'extrait de *Justicia spicigera* étant largement utilisé en médecine traditionnelle, de nombreuses études pharmacologiques ont été menées, alors que les recherches phytochimiques sont, quant à elles, plus rares. Plusieurs ont, tout de même, été menées afin de relier les propriétés pharmacologiques/médicinales de l'extrait à des molécules bioactives. De ces études, on peut lister la présence des composés suivants.

Tout d'abord, plusieurs flavonoïdes ont été identifiés : des flavonols et flavanols, et leurs glycosides (Figure 1.30). La kaempféritrine (3,7-dirhamnoside de kaempférol) et des tri-rhamnosides de kaempférol ont été identifiés dans des extraits éthanoliques [Euler et Alam, 1982, Dominguez *et al.*, 1990, Ortiz-Andrade *et al.*, 2012]. L'héspéridine, la naringénine et le kaempférol ont été détectés dans des extraits chloroformiques de *Justicia spicigera* [Esquivel Gutierrez, 2013].

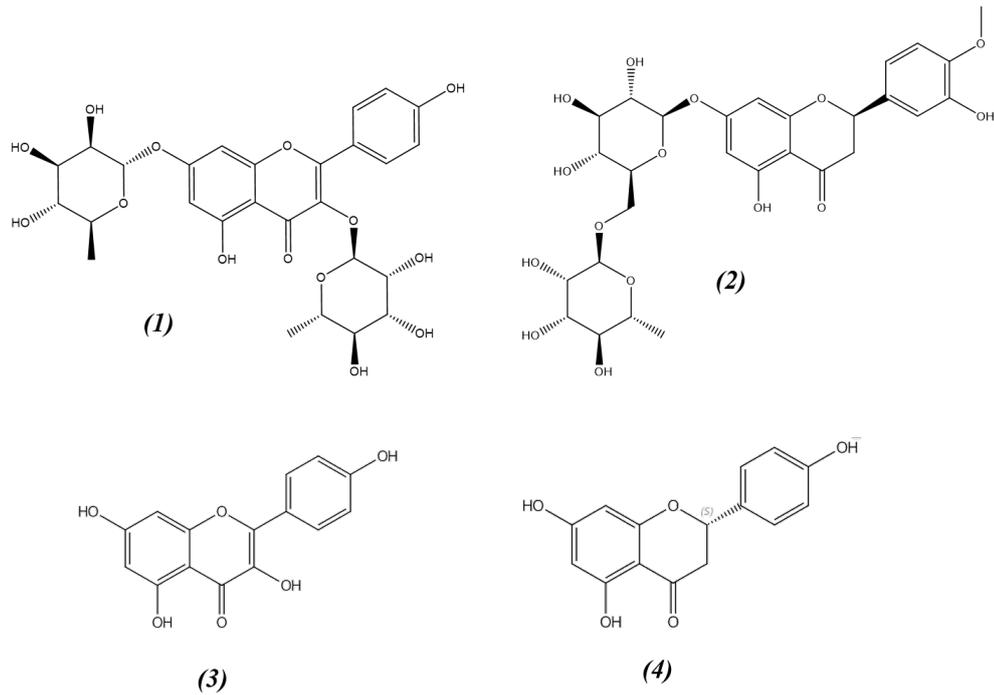


Figure 1.30 – Flavonoïdes identifiés dans les extraits de *Justicia spicigera*.
 (1) Kaempféritrine (2) Hespéridine (3) Kaempférol (4) Naringénine.

Le β -sitosterol et un de ses 3-O-glucoside, ainsi que l'allantoïne et la cryptoxanthine l'ont été mis en évidence dans des extraits à base d'hexane-isopropyle-éther-méthanol (Figure 1.31) [Dominguez *et al.*, 1990].

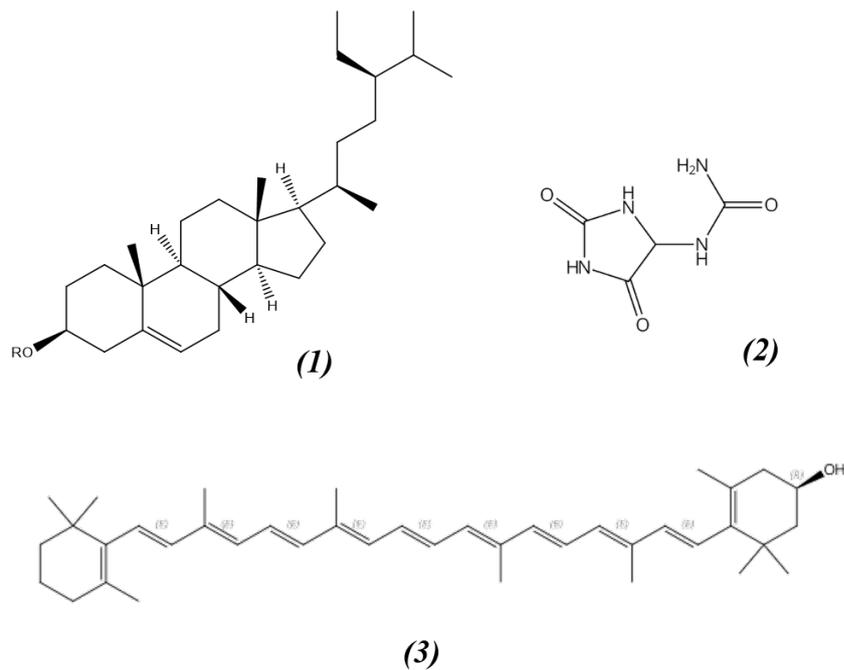


Figure 1.31 – Composés identifiés par [Dominguez *et al.*, 1990] dans les extraits de *J. spicigera*.
 (1) R = H : β -sitosterol et R = Glu : 3-O-glucoside de β -sitosterol (2) Allantoïne (3) Cryptoxanthine.

Des dérivés du 2-amino-4,5-diméthoxyphénol (Figure 1.32) ont été détectés dans des extraits hexane-acétate d'éthyle de *J. ghiesbreghtiana* (synonyme de *Justicia spicigera*) [Ismail *et al.*, 1998, Lorenz *et al.*, 1999].

Le composé isolé (1), incolore, est reporté comme instable; son produit de dégradation est bleu-violet. La perte de deux hydrogènes constatés dans les spectres de masse et les déplacements chimiques en RMN suggèrent la formation du composé (3) (Figure 1.32). Des analyses plus poussées sur ce composé coloré pour confirmer sa structure n'ont pas pu être réalisées, car il était lui même instable.

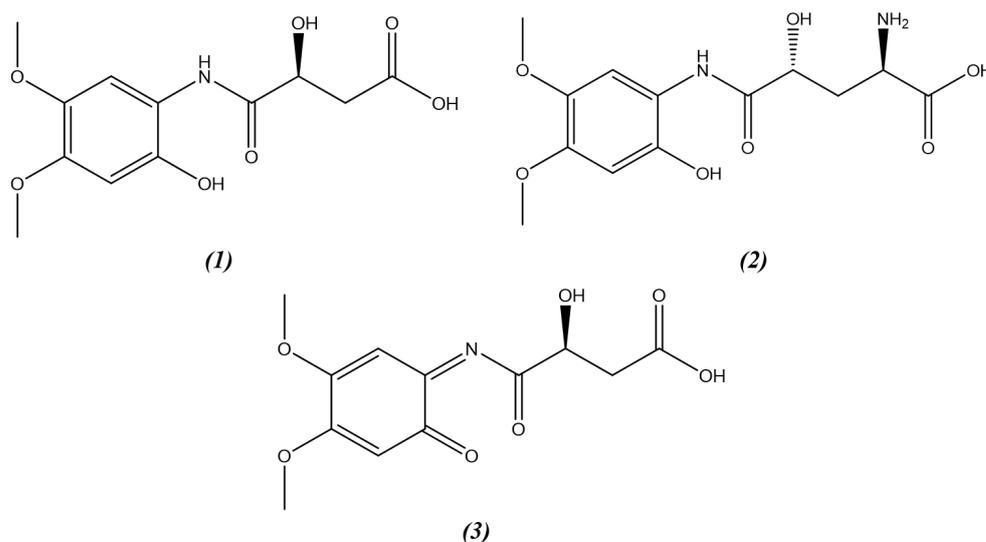


Figure 1.32 – Dérivés du 2-amino-4,5-diméthoxyphénol identifiés dans les extraits de *J. ghiesbreghtiana* par [Ismail *et al.*, 1998, Lorenz *et al.*, 1999].

- (1) Acide 4-amino-3-hydroxy-N-(2-hydroxy-4,5-diméthoxyphényl)-4-oxobutanoïque
 (2) Justiciamide, 4-hydroxy-N-(2-hydroxy-4,5-diméthoxyphényl)-L-glutamine
 (3) Structure hypothétique du produit de dégradation coloré de (1).

Dans des extraits éthanol-eau de feuilles fraîches, l'azulène, l'eucalyptol et le phytol ont été identifiés par GC-MS comme composés majoritaires. Le phytol et les acides linoléique et oléique sont les principaux constituants détectés dans les feuilles séchées [Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2017] (Figure 1.33).

La procumbenoside B (Figure 1.34) a été reportée dans des extraits méthanoliques [Perez Gutierrez *et al.*, 2018].

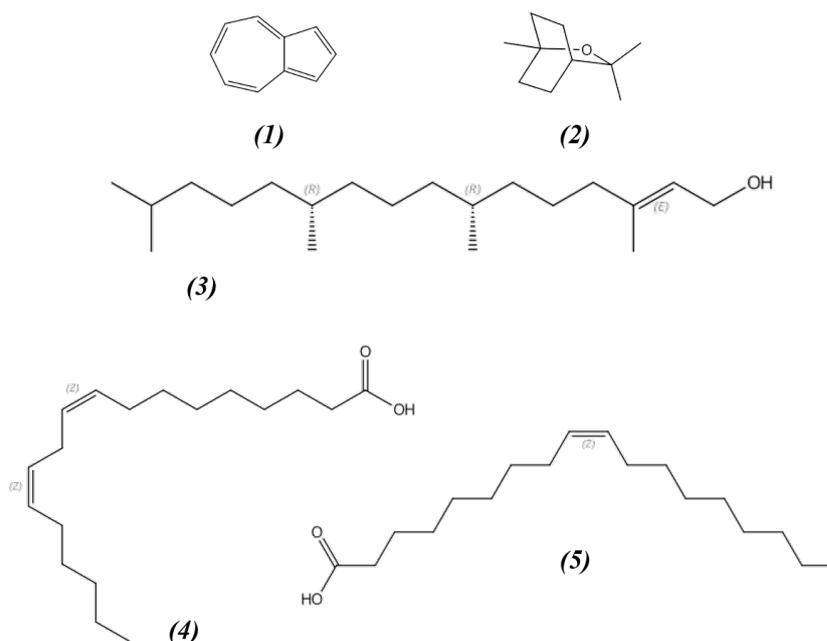


Figure 1.33 – Composés identifiés par [Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2017] dans les extraits de *Justicia spicigera*.
 (1) Azulène (2) Eucalyptol (3) Phytol (4) Acide linoléique (5) Acide oléique.

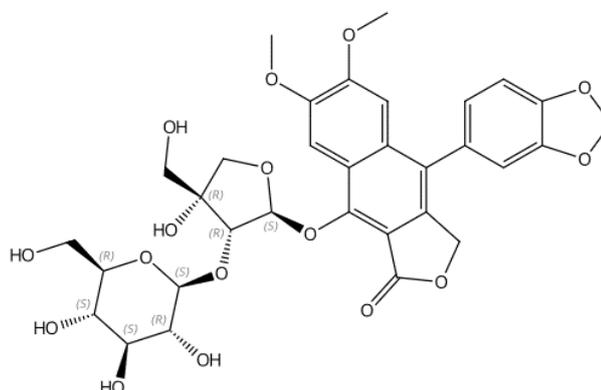


Figure 1.34 – Procumbenoside B.

Aucun de tous ces composés cités ne sont cependant responsables de la coloration bleue-violette de l'extrait.

Certaines études se sont concentrées plus précisément sur la caractérisation des composés colorés. Des analyses des extraits de *J. spicigera* par HPLC-DAD et par spectroscopie Raman ont révélé l'absence d'indigotine dans sa composition chimique [Ushida *et al.*, 2005, Roquero et Nowik, 2006, Terada, 2008, Casanova-González *et al.*, 2012].

L'hypothèse de l'appartenance du principe coloré à la famille des anthocyanes a également été formulée [Watson, 2005, Roquero et Nowik, 2006, Pavón-García *et al.*, 2011, Espinosa-Morales *et al.*, 2012]. Alors que [Awad *et al.*, 2015] semblent identifier

une série de 12 anthocyanes extraits des feuilles avec de l'éthyl-acétate, [Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2017] révèlent l'absence d'anthocyanes monomériques dans les extraits aqueux et éthanoliqes de *J. spicigera*.

Ainsi, à notre connaissance, les composés colorés responsables de la coloration bleue-violette dans l'extrait de *Justicia spicigera* étaient encore non identifiés au début du projet.

3.4 Les autres espèces *Justicia* colorantes

D'autres espèces du genre *Justicia* sont utilisées à travers le monde pour produire des colorants. Nous avons cherché à savoir si les molécules colorantes étaient caractérisées pour ces espèces.

Justicia betonica fait partie des plantes tinctoriales utilisées en Uganda [Wanyama et al., 2010, Wanyama et al., 2010]. Un colorant bleu-violet est extrait des feuilles. Des tests phytochimiques standards ont permis de mettre en évidence la présence d'alcaloïdes, flavonoïdes, glycosides, protéines et tannins dans les extraits aqueux et méthanoliques [Manokari et al., 2019]. Quatre glycosides de triterpénoïdes (justiciosides A-D) et quatre alcaloïdes dérivés de quindolines ont été identifiés dans les feuilles de *J. betonica* par [Kanchanapoom et al., 2004, Subbaraju et al., 2004]. Les composés responsables de la coloration bleue ne semblent néanmoins pas clairement identifiés.

Le colorant bleu-violet extrait des feuilles et racines de *Justicia wynaadensis* (Nees) T. Anderson est utilisé dans la préparation d'un dessert consommé lors de la période des moussons dans la région de Karanataka (Inde). La présence de flavonoïdes (dont des anthocyanes), d'autres composés phénoliques, de saponines et de protéines dans les extraits aqueux obtenus à partir de feuilles et racines fraîches a été révélée lors de tests phytochimiques standards [Nigudkar et al., 2014]. La coloration violette de l'extrait brut, correspondant à un maximum d'absorption $\lambda_{max} = 589$ nm, pourrait être attribuée à la présence d'anthocyanes [Patil et al., 2015], mais aucune structure n'a été proposée.

Les feuilles fraîches de *Justicia secunda* Vahl, originaire d'Amérique du Sud, sont bouillies jusqu'à l'obtention d'une coloration violette intense. Elles sont notamment consommées comme boisson tonifiante dans plusieurs pays africains, comme le Ghana, la Côte d'Ivoire, le Nigeria ou le Congo [Koffi et al., 2013, Anyasor et al., 2020, Yamoah et al., 2020]. La coloration rose à violette, caractéristique de l'extrait aqueux de *J. secunda*, pourrait être attribuée à la présence de polyphénols tels que les anthocyanes ou tannins [Anyasor et al., 2020]. Deux glycosides de lutéoline, un trihexoside et un di-

pentoside, sont identifiés comme les flavonoïdes majoritaires dans les extraits aqueux de *J. secunda* Vahl [Koffi *et al.*, 2013].

Les feuilles de *Justicia chlorostachya* Leonard, endémique de la région de Chocó (Colombie), permettent de teindre, en présence de mordant, diverses fibres végétales dans des couleurs et teintes foncées [Pino Chala *et al.*, 2003]. Les tests standards phytochimiques d'extraits éthanoliques de *J. chlorostachya* ont mis en évidence la présence de métabolites des familles suivantes : alcaloïdes, flavonoïdes, saponines et stéroïdes [Pito-Benitez et Cordoba C., 2007, Chiluiza, 2011].

Pour finir, deux espèces de *Justicia*, originaires d'Amérique Centrale, *Justicia tinctoriella* Bennet & Raizada et *Justicia macrantha* Benth. (synonymes botaniques et distributions géographiques en Annexe C) sont utilisées pour l'obtention d'un colorant proche de celui extrait de *Justicia spicigera* (Figure 1.35).



(a) Colorant obtenu avec *Justicia spicigera* et *Justicia tinctoriella*.

(b) Colorant obtenu avec *Justicia macrantha*

**Figure 1.35 - Extraction du colorant de trois espèces de *Justicia* par Jean-Louis Dulaar [Dulaar,].
©Jean-Louis Dulaar**

Justicia tinctoriella (ou *cuaja tinta*^{xxv}) donne une solution bleue lors d'une extraction dans de l'eau chaude qui vire au rouge lors de l'ajout d'acides, comme le *litmus* [Standley, 1938]. Elle est utilisée en teinture de la même façon que *Justicia spicigera*, sans distinction de l'espèce [Cardon, 2014]. Cette espèce est également utilisée pour l'azurage du linge [Standley, 1938, Cardon, 2014]. Il est mentionné que *Justicia tinctoriella* était très utilisée en Amérique Centrale dès l'époque préhispanique, mais que lors de leur retour du Nouveau Monde, les chroniqueurs européens n'ont pas décrit cette espèce; cela peut être dû au fait qu'ils n'arrivaient pas à la différencier de *Justicia spicigera* [Cardon, 2014].

xxv. Mais aussi azul de mata, azul, sacatinta [Standley, 1938], tinta montes [Cardon, 2014], etc.

L'utilisation de *Justicia macrantha*^{xxvi} semble moins répandue que les deux autres espèces [Standley, 1938, Malaret, 1959]. Aucune description précise concernant ses usages, passés ou actuels, n'a été trouvée.

Nous constatons que *Justicia spicigera* n'est pas la seule espèce du genre *Justicia* à produire un colorant bleu-violet. Pour plusieurs espèces, la présence d'anthocyanes est suggérée pour expliquer cette coloration, mais aucune structure n'est clairement identifiée.

Comme plusieurs espèces de *Justicia* semblent être la source d'un colorant similaire, il n'est pas exclu qu'elles soient aussi à l'origine des caractéristiques spectrales enregistrées dans les peintures brunes du *Codex Borbonicus*. Il aurait été intéressant de pouvoir se procurer des spécimens de chacune de ces espèces, surtout celles dont les distributions géographiques sont proches de celle de *Justicia spicigera* afin de comparer leurs compositions et leurs signatures spectrales. Cela aurait permis d'évaluer la spécificité de la signature spectrale enregistrée sur les peintures du *Codex Borbonicus* à l'espèce *Justicia spicigera*.

Malheureusement, au cours de cette thèse, nous n'avons pu avoir accès qu'à l'espèce *Justicia spicigera* qui semble être cependant celle qui est majoritairement employée. Nous avons donc centré notre étude sur sa caractérisation.

xxvi. Ou *pata de gallo, sacatinta, azul* [Standley, 1938]

4 Bilan du chapitre

La caractérisation physico-chimique des matières colorantes du *Codex Borbonicus*, manuscrit aztèque du 16^{ème} siècle, par des techniques spectroscopiques non-invasives a mis en évidence l'utilisation majoritaire de colorants organiques naturels. Certains d'entre eux, comme la cochenille ou le bleu maya sont couramment employés dans des codices précolombiens, alors que d'autres sont bien plus rares, comme l'extrait de *Commelina coelestis*, voire jamais reportés auparavant dans un codex mésoaméricain, comme celui de *Justicia spicigera*.

Le colorant extrait de *Justicia spicigera* a hypothétiquement été identifié dans les peintures brunes de la partie II du *Codex Borbonicus* grâce à l'acquisition d'un signal Raman caractéristique. Sa comparaison avec des spectres publiés dans la littérature pour des colorants mésoaméricains a permis de remonter à la source végétale du colorant.

Cependant, ce colorant est très peu caractérisé du point de vue de sa composition chimique. Les composés responsables de la coloration de l'extrait ne sont pas connus et il n'est donc pas possible d'assurer que les composés à l'origine de la signature spectrale détectée soit spécifique à cette espèce. Or, cela pourrait remettre en cause l'identification faite.

Par ailleurs, cette plante tinctoriale est traditionnellement utilisée en Amérique Centrale pour la teinture de textiles en bleu-violet. Les couches du *Codex Borbonicus* ont pourtant bien été peintes en brun à dessein à l'origine. La couleur apparente n'est, par exemple, pas l'effet d'une dégradation du colorant. En effet, les éléments graphiques de la seconde partie du manuscrit pour lesquels a été identifié le signal de *Justicia spicigera* sont la peau des prêtres, les peintures corporelles des dieux, ou des attributs de leur parure, et sont supposés être bruns. Ces éléments sont notamment communs à la première partie du manuscrit ou à d'autres manuscrits précolombiens, comme le *Codex Borgia* ou *Codex Cospi* [Miliani et al., 2012], dans lesquels ils présentent une apparence similaire malgré des sources colorantes distinctes (Figure 1.36). Leur description dans les sources historiques confirme également ces nuances de couleur. Par exemple, lors des rituels, les prêtres enduisaient leur corps avec une préparation sombre, à base de cendres ou suie, et le maquillage du dieu *Tezcatlipoca* consiste en des bandes horizontales sombres [Anders et al., 1991, Vauzelle, 2014].



**Figure 1.36 – Représentation du dieu Tezcatlipoca dans les deux parties du *Codex Borbonicus*.
©Assemblée Nationale**

L'identification de *Justicia spicigera* dans un manuscrit mésoaméricain est à notre connaissance unique et aucune source historique ne mentionne son mode de préparation pour obtenir des peintures brunes.

Plusieurs questionnements ont ainsi motivé l'analyse approfondie en laboratoire du colorant extrait des feuilles de *Justicia spicigera*, développée dans le présent travail de thèse.

Quelles sont les structures des molécules responsables de la coloration de l'extrait de *Justicia spicigera*? Sont-elles à l'origine des signatures spectrales enregistrées *in situ* pour les couches brunes de la seconde partie du *Codex Borbonicus*? Sont-elles spécifiques à l'espèce *Justicia spicigera*? Quel est le mode de préparation du colorant pour obtenir des peintures brunes à partir de l'extrait bleu-violet? Le travail décrit dans la suite de ce mémoire va nous permettre de formuler quelques réponses.

Chapitre 2

Techniques analytiques : principes et équipements

La caractérisation moléculaire du colorant de *Justicia spicigera* a été réalisée selon l'approche classiquement adoptée pour l'analyse de mélanges moléculaires complexes, visant à séparer puis caractériser les différents constituants du mélange.

Par ailleurs, des échantillons modèles de couches de peinture fabriqués à partir du colorant extrait de *Justicia spicigera* ont été caractérisés afin de relier leurs signatures spectrales à des constituants moléculaires du mélange.

Ce chapitre présente les techniques analytiques mises en œuvre dans cette démarche. Un bref rappel de la théorie des différentes méthodes ainsi que les instruments utilisés et les conditions d'analyses y sont décrits.

Sommaire

1	Principes théoriques	53
1.1	Techniques séparatives	54
1.1.1	La chromatographie en phase liquide	54
1.1.2	Grandeurs chromatographiques	55
1.1.3	Choix des systèmes chromatographiques	57
1.1.4	Séparation multidimensionnelle	59
1.2	Techniques de caractérisation	62
1.2.1	Spectroscopies électroniques	63
1.2.2	Spectroscopies vibrationnelles	67
1.2.3	Spectroscopies magnétiques (ou de spin)	69
1.2.4	Spectrométrie de masse	72
2	Matériel et méthodes	75

2.1	Matériel	75
2.1.1	Matériel végétal	75
2.1.2	Produits chimiques	76
2.2	Préparations des échantillons	77
2.2.1	Extraction du colorant	77
2.2.2	Préparation des gammes en pH	77
2.2.3	Préparation des dépôts d'extrait aqueux coloré sur support	77
2.2.4	Préparation du colorant en poudre	78
2.2.5	Préparation des peintures	78
2.2.6	Réextraction du colorant	78
2.3	Chromatographie liquide à haute performance	79
2.3.1	Chromatographie analytique	79
2.3.2	Chromatographie préparative	80
2.3.3	Volumes des systèmes	81
2.4	Spectrométrie de masse	83
2.4.1	Spectrométrie de masse à basse résolution simple MS	83
2.4.2	Spectrométrie de masse à basse résolution tandem MS-MS	84
2.4.3	Spectrométrie de masse à haute résolution - FT-ICR-MS	84
2.5	Spectroscopies d'absorption et de fluorescence UV-Vis	85
2.5.1	Spectroscopie d'absorption UV-Vis en transmission	85
2.5.2	Spectroscopie d'absorption UV-Vis en réflexion diffuse (par fibre optique)	85
2.5.3	Spectroscopie de fluorescence	86
2.6	Spectroscopies vibrationnelles	87
2.6.1	Spectroscopie d'absorption infrarouge	87
2.6.2	Spectroscopie de diffusion Raman	87
2.7	Spectroscopie RMN	87
2.8	Vieillissements artificiels à la lumière	88
2.8.1	Enceinte de vieillissement	88
2.8.2	Micro-décolorimétrie (MFT)	88
2.9	Photographies sous UV	88

1 Principes théoriques

Les colorants organiques naturels sont des mélanges moléculaires complexes. On y retrouve souvent plusieurs espèces colorées, de la même famille de molécules ou de familles distinctes, ainsi que d'autres constituants ne participant pas à la coloration de l'extrait. L'analyse chimique de tels mélanges complexes se fait en deux étapes : une phase de séparation des différents constituants du mélange, puis leur caractérisation avec comme objectif final l'identification de leur structure moléculaire (Figure 2.1). Si dans certains cas, les molécules sont connues et qu'une simple comparaison à des standards permet de les identifier, dans d'autres une élucidation structurale approfondie est nécessaire pour aboutir à leur caractérisation.

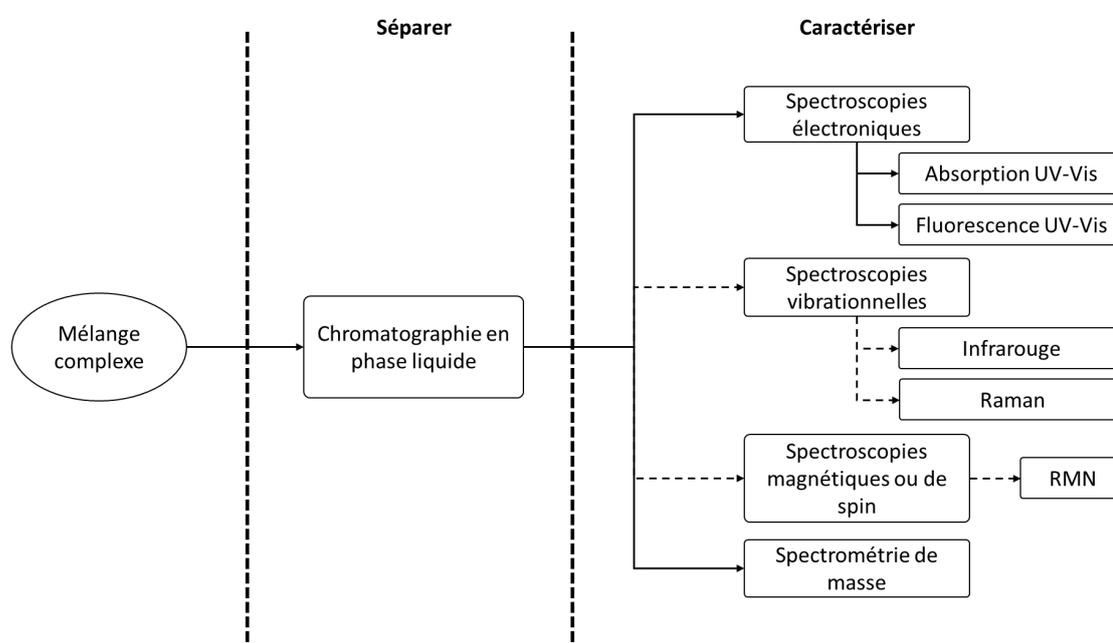


Figure 2.1 - Principe de caractérisation d'un mélange moléculaire complexe.

N.B. Seules les techniques utilisées dans cette thèse sont représentées ici.

Légende : traits pleins pour les techniques qui peuvent être directement couplées à la HPLC.

Traits pointillés pour celles nécessitant la purification préalable des analytes.

Plusieurs techniques séparatives sont disponibles : les chromatographies en phase gazeuse, en phase liquide, en fluide supercritique, l'électrophorèse capillaire. La technique la plus couramment utilisée pour la séparation des colorants est la chromatographie en phase liquide (HPLC), dont le principe est détaillé dans la partie 1.1.

Une fois séparés, les constituants sont analysés par des techniques de caractérisation moléculaire, que l'on peut diviser en plusieurs groupes : les spectroscopies électroniques (absorption et émission de fluorescence UV-Vis), vibrationnelles (absorption

infrarouge et diffusion Raman) et magnétiques (résonance magnétique nucléaire), ainsi que la spectrométrie de masse. Leurs principes théoriques de fonctionnement seront présentés dans la partie 1.2.

Certaines d'entre elles peuvent être directement couplées à la chromatographie en phase liquide (traits pleins dans la Figure 2.1), alors que d'autres nécessitent une purification préalable des composés d'intérêt pour être mises en œuvre (traits pointillés dans la Figure 2.1).

1.1 Techniques séparatives

La première étape dans l'analyse d'un mélange complexe est la séparation des composés. Pour la séparation des colorants, qui sont pour la plupart polaires et hydrosolubles, la chromatographie en phase liquide s'impose comme technique de choix [Degano *et al.*, 2009, Nowik, 2013, Pauk *et al.*, 2014]. Leur faible volatilité et stabilité à haute température limitent, par exemple, l'application de la chromatographie en phase gazeuse [Cserhádi, 2007].

1.1.1 La chromatographie en phase liquide

La chromatographie en phase liquide (LC ou HPLC) repose sur la différence de distribution des solutés entre deux phases non miscibles en contact : la phase stationnaire, contenue dans une colonne et la phase mobile, la traversant. Selon l'affinité des solutés pour la phase stationnaire et pour la phase mobile, dépendant de leurs propriétés intrinsèques, ils parcourent la phase stationnaire à des vitesses différentes, menant à leur séparation.

On distingue la chromatographie analytique et la chromatographie semi-préparative ou préparative (prep-LC)ⁱ. Les deux techniques ont pour objectif la séparation des composés d'un mélange, mais si la finalité de la chromatographie analytique est leur identification, voire leur quantification, celle de la chromatographie préparative est le fractionnement du mélange ou la purification d'un ou de plusieurs produits. Les fractions ou les produits collectés peuvent être utilisés à diverses fins : tests d'activité biologique, formulation, synthèse, caractérisation, test de stabilité, etc.

i. La différence entre les échelles semi-préparative et préparative réside dans la dimension des colonnes utilisées : classiquement, de 21,2 à 30 mm de diamètre interne pour la semi-préparative et de 50 à 100 mm pour la préparative [Schulenberg-Schell et Tei, 2015]. Le terme préparatif est souvent employé de façon générique pour décrire toutes les séparations à ces deux échelles, en opposition à l'échelle analytique. Ainsi, par simplicité, dans ce mémoire, nous n'avons pas fait la distinction, et seul le terme préparatif a été employé.

Les performances des séparations chromatographiques dépendent de l'interaction entre les solutés, la phase mobile et la phase stationnaire (Figure 2.2). La sélection du système chromatographique est très grandement influencée par ces interactions. Les solutés sont imposés par la nature de l'échantillon analysé, mais les phases mobile et stationnaire doivent être choisies de façon à optimiser la séparation.

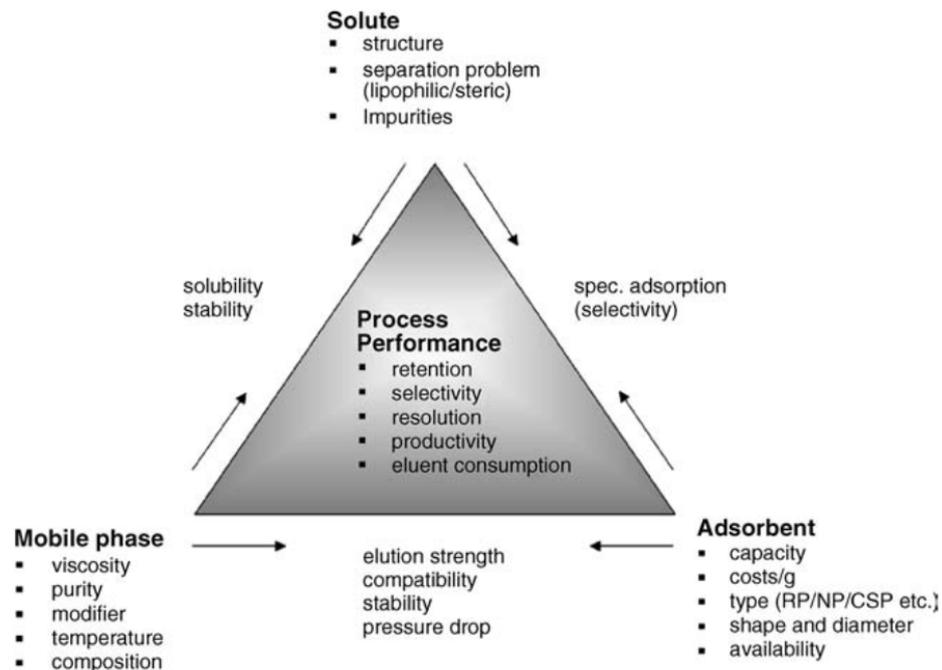


Figure 2.2 – Interactions entre les solutés, la phase stationnaire et la phase mobile, extrait de [Schulte *et al.*, 2012].

1.1.2 Grandeurs chromatographiques

Les grandeurs utilisées pour caractériser une méthode de séparation chromatographique sont les suivantes. Elles sont calculées à partir des caractéristiques des pics, supposés gaussiens, détectés en sortie de colonne de séparation ⁱⁱ.

- Le facteur de **rétenion** k est défini selon :

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.1)$$

avec t_R le temps de rétenion d'un composé et t_0 le temps mort de la colonne ⁱⁱⁱ.

ii. Les types de détecteurs utilisés dans le cadre de cette thèse sont détaillés dans la partie 1.2.

iii. Correspondant au temps d'un composé non retenu.

- La **sélectivité** α permet de caractériser la distance séparant le sommet de deux pics consécutifs et est définie par :

$$\alpha_{1,2} = \frac{t_{R_2} - t_0}{t_{R_1} - t_0} = \frac{k_2}{k_1} \quad (2.2)$$

avec t_{R_1} et t_{R_2} les temps de rétention de deux composés consécutifs, k_1 et k_2 leurs facteurs de rétention et t_0 le temps mort de la colonne.

- La **résolution**, R_s , mesure la séparation entre deux pics selon :

$$R_s = 1,18 \cdot \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\delta_1 + \delta_2} = 0,59 \cdot \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\delta_{moy.}} \quad (2.3)$$

avec t_{R_1} et t_{R_2} les temps de rétention de deux composés consécutifs, δ_1 et δ_2 les largeurs à mi-hauteur des pics correspondants et $\delta_{moy.}$ la moyenne des largeurs à mi-hauteur.

Plus la résolution est grande, meilleure est la séparation. Dans l'approximation de pics gaussiens, on estime un retour à la ligne de base entre les deux pics pour une résolution de 1,5.

- Le nombre de plateaux théoriques N permet de mesurer l'**efficacité** du système chromatographique, dont dépend l'élargissement des pics. Il est calculé, pour un soluté donné, selon :

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2 \quad (2.4)$$

avec t_R le temps de rétention du pic et δ la largeur du pic à mi-hauteur.

Pour pouvoir comparer entre elles des colonnes de longueurs différentes, la hauteur équivalente à un plateau théorique, HEPT, a été introduite :

$$HEPT = \frac{L}{N} \quad (2.5)$$

avec N le nombre de plateaux théoriques et L la longueur de la colonne.

Afin d'élargir la comparaison pour des colonnes remplies avec des particules de phase stationnaire de nature et de dimension différentes, la hauteur de plateau réduite, h , a été définie comme :

$$h = \frac{HEPT}{d_p} = \frac{L}{N \cdot d_p} \quad (2.6)$$

avec HEPT la hauteur équivalente à un plateau théorique, N le nombre de plateaux théoriques, L la longueur de la colonne et d_p le diamètre des particules constituant la phase stationnaire.

Au final, en supposant des pics voisins dont les largeurs à la base sont proches, l'expression suivante, dite de Purnell, permet de relier la **résolution** aux trois paramètres chromatographiques principaux que sont l'**efficacité** N , la **sélectivité** α et la **rétenion** k :

$$R_s = \frac{\sqrt{N_2}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{k_2 + 1} \quad (2.7)$$

l'indice 2 se rapportant au composé le plus retenu.

Comme on peut le voir sur la Figure 2.3, le critère ayant le plus d'influence sur la résolution est la sélectivité α . Ce sera donc le premier critère à optimiser. Pour ce faire, il faudra choisir pertinemment phases stationnaire et mobile.

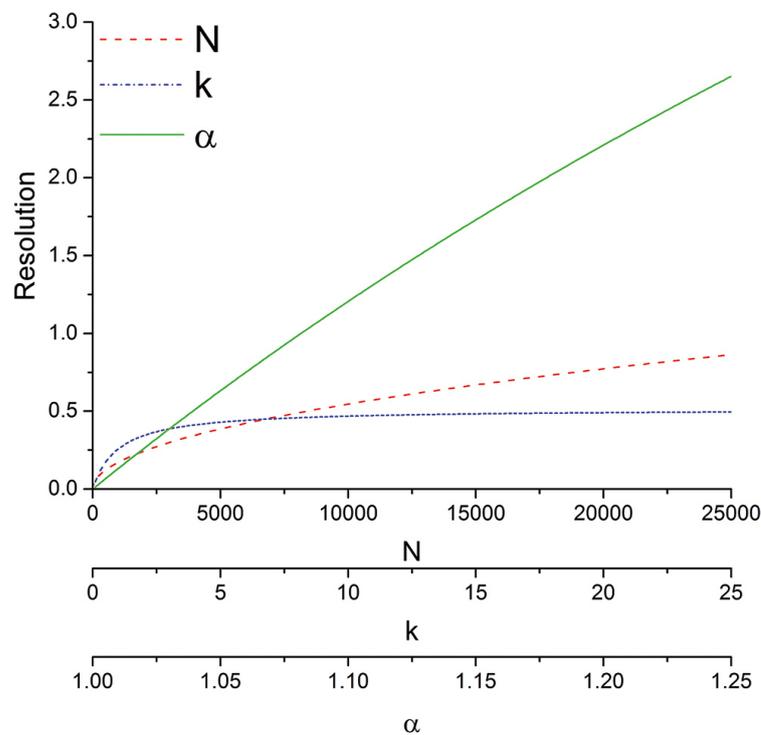


Figure 2.3 - Résolution (R) en fonction de l'efficacité (N), de la rétention (k) et de la sélectivité (α).
Extrait de [Teutenberg *et al.*,].

1.1.3 Choix des systèmes chromatographiques

En chromatographie en phase liquide, on distingue deux modes selon la polarité respective des phases stationnaire et mobile. La chromatographie de partage sur phases polaires ou à polarité de phases normale (*normal phase*, NP) met en jeu une phase stationnaire polaire et une phase mobile plutôt apolaire; la chromatographie de partage sur phases apolaires ou à polarité de phases inversée (*reverse* ou *reversed phase*, RP) utilise une phase stationnaire apolaire et une phase mobile polaire.

Du fait de la structure des molécules colorées, la RP-HPLC est très majoritairement utilisée pour l'analyse des colorants naturels [Cserhádi, 2007, Nowik, 2013, Pauk *et al.*, 2014, Zasada-Kłodzińska *et al.*, 2020].

La plupart des séparations est réalisée sur des phases dont le diamètre des particules est de 3 ou 5 μm ^{iv}. Les phases stationnaires à base de silice greffée par des chaînes octadécyles (C18) sont les plus couramment utilisées pour la séparation des colorants naturels. On rencontre aussi, mais plus rarement, l'utilisation de phases à base de silice greffées par des chaînes plus courtes (C4 ou C8) comme pour l'analyse de glycosides de flavonoïdes ou d'acides hydrobenzoïques [Degano *et al.*, 2009, Nowik, 2013, Pauk *et al.*, 2014].

Concernant la phase mobile, les éluants les plus courants sont des mélanges eau-acétonitrile ou eau-méthanol. On peut noter les avantages à employer l'acétonitrile plutôt que le méthanol, que sont : une absorbance moins importante dans la gamme 200-275 nm, avec une longueur d'onde de coupure^v plus courte^{vi} et une plus faible viscosité^{vii}, entraînant de moins grandes pressions dans le système. Cependant, son prix est plus élevé que celui du méthanol. Ceci peut représenter un frein à son utilisation lorsque l'on est amené à considérer une grande quantité de solvant (notamment en chromatographie préparative). Des tests d'utilisation d'autres solvants comme le DMSO ou THF peuvent être cités, notamment dans le cas d'analyse d'indigoïdes afin d'augmenter leur solubilité dans la phase mobile, mais les résultats obtenus n'ont pas été probants [Pauk *et al.*, 2014]. Des acides, formique ou phosphorique, pour les plus utilisés, sont souvent ajoutés à la phase mobile afin d'éviter la dissociation des analytes. En effet, la plupart des colorants contenant des groupements acides, cela permet de favoriser leur forme neutre et d'augmenter ainsi leur rétention. L'utilisation d'acide formique est conseillée dans le cas où un couplage avec la spectrométrie de masse est envisagé [Degano *et al.*, 2009, Nowik, 2013, Pauk *et al.*, 2014].

Le mode d'élution en gradient^{viii} est principalement utilisé pour l'analyse des colorants naturels. Les programmations varient selon le nombre et le type de composés à séparer avec des temps de gradient de 15 à 60 min, des proportions initiales en modificateur organique de 5 à 10 % et des proportions finales jusqu'à 60 % d'acétonitrile ou

iv. Plus le diamètre des particules est faible, meilleure est l'efficacité.

v. Longueur d'onde pour laquelle le solvant pur a une absorbance de 1 unité arbitraire dans une cuvette de 1 cm, avec de l'eau comme blanc. L'absorption d'un échantillon dans un solvant donné sera dominée par l'absorption de celui-ci pour les longueurs d'onde inférieures à la longueur d'onde de coupure.

vi. 190 nm pour l'acétonitrile et 205 nm pour le méthanol [Snyder *et al.*, 1997].

vii. 0,38 cP pour l'acétonitrile et 0,55 cP pour le méthanol [Snyder *et al.*, 1997].

viii. Modification de la composition de la phase mobile au cours du temps.

80 % de méthanol. L'élution de composés très hydrophobes comme les dérivés d'indigoïdes bromés peut nécessiter des proportions finales d'acétonitrile allant jusqu'à 100 % [Nowik, 2013, Pauk *et al.*, 2014].

1.1.4 Séparation multidimensionnelle

Quand l'optimisation des conditions (choix des phases stationnaire et mobile, choix des paramètres de gradient) ne permet pas une séparation suffisante pour l'identification ou la purification des composés, on peut envisager le couplage de plusieurs dimensions de séparation. Dans le cas de séparation bidimensionnelle (2D), l'échantillon subit deux séparations chromatographiques indépendantes. La première dimension (¹D) permet de séparer les composés selon une certaine sélectivité, et la seconde dimension (²D) permet de séparer les composés non séparés par la première dimension, avec une sélectivité différente.

On peut distinguer les couplages bidimensionnels en ligne, où l'effluent^{ix} de la ¹D est directement injecté dans la ²D après sa collecte et les couplages hors-ligne, où l'effluent de la ¹D est collecté et stocké avant d'être soumis à la ²D. Le mode en ligne présente l'avantage d'être rapide et totalement automatisable; cependant, il est nécessaire que le temps d'analyse dans la ²D soit égal au temps de collecte dans la ¹D, ce qui peut limiter la résolution atteignable dans la ²D. Ce n'est plus le cas pour le mode hors-ligne, ce qui présente un avantage, mais en contrepartie, les inconvénients sont la durée de la méthode de séparation complète (en ajoutant le temps de stockage entre les deux dimensions) et le risque de perte de matière, contamination ou dégradation lors de la manipulation entre les deux dimensions. Contrairement au mode en ligne, un gros avantage du mode hors-ligne est de ne pas nécessiter un appareillage spécifique : un même chromatographe peut être utilisé en changeant uniquement les conditions opératoires de la deuxième dimension (phase stationnaire et/ou phase mobile) pour obtenir la différence de sélectivité souhaitée.

On peut également séparer les systèmes selon le mode d'échantillonnage : le mode « coupe à coeur » (*heart cutting*) LC-LC ou le mode intégral (*comprehensive*) LCxLC. Le *heart cutting* consiste à injecter dans la ²D une large plage pouvant contenir plusieurs pics du chromatogramme de la ¹D (Figure 2.4a). Quand plusieurs plages sont réinjectées, on parle de *heart cutting* multiple, mLC-LC (Figure 2.4b). Le mode *comprehensive* correspond au transfert de fractions très courtes de la ¹D vers la ²D d'une partie (*comprehensive* sélectif ou sLCxLC, Figure 2.4c) ou de la totalité du chromatogramme

ix. Ce qui sort de la colonne après la séparation.

(*comprehensive* intégral ou LCxLC, Figure 2.4d). Ce type d'échantillonnage permet la conservation de la résolution obtenue en 1^D en évitant, contrairement à la LC-LC, le mélange de composés préalablement séparés avant leur injection dans la 2^D [Carr et Stoll, 2015, Heinisch et Sarrut, 2020].

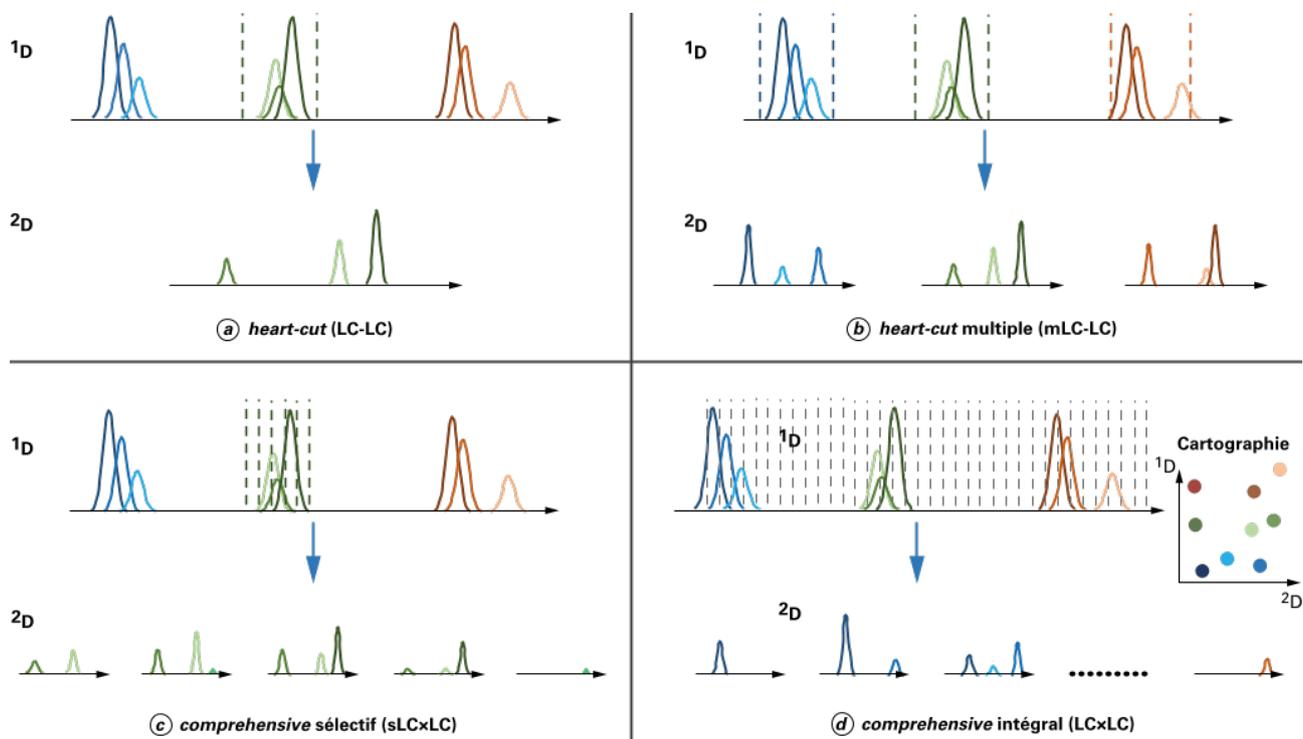


Figure 2.4 – Principaux mode de chromatographie bidimensionnelle, extrait de [Heinisch et Sarrut, 2020].

Pour que l'approche du couplage bidimensionnel présente un intérêt certain, il est nécessaire de trouver une combinaison de dimensions chromatographiques permettant de maximiser la répartition des composés dans l'espace de séparation bidimensionnel^x. Cela correspond à la notion d'orthogonalité entre les deux dimensions de séparation.

Cette notion sera largement détaillée dans la suite (Chapitre 3 partie 2.3.1). Pour l'instant, une représentation simplifiée en est proposée en Figure 2.5. Dans le cas idéal avec un degré d'orthogonalité maximal (à gauche), les points correspondant aux composés séparés se répartissent dans tout l'espace de séparation bidimensionnel. Dans le cas de degré d'orthogonalité intermédiaire (au centre), seule une partie de l'espace de séparation est occupée. Dans le cas de mauvaise orthogonalité, le choix des deux dimensions ne permet pas de décorréler les données de rétention, qui se répartissent le long d'une droite.

^x. Espace défini par les temps de rétention minimaux et maximaux des deux dimensions chromatographiques.

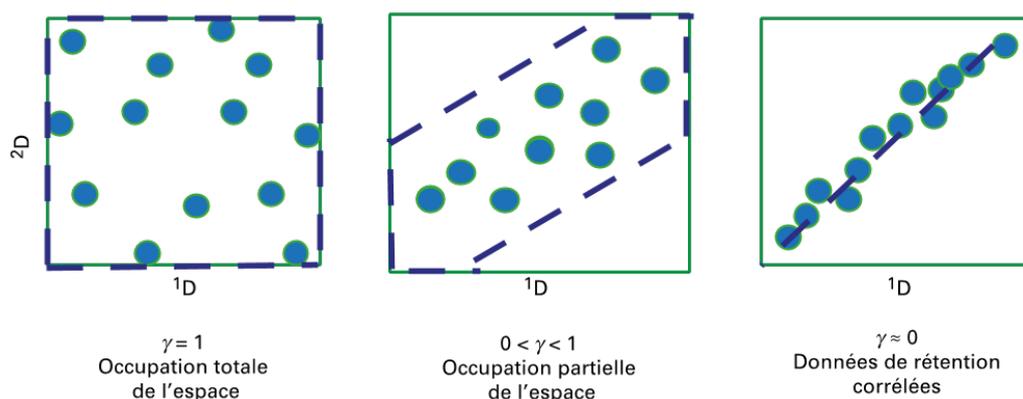


Figure 2.5 – Représentation de la notion d'orthogonalité, extrait de [Heinisch et Sarrut, 2020]

En pratique, l'orthogonalité entre deux dimensions chromatographiques peut résulter d'un changement de phase stationnaire, de phase mobile ou des deux.

Les séparations bidimensionnelles sont beaucoup utilisées en chromatographie préparative en raison du gain de résolution qu'elles permettent. Cela donne la possibilité d'augmenter considérablement la pureté des composés isolés. À l'échelle préparative, les modes « coupe à cœur » (*heart cutting*) simple ou multiple sont les plus répandus : seules les fractions contenant les composés à purifier sont collectées dans la 1^{D} , puis injectées dans la 2^{D} pour augmenter leur pureté. Ces modes d'échantillonnage sont tout à fait adaptés à des approches de séparation hors-ligne, plus simples à mettre en place et moins onéreuses que celles en ligne.

L'approche la plus populaire consiste à un changement de phase stationnaire entre les deux dimensions. La complémentarité des modes RPLC et HILIC^{xi} est particulièrement exploitée. Concernant la purification de molécules colorées naturelles, on peut notamment citer le développement de méthodes prep-RPLC-HILIC pour la purification d'anthocyanes et alcaloïdes de *L. ruthenicum* [Jin et al., 2015] ou de glycosides de flavonoïdes de *Sphaerophysa salsula* [Jiao et al., 2017], ainsi que dans d'autres plantes de la médecine traditionnelle chinoise [Zeng et al., 2012]. Malgré l'efficacité de la RPLC pour la séparation d'une grande variété de composés, peu d'exemples de méthodes RPLC-RPLC sont rencontrés. Cela peut notamment s'expliquer par la difficulté de trouver des phases stationnaires suffisamment orthogonales. [Russo et al., 2015] proposent, par exemple, une méthode de purification de flavonoïdes et limonoïdes en RPLC-RPLC en utilisant des phases C18 et pentafluorophénylepropyle (PFPP). Une autre façon d'exploiter le couplage RPLC-RPLC est de travailler avec une phase stationnaire identique et d'apporter l'orthogonalité entre les dimensions par un changement de phase mobile.

xi. Chromatographie d'interaction hydrophyle, variante de HPLC surtout utilisée pour la séparation de petites molécules polaires, impliquant l'utilisation de phases stationnaires couramment utilisées en NPLC et de phases mobiles utilisées en RPLC.

On peut notamment citer le développement de quelques méthodes prep-RPLC-RPLC avec un changement de pH de la phase mobile entre les deux dimensions pour la purification de composés bioactifs [Gilar *et al.*, 2005b, Zhang *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2014]. Considérant le caractère ionisable de la majorité des molécules colorées naturelles, cette approche semble prometteuse à appliquer pour leur purification.

1.2 Techniques de caractérisation

Une fois les composés d'intérêt séparés, on cherche à les caractériser avec comme but ultime d'élucider leur structure moléculaire. Pour ce faire, nous avons eu à notre disposition plusieurs techniques : les spectroscopies électroniques (absorption et fluorescence UV-Vis), vibrationnelles (absorption infrarouge et diffusion Raman) et magnétiques (résonance magnétique nucléaire), ainsi que la spectrométrie de masse.

Selon les techniques, la caractérisation peut être réalisée en ligne, c'est-à-dire avec un détecteur directement couplé à la chromatographie en phase liquide (absorption UV-Vis, spectrométrie de masse) ou bien hors-ligne, où une purification préalable des analytes est requise.

Les différentes techniques spectroscopiques reposent sur l'interaction rayonnement-matière, avec un échange d'énergie entre le composé étudié et l'onde incidente. Lors de cette interaction, différents phénomènes peuvent avoir lieu : l'absorption, la réflexion, la transmission, la diffusion et l'émission (Figure 2.6). Ils peuvent être radiatifs ou non, c'est-à-dire générer l'émission de photons ou pas. Dans le cas de phénomènes radiatifs, on distingue ceux élastiques de ceux inélastiques, selon que les photons émis soient de même énergie que les photons incidents ou d'énergie différente.

Les spectroscopies s'intéressent aux transitions électroniques résultants de ces phénomènes, en s'appuyant sur la théorie quantique des énergies atomiques et moléculaires. Ces transitions peuvent se produire à différentes gammes d'énergie, distinguant les différentes techniques spectroscopiques. Par énergie décroissante, les spectroscopies électroniques dans l'UV-Vis mettent en jeu des transitions entre niveaux énergétiques électroniques, les spectroscopies vibrationnelles, IR et Raman, des transitions entre niveaux énergétiques vibrationnels, et enfin les techniques magnétiques des transitions entre niveaux magnétiques, décrits par la notion de spin.

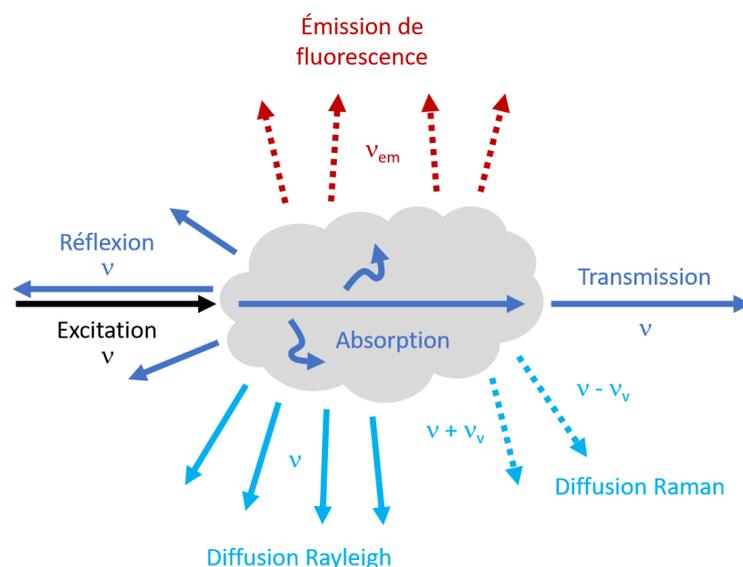


Figure 2.6 – Les différents phénomènes ayant lieu lors de l’interaction rayonnement-matière : absorption-réflexion-transmission (en bleu foncé), diffusion (en bleu clair) et émission (en rouge).

ν , fréquence du rayon incident; ν_{em} , fréquence du rayon d’émission de fluorescence;
 ν_v , fréquence correspondant à l’énergie entre deux niveaux vibrationnels.

La spectrométrie de masse réside en la production d’ions, à partir des composés à analyser, et en la séparation de ces ions selon leur rapport masse sur charge. Il ne s’agit pas d’une technique spectroscopique à proprement dit, car elle n’est pas basée sur une interaction entre la matière et une onde électromagnétique. Elle est cependant très souvent associée à ces dernières dans le cadre d’élucidation de structure, grâce à la complémentarité des informations qu’elles fournissent.

1.2.1 Spectroscopies électroniques

Absorption UV-Vis La spectroscopie d’absorption UV-Vis repose sur l’absorption d’un rayonnement lumineux par les molécules analysées. Cette absorption correspond à des transitions électroniques entre état fondamental (S_0) et états excités ($S_1, S_2 \dots$) dans la structure moléculaire (Figure 2.7). Les transitions ont lieu si l’énergie du rayonnement incident correspond à la différence d’énergies entre les deux états.

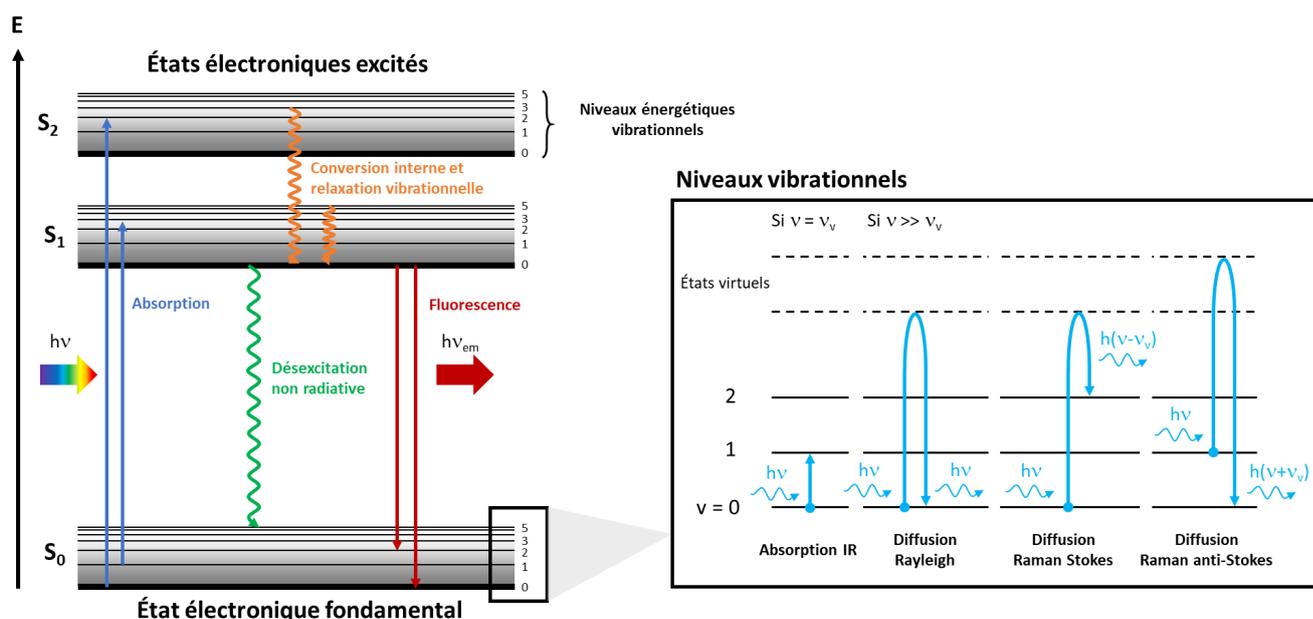


Figure 2.7 – Schématisation des différentes transitions électroniques impliquées dans les spectroscopies électroniques

ν , fréquence du rayon incident; ν_{em} , fréquence du rayon d'émission de fluorescence;
 ν_v , fréquence correspondant à l'énergie entre deux niveaux vibrationnels.

Adapté de [Barbillat *et al.*, 1999, Merlin, 2002].

L'identification de composés par la spectroscopie d'absorption UV-Vis nécessite la comparaison des spectres obtenus avec des spectres de référence (bases de données spectrales de référence). Cette technique, utilisée seule, ne permet pas d'accéder directement aux structures moléculaires. De plus, elle est assez peu spécifique, de nombreux composés absorbent sur les mêmes plages de longueurs d'onde; pour des composés dont la structure est très proche, il pourra s'avérer difficile de différencier leurs spectres.

Dans la pratique, les analyses peuvent être conduites avec des mesures en transmission ou en réflexion.

En **transmission**, pour une longueur d'onde donnée (donc à énergie fixée), l'absorbance d'un échantillon est évaluée en calculant le ratio entre l'intensité du rayonnement incident et l'intensité du rayon transmis à travers l'échantillon (la transmittance)^{xii}. En faisant varier la longueur d'onde, le spectre d'absorption est construit [Di Benedetto et Breuil, 2007].

Pour enregistrer les spectres d'absorbance en transmission, on rencontre des détecteurs à balayage (*variable wavelength detector*, ou VWD) et à barrette de diodes (*diode*

xii. Absorbance (A) et transmittance (T) sont reliées par la relation $A = -\log T$.

array detector, DAD ou *photodiode array (detector)*, PDA). Dans le cas du détecteur à balayage, un monochromateur sélectionne une longueur d'onde dans le spectre de la lampe avant (ou après) le passage dans la cellule de détection. Le spectre est obtenu en balayant la gamme spectrale longueur d'onde après longueur d'onde. Dans un détecteur à barrette de diodes, l'entièreté du spectre de la lampe passe à travers la cellule de détection avant d'être dirigée sur un réseau diffractant. Le faisceau diffracté est envoyé sur une barrette linéaire de photodiodes mesurant l'intensité de chaque longueur d'onde. La résolution en longueur d'onde dépend de la plage du détecteur et de la taille des diodes. Ce type de détecteur permet une mesure rapide des spectres d'absorption [Taylor, 2015, Dolan, 2016, Wysocki et Dong, 2019].

Lors du couplage avec une méthode séparative, les deux types de détecteurs peuvent être utilisés. Pour le VWD, une ou plusieurs longueurs d'onde sont fixées en début d'analyse et l'absorbance mesurée à ces longueurs d'ondes dans la cellule de détection en sortie de colonne est tracée en fonction du temps. Pour le DAD, les chromatogrammes peuvent être tracés à partir de l'absorbance de n'importe quelle longueur d'onde, ou plage de longueurs d'onde, de la gamme spectrale du détecteur. Un spectre d'absorption UV-Vis peut également être extrait en chaque point du chromatogramme, ce qui fait le grand avantage de ce type de détecteur par rapport au VWD.

Dans le cas d'analyse de mélanges complexes en chromatographie en phase liquide, l'utilisation du DAD est vivement conseillée afin de pouvoir coupler les données de rétention et les spectres d'absorption pour l'identification des composés d'intérêt. Pour les colorants, l'entièreté de la gamme UV-Vis pourra être exploitée [Nowik, 2013, Pauk et al., 2014].

En **réflexion**, l'étude du rayonnement réfléchi par la surface d'un échantillon éclairé par un rayonnement incident permet d'accéder aux caractéristiques d'absorption de la substance analysée. Ce mode de détection présente une alternative pour l'analyse des matériaux solides opaques, pour lesquels les mesures en transmission ne peuvent pas être mises en œuvre. Il est tout particulièrement adapté aux applications dans le domaine du patrimoine permettant des analyses *in situ*.

À partir des données obtenues en réflexion dans le domaine visible (380-780 nm), il est possible d'obtenir des coordonnées colorimétriques permettant d'apprécier plus aisément le rendu coloré associé aux caractéristiques spectrales de l'échantillon.

L'impression de couleur dépend des propriétés spectrales de l'objet observé mais aussi de la source d'éclairage et de l'observateur. La Commission Internationale de l'Éclairage (CIE) a ainsi défini des espaces colorimétriques permettant de prendre en

compte des illuminants standards et les fonctions de réponses des trois types de cônes de l'œil humain, responsables de la vision des couleurs.

L'espace $L^*a^*b^*$ CIE 1976 est un espace dit « uniforme », adapté à la comparaison des couleurs entre elles et dédié à la caractérisation des couleurs des surfaces^{xiii}. Dans ce système, des différences de couleurs perçues comme identiques par l'œil humain sont séparées par une même distance. Les trois paramètres du système en coordonnées cartésiennes sont la clarté L^* (entre 0 et 100), la position chromatique sur un axe vert-rouge a^* (entre -100 et 100) et la position chromatique sur un axe bleu-jaune b^* (entre -100 et 100) (Figure 2.8) [Dupont et Steen, 2004a, Dupont et Steen, 2004b].

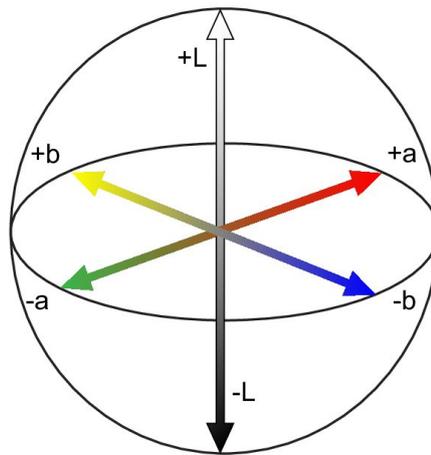


Figure 2.8 - Représentation 3D de l'espace $L^*a^*b^*$ CIE 1976.

Pour comparer deux couleurs entre elles, la distance chromatique ΔE_{ab}^* (ou $\Delta E(76)$) entre deux points de coordonnées $L^*a^*b^*$ est calculée selon :

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (2.8)$$

Émission de fluorescence UV-Vis Pour certaines molécules, suite à une excitation par un rayonnement incident (lors du phénomène d'absorption par exemple), le retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission d'un photon (émission radiative) (Figure 2.7). On qualifie ce phénomène de fluorescence. L'énergie des photons émis lors de la fluorescence est toujours plus faible que celle de la radiation excitatrice, car une partie de l'énergie est perdue par conversion interne et relaxation vibrationnelle. La longueur d'onde du maximum d'émission de fluorescence est donc toujours supérieure à la longueur d'onde de l'excitatrice. Plus la longueur d'onde du rayonnement

xiii. Alors que l'espace uniforme $L^*u^*v^*$ CIE 1976 est adapté à la caractérisation des lumières des éclairages et des écrans.

excitateur est proche de la longueur d'onde du maximum d'absorption, plus l'intensité de la fluorescence est importante.

On construit un spectre d'émission de fluorescence en fixant la longueur d'onde du rayonnement incident et en mesurant l'intensité du rayonnement émis à toutes les longueurs d'ondes supérieures. On peut également obtenir des spectres d'excitation en faisant varier les longueurs d'onde du rayonnement excitateur et en mesurant l'intensité du rayonnement émis à une longueur d'onde fixée. Ces deux types de spectres peuvent être regroupés dans des diagrammes tridimensionnels, avec les longueurs d'onde d'émission en abscisses, celles d'excitations en ordonnées (ou inversement) et l'intensité de fluorescence détectées en tout point $(\lambda_{em}, \lambda_{ex})$ dans une 3^{ème} dimension.

L'émission de fluorescence peut aussi être exploitée dans des couplages à la chromatographie en phase liquide (HPLC-FLD). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont sélectionnées et l'intensité du rayonnement émis est mesurée en fonction du temps dans la cellule de détection en sortie de colonne. Ce type de détecteur est plus sélectif que celui par absorption UV-Vis. En effet, peu de molécules fluorescent et fixer les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation rendent la détection assez spécifique [Degano *et al.*, 2009, Nowik, 2013, Pauk *et al.*, 2014].

1.2.2 Spectroscopies vibrationnelles

Les spectroscopies vibrationnelles mettent en jeu, comme les spectroscopies électroniques, des transitions électroniques entre niveaux énergétiques, mais à des énergies plus faibles, et donc des longueurs d'onde plus grandes. Les transitions ont lieu entre les niveaux énergétiques vibrationnels; elles correspondent à des modes de vibrations de la molécule. On distingue les vibrations d'élongation qui font intervenir des variations de longueur de liaisons et les vibrations de déformation dans lesquelles les angles formés par les liaisons varient. Les techniques d'absorption infrarouge et Raman se distinguent par les modes de vibration observables, qui sont différents pour ces deux techniques. Elles donnent ainsi des informations complémentaires [Barbillat *et al.*, 1999, Dalibart et Servant, 2000].

Absorption infrarouge La spectroscopie infrarouge repose sur un phénomène d'absorption. Si la fréquence du rayonnement incident correspond à la fréquence entre deux niveaux énergétiques vibrationnels ν_V , l'énergie peut être absorbée par la matière et l'interaction créée provoque la vibration de certaines liaisons (Figure 2.7). La position des bandes d'absorption infrarouge permet d'identifier les modes de vibration de la molécule analysée. Chaque groupement fonctionnel ayant des fréquences de vibration caractéristiques, il est ainsi possible de prédire leur présence ou leur absence dans la structure de la molécule. Des règles de sélection s'appuyant sur la symétrie des molécules établissent que l'absorption du rayonnement infrarouge sera permise seulement si le mouvement du mode induit une variation du moment dipolaire électrique de la molécule.

Dans la pratique, les analyses peuvent être conduites avec des mesures en transmission ou en réflexion. Les deux modes utilisés dans le cadre de cette thèse sont précisés ci-après.

En **transmission**, comme pour la spectroscopie d'absorption UV-Vis, un échantillon est irradié par un rayonnement, dans le domaine de l'infrarouge cette fois-ci, et le rapport entre l'intensité du faisceau transmis et le faisceau incident permet de remonter à l'absorbance. Un balayage en nombre d'onde permet la construction du spectre.

En **réflexion totale atténuée** (ATR, pour *Attenuated total reflection*), un cristal est mis en contact avec l'échantillon. Ce cristal est éclairé par un faisceau infrarouge et sa réflexion à l'interface échantillon-cristal génère une onde évanescente^{xiv} pénétrant dans l'échantillon et donnant lieu à une absorption dudit faisceau pour les fréquences correspondant aux modes de vibration de la substance analysée. Le faisceau atténué est réfléchi jusqu'à l'extrémité du cristal menant au détecteur. Le spectre d'absorption de l'échantillon est obtenu en faisant le rapport du signal enregistré pour le cristal au contact de l'échantillon et celui du cristal seul [Dalibart et Servant, 2000].

Diffusion Raman La spectroscopie Raman exploite le phénomène de la diffusion. Si l'énergie du rayonnement incident est très supérieure aux énergies des états vibrationnels, un phénomène de diffusion a lieu : lors de l'excitation, la molécule transite dans un état virtuel (état énergétique élevé et de courte durée de vie) puis redescend sur un niveau réel en émettant un photon. Dans la plupart des cas, le photon diffusé a la même fréquence que le photon incident ($\nu_D = \nu$), c'est la diffusion Rayleigh élastique. Mais pour une faible proportion de photons, un changement de fréquence est observé : il atteint soit un niveau vibrationnel supérieur, diffusion Raman élastique Stokes, soit inférieur, diffusion Raman inélastique anti-Stokes (Figure 2.7). Dans les deux cas, l'écart

xiv. Onde dont l'intensité diminue exponentiellement avec la distance de pénétration dans le matériau.

de fréquence entre le photon incident et le photon diffusé correspond à une fréquence de vibration de la molécule, ν_V . Ainsi, la position des bandes de diffusion Raman permet d'identifier les modes de vibration de la molécule analysée. Les règles de sélection des vibrations mettent en évidence que la diffusion Raman est observée uniquement lorsque le mouvement de vibration entraîne une variation de la polarisabilité moléculaire [Barbillat *et al.*, 1999].

Dans la pratique, une source excitatrice monochromatique de longueur d'onde fixe est focalisée sur l'échantillon. Il s'agit de lasers dont les longueurs d'ondes les plus couramment utilisées actuellement sont 532 nm et 785 nm. La lumière diffusée est collectée et les nombre d'ondes des bandes Raman $\tilde{\nu}_D$ sont identifiés. Afin de mettre en évidence les grandeurs $\tilde{\nu}_V$, caractéristiques de la molécule et indépendantes du choix de la radiation excitatrice $\tilde{\nu}$, les spectres Raman sont tracés en nombre d'ondes relatif, $\tilde{\nu}_D - \tilde{\nu}$.

La spectroscopie Raman rencontre certaines limitations pour sa mise en œuvre pour l'analyse de composés organiques. Il arrive souvent que l'état virtuel transitoire ait une énergie proche de celle d'un état électronique excité; lors du retour à l'état fondamental, une émission de fluorescence peut avoir lieu en parallèle de la diffusion Raman. Cela se manifeste par des bandes intenses et très larges masquant le spectre Raman. La première solution pour l'éviter est de travailler avec des sources excitatrices moins énergiques, comme celle d'un laser infrarouge à 1064 nm. La seconde solution consiste à utiliser la spectroscopie Raman exaltée de surface SERS (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*). Le signal Raman est amplifié et la fluorescence atténuée via l'adsorption des molécules à analyser à la surface d'un métal (sous forme de dépôt de colloïde ou film métallique) [Barbillat *et al.*, 1999]. La quasi totalité des analyses de colorants naturels est faite avec cette technique, plutôt qu'avec la spectroscopie Raman conventionnelle.

1.2.3 Spectroscopies magnétiques (ou de spin)

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) met en jeu des transitions énergétiques au niveau des noyaux atomiques. Les applications les plus courantes de la RMN en chimie organique concernent les noyaux ^1H et ^{13}C , ainsi que ^{19}F , ^{29}F et ^{31}P (tous de spin $1/2$ ^{xv}). Il convient d'associer deux modèles afin d'expliquer le phénomène à l'origine de la RMN : le modèle énergétique (que l'on a développé jusqu'ici pour les autres techniques spectroscopiques) et le modèle vectoriel.

xv. Le prérequis pour qu'un atome soit observable en RMN est qu'il possède un spin non nul.

Chaque noyau est assimilé à un moment magnétique induit par sa charge en rotation. En l'absence de champ magnétique externe, dans un échantillon macroscopique, les moments des noyaux sont orientés de façon aléatoires et l'aimantation résultante est donc statistiquement nulle. En présence d'un champ magnétique externe \vec{B}_0 , les moments magnétiques vont s'orienter selon les lois de la mécanique quantique et décrire un mouvement de précession autour de cet axe \vec{B}_0 et avec une vitesse proportionnelle à la fréquence ν_0 . Pour un proton (noyau d'atome d'hydrogène), deux orientations des moments magnétiques sont possibles : un état dit parallèle α et un état anti-parallèle β .

Au niveau énergétique, en l'absence de champ extérieur, toutes les orientations ont la même énergie. Sous l'effet d'un champ extérieur \vec{B}_0 , deux niveaux d'énergie correspondant aux deux orientations apparaissent. La différence d'énergie entre les deux niveaux est proportionnelle au champ extérieur.

À l'état d'équilibre, la population α est plus grande que la population β et l'aimantation résultante est ainsi parallèle au champ extérieur \vec{B}_0 (Figure 2.9a). Lorsque l'aimantation est parallèle à \vec{B}_0 , elle n'est pas observable. Il faut donc la basculer pour être capable d'extraire les paramètres d'intérêt (intensité, fréquence liée à sa rotation).

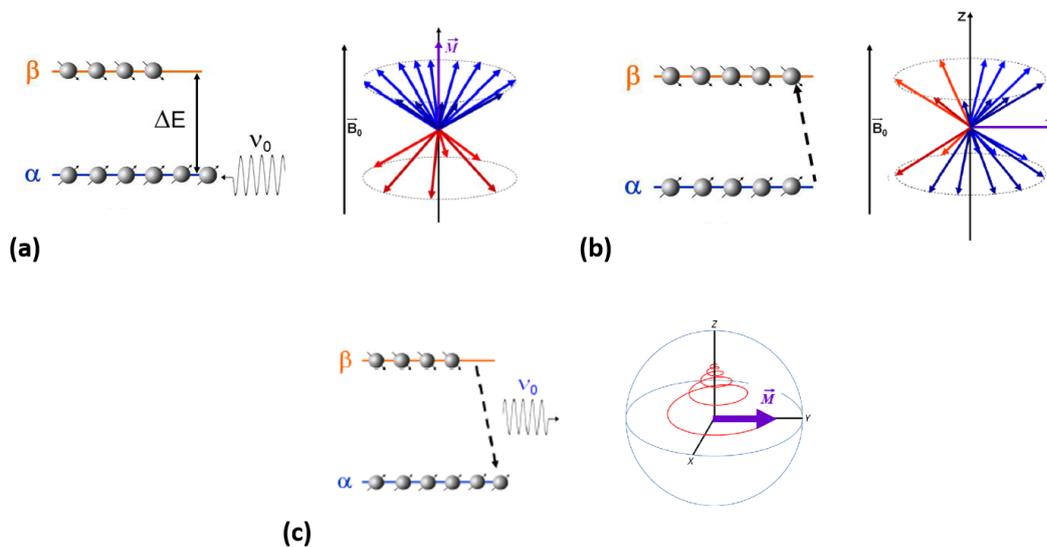


Figure 2.9 – Principe de la spectroscopie RMN, adapté de [Akoka, 2022].

(a) À l'équilibre, population α plus importante que population β , aimantation résultante \vec{M} parallèle à \vec{B}_0 (b) Sous une impulsion, absorption d'un photon permettant des transitions de l'état α vers l'état β menant à l'égalisation des populations α et β , aimantation résultante \vec{M} perpendiculaire à \vec{B}_0 (c) Lors du retour à l'équilibre, émission de photons, retour de l'aimantation \vec{M} à sa position initiale, en décrivant une rotation autour de \vec{B}_0 .

Lorsqu'un ensemble de noyaux à l'équilibre est irradié par un rayonnement d'énergie égale à la différence d'énergie entre les deux niveaux, l'absorption des photons per-

met le passage de quelques noyaux de l'état α à l'état β . Quand les populations des deux niveaux sont égalisées, l'aimantation résultante est perpendiculaire à \vec{B}_0 et tourne toujours à vitesse proportionnelle à la fréquence ν_0 (Figure 2.9b).

Le retour à l'état d'équilibre (relaxation) s'accompagne d'émission de photons d'énergie égale à la différence des deux niveaux (et donc de fréquence ν_0). Le nombre de photons émis correspond au nombre de noyaux qui retournent de l'état β vers α . L'aimantation retourne dans un mouvement de rotation à sa position d'équilibre, parallèle à \vec{B}_0 (Figure 2.9c).

L'expérience de RMN consiste ainsi en une période d'excitation^{xvi}, puis une période de détection du signal RMN. Pour la détection, une bobine est placée perpendiculairement à l'axe \vec{B}_0 . Suite à l'impulsion et à la bascule perpendiculaire, la rotation de l'aimantation résultante induit dans la bobine un courant de fréquence ν_0 et dont l'amplitude initiale est proportionnelle à l'intensité de l'aimantation, et donc au nombre de noyaux retournés de l'état β vers α . Le signal s'amortit durant la relaxation, jusqu'à être nul au retour à l'équilibre, l'aimantation étant redevenue parallèle à \vec{B}_0 .

Le modèle présenté jusqu'à maintenant considérait des noyaux isolés, or dans le cas réel, le nuage électronique entourant le noyau ainsi que les autres noyaux de la molécule impactent le champs réel que subissent les noyaux. Celui-ci est effectivement plus faible que \vec{B}_0 et les fréquences enregistrées lors de l'expérience RMN correspondent à $\nu_0 - \Delta\nu$. Le déplacement relatif $\Delta\nu$ de la raie de résonance enregistrée par rapport à celle de résonance du proton isolé ν_0 donne ainsi des informations sur l'environnement du proton et donc la structure moléculaire de la molécule analysée [Akoka, 2022].

Si la spectroscopie RMN monodimensionnelle permet d'accéder au nombre et à la nature des plus proches voisins via leur couplage spin-spin^{xvii}, elle ne permet qu'un accès limité aux couplages plus complexes entre les différents atomes de la molécule. La RMN bidimensionnelle de corrélation est, quant à elle, dédiée à la détection simultanée de tous ces couplages entre spins.

Les couplages observables sont de deux natures : les **couplages scalaires** (ou couplages à travers les liaisons), ayant pour origine l'interaction entre deux spins nucléaires transmise par les électrons de liaison, et les **couplages dipolaires** (ou couplages à travers l'espace), résultant de l'interaction entre deux spins nucléaires, analogue de l'interaction classique entre deux moments magnétiques.

xvi. Par une impulsion radiofréquence, dont la fréquence est proche de la fréquence de résonance de l'échantillon et dont la durée et l'amplitude sont calibrées de façon à basculer l'aimantation perpendiculairement au champ \vec{B}_0

xvii. Interactions magnétiques entre les spins qui sont transmises par les électrons à travers les liaisons.

Des expériences sont dédiées aux couplages entre noyaux de même isotope, comme ^1H - ^1H (**corrélations homonucléaires**) et d'autres aux couplages de deux noyaux d'isotope distinct, comme ^1H - ^{13}C (**corrélations hétéronucléaires**).

Les différentes expériences de spectroscopie RMN 2D utilisées dans le cadre de ce travail sont :

- Des spectres de corrélations **homonucléaires** :
 - avec couplages **scalaires** : COSY (*CO*related *S*pectroscop*Y*), couplages ^1H - ^1H
 - avec couplages **dipolaires** : NOESY (*N*uclear *O*verhauser *E*ffect *S*pectroscop*Y*) et ROESY (*R*otating *F*rame *O*verhauser *E*ffect *S*pectroscop*Y*), couplages ^1H - ^1H
- Des spectres de corrélations **hétéronucléaires**, ^1H - ^{13}C avec couplages **scalaires** :
 - HSQC (*H*eteronuclear *S*ingle *Q*uantum *C*oherence) : corrélations entre paires d'atomes séparés par une liaison chimique (^1J)
 - HMBC (*H*eteronuclear *M*ultiple *B*ond *C*orrelation) : corrélations entre paires d'atomes séparés par deux liaisons chimiques ou plus (^2J , ^3J).

1.2.4 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse permet de caractériser les composés en mesurant le rapport masse sur charge (m/z) de leurs ions et de leurs produits de fragmentation. Un spectromètre de masse associe une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur. La source d'ionisation forme des ions gazeux à partir des molécules à l'état liquide, solide ou vaporisé. L'analyseur trie ces ions en fonction de la valeur de leur rapport masse sur charge m/z et le détecteur convertit le signal de chaque ion trié par l'analyseur en un courant électrique qui pourra être traité par le système informatique.

On rencontre plusieurs types de sources d'ionisation (impact électronique, ionisation chimique à pression atmosphérique, ionisation par électro-nébulisation) et d'analyseurs (à temps de vol, filtres ioniques quadripolaires, piègeage d'ions) [Rondeau, 2017b, Rondeau, 2017a]. Nous ne décrivons par la suite que les principes de ceux utilisés dans le cadre de cette thèse.

Un échantillon peut-être directement introduit dans la source d'un spectromètre de masse (infusion directe) ou avoir subi une séparation préalable (couplage avec la chromatographie en phase liquide, dans notre cas). Dans le cas de couplage, on peut faire le parallèle avec la HPLC-DAD : un spectre de masse est obtenu en chaque point du chromatogramme.

Source d'ionisation Le mode d'ionisation le plus répandu pour les colorants est l'ionisation par électro-nébulisation ESI (*Electrospray ionisation*). C'est une source qui permet l'ionisation d'une large gamme d'analytes et qui est compatible avec une introduction de l'échantillon par HPLC. Ce type d'ionisation repose sur la formation d'un brouillard de gouttelettes contenant des ions solvatés dont l'ionisation a été initiée en solution [Rondeau, 2017b]. L'ionisation peut être positive ou négative selon le type de composés analysés. Pour une molécule M, les ions quasi-moléculaires produits correspondent à $[M+H]^+$ ou $[M+H]^-$. Dans le cas des molécules colorées, [Witkowski *et al.*, 2017] rapportent une utilisation préférentielle de l'ionisation négative pour les flavonoïdes (tous sens confondus) et les anthraquinones; l'ionisation positive est adaptée pour les phénozones et les indigoïdes.

Analyseur de masse Les analyseurs peuvent être différenciés selon leur résolution : on distingue ceux à basse résolution (LR, *Low-resolution*) (filtres ioniques quadripolaires dits quadripôles, pièges à ions) et ceux à haute résolution (HR, *High-resolution*) (à temps de vol, Orbitrap, à résonance cyclotronique ionique (ICR)). L'utilisation d'analyseurs à haute résolution est essentielle pour accéder à la masse exacte des molécules analysées et par conséquent à une proposition de formule brute.

Dans le cadre de ce travail, trois types d'analyseurs ont été utilisés : un quadripôle et un Orbitrap en couplage avec la HPLC et un analyseur ICR en infusion directe pour l'analyse des molécules purifiées.

Les quadripôles sont des analyseurs constitués de quatre électrodes cylindriques parallèles à l'intérieur desquelles les ions transitent. Des tensions continues et un potentiel radiofréquence sont appliquées aux électrodes. Si la valeur du rapport m/z de l'ion est compatible avec les paramètres appliqués assurant la stabilité de la trajectoire de l'ion dans le dispositif, alors les espèces sont dirigées vers le détecteur.

Les analyseurs de type Orbitrap sont des systèmes de piégeage d'ions constitués d'une électrode externe contenant une électrode interne fusiforme; le champ électrostatique généré met les ions en oscillation autour de cette dernière. La face interne des électrodes externes est sensible au mouvement axial des ions, générant un courant correspondant aux fréquences d'oscillation. La fréquence est reliée au rapport m/z grâce au mouvement cohérent de chaque paquet d'ions de même masse et le spectre de masse peut être construit.

Dans les analyseurs ICR, les ions sont tout d'abord piégés dans une cellule grâce à l'application d'un champ magnétique très intense, parallèle à l'axe d'introduction des ions : ils adoptent un mouvement circulaire uniforme dit cyclotronique et tous les ions

de même m/z ont la même fréquence cyclotronique. Suit une phase d'excitation, où un champ électrique alternatif de fréquence égale à la fréquence cyclotronique d'ions d'un rapport m/q donné est appliqué. Les ions correspondants sont accélérés et le rayon de leur trajectoire est augmenté de façon à se rapprocher des plaques de détection délimitant la cellule. Le passage des ions à proximité des plaques génère un courant dont la fréquence est reliée au rapport m/z des ions. Un balayage en fréquence avec la tension alternative appliquée permet de construire le spectre de masse [Rondeau, 2017a].

Spectrométrie de masse en tandem ou MS-MS Le principe de la spectrométrie de masse en tandem consiste à sélectionner un ion présent dans la source d'ionisation selon son rapport m/z , induire spécifiquement sa fragmentation et enregistrer le spectre de masse des ions produits.

Dans notre cas, la spectrométrie de masse en tandem (MS-MS) a été mise en œuvre sur deux types d'analyseurs : un quadripôle et un ICR.

Dans le cas de la technologie quadripôle dite QqQ, le montage pour la MS-MS consiste en l'assemblage de deux analyseurs quadripôles (Q1 et Q2) montés en ligne et séparés par une cellule de collision (q). Le premier quadripôle sert à sélectionner un ion d'intérêt pour le transmettre à la cellule de collision. Le second quadripôle permet la réalisation du spectre de masse MS-MS des ions produits suite à la fragmentation. Dans la cellule de collision, la dissociation de l'ion sélectionné est réalisée par collision avec un gaz cible.

Dans une cellule ICR, l'étape de sélection de l'ion d'intérêt est réalisée en appliquant une tension alternative de forte amplitude et de longue durée pour les fréquences cyclotroniques des ions de m/z non désirés. Les rayons de leur trajectoire augmentent jusqu'à entrer en collision avec les parois de la cellule, menant à leur neutralisation. L'ion précurseur resté au centre de la cellule est ainsi isolé et sa dissociation par introduction d'un gaz de collision est réalisée. La détection des ions fragments produits repose sur le principe décrit dans le cas de la spectrométrie de masse simple par ICR [Rondeau, 2017a].

2 Matériel et méthodes

2.1 Matériel

2.1.1 Matériel végétal

Les feuilles fraîches de *Justicia spicigera* ont été fournies par le Jardin botanique Val Rahmeh de Menton (Figure 2.10a). Des rameaux ont été prélevés sur les arbustes et ont été acheminés jusqu'au laboratoire par envois postaux.

Dès leur réception (entre 3 à 5 jours après leur envoi), les feuilles ont été détachées des branches et mises à sécher à température ambiante sur du papier absorbant (Figure 2.10b). Selon les conditions extérieures, la durée du séchage a varié de 2 à 6 jours. Elles ont ensuite été conservées dans une enveloppe en papier kraft jusqu'à leur utilisation.



(a) Plants de *Justicia spicigera* au Jardin botanique Val Rahmeh (Menton). ©Christophe Joulin



(b) Feuilles de *Justicia spicigera* avant séchage.

Figure 2.10 – Échantillons des feuilles de *Justicia spicigera*.

Au cours du projet, plusieurs lots de feuilles ont été reçus et nommés selon leur date de réception : lot 2015, lot 03/2018, lot 04/2018, lot 11/2019, lot 11/2020.

Dans le Chapitre 3, le lot utilisé pour l'extraction est précisé pour chacune des expériences. Pour le Chapitre 4, toutes les extractions ont été réalisées avec le lot 11/2019.

2.1.2 Produits chimiques

L'ensemble des produits utilisés sont répertoriés dans le Tableau 2.1.

Tableau 2.1 – Produits utilisés

Nom	Formule	Fournisseur	Qualité
Acétonitrile	CH ₃ CN	Carlo Erba	RS HPLC PLUS gradient
		Biosolve	HPLC super gradient
		Sigma Aldrich	HPLC Plus > 99,9 %
Acide chlorhydrique	HCl	Acros Organic	37 %
Acide formique	HCOOH	Carlo Erba	99 % (ACS pour analyses)
		Biosolve	HPLC-MS, 99 %
		Sigma-Aldrich	> 98 %
Alun de potassium	KAl(SO ₂) ₄ · 12H ₂ O	Sigma Aldrich	99,5 %
Amidon de maïs	-	Prolabo	-
Carbonate de sodium	Na ₂ CO ₃	Fluka	99 %
Diméthylformamide	C ₃ H ₇ NO	Prolabo	HPLC grade
Diméthylsulfoxyde	C ₂ H ₆ OS	Prolabo	HPLC grade
Diméthylsulfoxyde deutéré	C ₂ D ₆ OS	Eurisotop	99,96 % D
Éther méthylique de résorufine	C ₁₃ H ₉ NO ₃	Sigma Aldrich	> 98 %
Formiate d'ammonium	HCOONH ₄	Aldrich Chemie	97 %
Gomme arabique	-	Sigma-Aldrich	-
Hydroxyde d'ammonium	NH ₄ OH	Merck	25 %
Hydroxyde de calcium	Ca(OH) ₂	Prolabo	96 %
Hydroxyde de sodium	NaOH	VWR Chemicals	99 %
Kaempféritrine	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	Cayman Chemical	> 98 %
Méthanol	CH ₃ OH	Carlo Erba	RS HPLC PLUS gradient
Méthanol deutéré	CD ₃ OD	Eurisotop	99,96 % D
Questionmycin A	C ₁₂ H ₈ N ₂ O ₂	Biosynth	> 95 %
Résorufine	C ₁₂ H ₇ O ₃ N	Sigma Aldrich	95 %
Sulfate de calcium	Ca ₂ SO ₄ · 2H ₂ O	Prolabo	-
Tétrahydrofurane	C ₄ H ₈ O	Rathburn	-

Deux distributeurs d'eau ultra-pure type I ont été utilisés : le Direct Q3 (Millipore) et le Purelab flex (Elga LabWater).

2.2 Préparations des échantillons

2.2.1 Extraction du colorant

Pour les analyses en HPLC à l'échelle analytique, 20 mg de feuilles séchées, grossièrement émietées à la main, ont été extraites avec 200 μ L d'eau ultrapure pendant 5 min, à température ambiante. L'extrait a été filtré avec un filtre PTFE hydrophile de 0,20 μ m (Millipore, Burlington, MA, USA).

Pour toutes les autres manipulations, un ratio de 5 g de feuilles séchées pour 100 mL d'eau a été adopté. Les feuilles grossièrement émietées à la main ont été extraites avec 50 mL d'eau ultrapure pendant 10 min, à température ambiante et sous agitation. L'extrait a été filtré avec un filtre papier plissé (Comptoir des produits filtrants, n° 0 ou 1).

Pour les injections en chromatographie préparative, une seconde filtration avec un filtre PTFE hydrophile de 0,45 μ m (Millipore, Burlington, MA, USA) a été réalisée.

2.2.2 Préparation des gammes en pH

La valeur du pH des solutions a été ajusté par ajout goutte-à-goutte de solution d'acide chlorhydrique (1 M) ou d'hydroxyde de sodium (1 M).

Le pH des solutions a été mesuré avec un pH-mètre Seven Easy équipé d'une électrode Ag/AgCl LE438 (Mettler Toledo).

2.2.3 Préparation des dépôts d'extrait aqueux coloré sur support

Un extrait coloré a été préparé selon le protocole d'extraction décrit ci-dessus (partie 2.2.1).

Cinq dépôts successifs de 10 μ L de solution ont été superposés sur une même zone de papier Whatman 1 (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK). Un dépôt de 10 μ L de solution a également été réalisé sur une lame de verre (de microscopie).

Après avoir laissé reposer la solution pendant 48 h, à température ambiante et à l'abri de la lumière, de nouveaux dépôts sur papier et sur lame de verre ont été réalisés selon le même protocole.

2.2.4 Préparation du colorant en poudre

Un extrait coloré a été préparé selon le protocole d'extraction décrit ci-dessus (partie 2.2.1).

Il a été transvasé dans un verre de montre et a été laissé évaporer jusqu'à siccité. Le résidu solide obtenu a été réduit en poudre avec un pilon et un mortier en agate.

Cette préparation a été réalisée à partir d'un extrait de feuilles du lot 2015.

2.2.5 Préparation des peintures

Une solution de colle d'amidon de maïs a été préparée à partir de 2,5 g d'amidon de maïs dans 50 mL d'eau chaude. Elle est laissée à refroidir avant utilisation. À titre informatif, le pH mesuré de la solution est de 5,9.

Une solution de gomme arabique a été préparée à partir de 5 g de gomme dans une fois son volume d'eau, préalablement portée à ébullition. Elle est laissée à refroidir avant utilisation. À titre informatif, le pH mesuré de la solution est de 4,8.

La préparation pour la couche préparatoire du support au gypse consiste en un mélange de 5 g de sulfate de calcium, 5 g de solution de colle de maïs et 12,5 mL d'eau. Du papier Whatman 1 est enduit au pinceau de cette préparation et laissé à sécher avant son utilisation.

Les peintures ont été préparées par mélange du colorant en poudre obtenu par évaporation de la solution colorée (partie 2.2.4) et d'un liant (colle d'amidon de maïs ou de gomme arabique). Des solutions à 60, 120 et 240 g/L ont été préparées, correspondant respectivement à 6, 12 et 24 mg de poudre dans 100 μ L de liant préalablement préparé selon la description ci-dessus.

Elles ont été appliquées au pinceau sur du papier Whatman 1 brut ou préalablement enduit d'une couche préparatoire au gypse.

2.2.6 Réextraction du colorant

Les dépôts de solution colorée sur papier ont été découpés en petits morceaux et immergés dans un mélange méthanol-eau 1 : 1 pendant 20 min. La solution colorée résultante a été filtrée avec un filtre PTFE hydrophile de 0,45 μ m (Millipore, Burlington, MA, USA).

2.3 Chromatographie liquide à haute performance

2.3.1 Chromatographie analytique

La plupart des analyses ^{xviii} a été réalisée avec un chromatographe UltiMate 3000 équipé d'une pompe binaire HPG 3400 RS, d'un passeur automatique WPS 3000 TRS, d'un four à colonne TCC 3000 SD et d'un détecteur à barrettes de diode DAD 3000 RS (ThermoScientific). L'appareil est piloté par les logiciels Xcalibur et Chromoleon Xpress.

Certaines analyses ont ponctuellement été réalisées sur un chromatographe 1100 équipé d'un dégazeur G1322A, d'une pompe quaternaire G1311A, d'une pompe binaire G1312A, d'un passeur automatique G1329A, d'un détecteur à barrettes de diode G1315A, et d'un détecteur de fluorescence G1321A (Agilent). L'appareil est piloté par le logiciel OpenLAB.

Le volume d'injection était de 5 μ L.

Phases stationnaires Cinq colonnes remplies de phase stationnaire C18 de dimension 125 x 2,1 mm avec un diamètre de particules de 5 μ m (Advion Interchim) ont été utilisées. Leurs caractéristiques sont rassemblées dans le Tableau 2.2.

La porosité moyenne, ϵ , des colonnes analytiques a été estimée à 0,62 par le fabricant ^{xix}.

Tableau 2.2 – Spécifications des cinq phases stationnaires.
Abr. = abréviation.

Nom	Abr.	Taille de pore (Å)	Surface spécifique (m ² /g)	Taux de carbone (%)	End-capping	Gamme de pH
puriFlash® C18-AQ	AQ	100	300	14	Mixed	2,0-7,5
Uptisphere® C18-NEC	NEC	120	320	16	Non	1,5-6,5
Uptisphere® Strategy™ C18-RP	RP	100	425	16	Mixed	1,5-8,0
puriFlash® C18-XS	XS	100	300	17	Multi-step	1,0-10,0
Uptisphere® Strategy™ C18-HQ	HQ	100	425	19	Multi-step	1,0-10,0

Une colonne de phase stationnaire C18 Aquasil de diamètre de particules de 3 μ m de dimension 100 x 2,1 mm et protégée par une pré-colonne de même phase de 10 x 2,1 mm (Thermo) a également été utilisée.

xviii. Notamment l'ensemble des analyses du Chapitre 4.

xix. Étude statistique menée par Interchim parmi les phases stationnaires qu'ils produisent.

Phases mobiles Le débit de la phase mobile a été fixé à 0,15 mL/min.

La phase mobile est un mélange hydro-organique constitué d'acétonitrile ou méthanol et de solution aqueuse, HCOOH 0,1 % pH 3 ou HCOONH₄ 5 mM pH 8.

Les analyses ont été réalisées en mode gradient d'élution. Les conditions appliquées sont systématiquement détaillées dans les légendes des chromatogrammes correspondants.

Détection La majorité des analyses a été réalisée avec un détecteur à barrettes de diode (DAD). La détection a été faite en mode total scan sur la plage de longueurs d'onde de 200 à 750 nm^{xx}. Les chromatogrammes ont été ensuite extraits aux longueurs d'ondes ou plages de longueurs d'onde désirées.

Pour certaines analyses, deux détecteurs en série ont été utilisés : un DAD et un spectromètre de masse (MS) ou un DAD et un détecteur de fluorescence (FLD). Pour le FLD, la détection a été réalisée avec une longueur d'excitation de 500 nm et une longueur d'onde d'émission de 600 nm. Pour la MS, les conditions de détection sont détaillées dans la partie 2.4 dédiée.

2.3.2 Chromatographie préparative

La purification des composés colorés a été réalisée sur un chromatographe puri-Flash® 5.050 piloté par le logiciel Intersoft® X "Genius" (Advion Interchim).

Le volume injecté était de 5 mL.

Phase stationnaire Une colonne préparative avec la phase stationnaire Uptisphere® Strategy™ C18-HQ 10 µm, de dimension 150 x 21,2 mm (Advion Interchim) a été utilisée.

La porosité moyenne, ϵ , des colonnes préparatives a été estimée à 0,67 par le fabricant^{xxi}.

xx. Un chromatogramme en total scan somme l'ensemble des longueurs d'onde de la gamme spectrale.

xxi. Étude statistique menée par Interchim parmi les phases stationnaires qu'ils produisent.

Phase mobile et gradient Le débit de la phase mobile a été fixé à 15 mL/min. Une séparation bidimensionnelle hors-ligne a été réalisée. Les conditions d'élution sont détaillées ci-dessous pour chacune des dimensions.

Première dimension : ¹D La phase mobile est constituée d'un mélange d'une solution aqueuse de formiate d'ammonium HCOONH₄ 5 mM pH 8 (A) et de méthanol (B). Un gradient linéaire est appliqué. Son profil est le suivant : 25 % B du début à 2,13 min, 25-55 % B de 2,13 à 16,53 min et 55 % B de 16,53 min à 28,53 min.

Seconde dimension : ²D La phase mobile est constituée d'un mélange d'une solution aqueuse d'acide formique HCOOH 0,1 % pH 3 (A) et de méthanol (B). Un gradient linéaire est également appliqué. Son profil est le suivant : 35 % B du début à 2,13 min, 35-55 % B de 2,13 à 11,73 min et 55 % B de 11,73 min à 23,73 min.

N.B. Les gradients présentés ci-dessus correspondent aux gradients théoriques calculés lors du transfert depuis la méthode optimisée en analytique. Ils permettent l'élution de l'ensemble des composés présents dans les chromatogrammes. En pratique, lors de la purification en chromatographie préparative, dès que les composés d'intérêt, X1 et X2, éluaient, la proportion de méthanol a été augmentée manuellement jusqu'à 80 % afin de permettre d'accélérer la sortie des composés les plus retenus.

2.3.3 Volumes des systèmes

Lors du transfert de méthode de l'échelle analytique à l'échelle préparative, la connaissance des volumes des systèmes a été nécessaire.

Volume mort de la colonne Le volume mort de la colonne, V_0 , correspond au volume de vide dans la colonne, c'est-à-dire qui n'est pas occupé par de la phase stationnaire. Il est calculé en prenant en compte le volume interne du cylindre correspondant à la colonne et de la porosité, ϵ , selon la formule suivante :

$$V_0 = \pi \cdot \frac{d_C^2}{4} \cdot L \cdot \epsilon \quad (2.9)$$

avec d_C le diamètre interne de la colonne et L sa longueur.

Le calcul donne pour la colonne analytique un V_0 de 0,3 mL et pour la colonne préparative de 35,5 mL.

Volume de délai (dwell volume) Le volume de délai (*dwell volume*), V_D , est défini comme le volume entre le point de formation du gradient et la tête de la colonne (Figure 2.11).

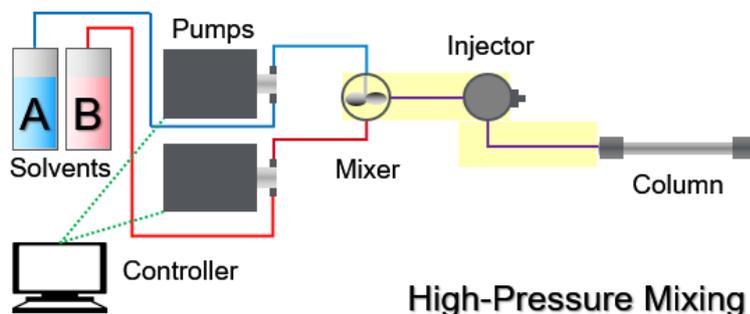
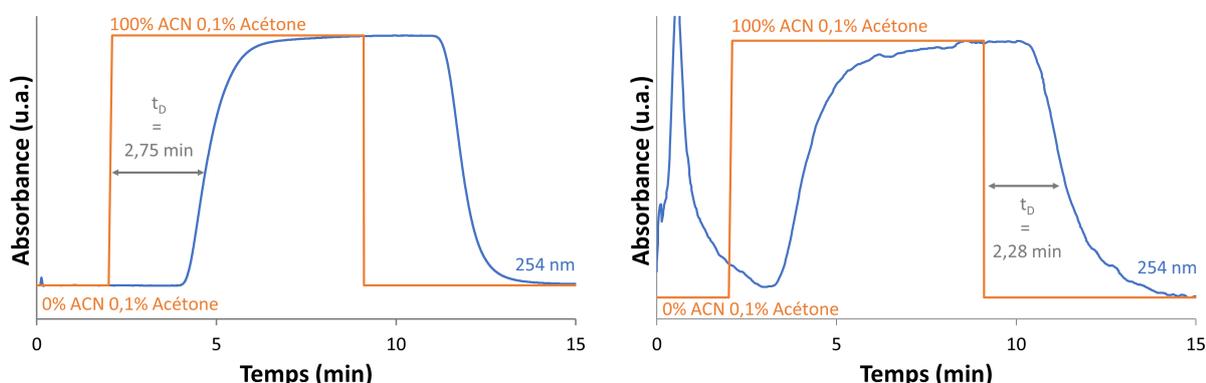


Figure 2.11 – Schématisation d'un système HPLC permettant de mettre en évidence en surbrillance jaune le volume de délai.
Extrait de [Know, 2020].

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer le volume de délai. La méthode que nous avons utilisée est la suivante :

La colonne est remplacée par un raccord à très faible volume mort. Le solvant A de la phase mobile est de l'acétonitrile et le solvant B, de l'acétonitrile avec 0,1 % d'acétone. Le gradient commence par un palier de 2 min avec 0 % de B, puis à 2,01 min un saut à 100 % de B est effectué et la proportion de 100 % B est maintenue pendant 9 min. Après 9 min, un nouveau saut pour retourner à 0 % de B est programmé. La détection est réalisée à 254 nm. Les absorbances obtenues à 0 % (A_{\min}) et à 100 % B (A_{\max}) sont relevées. Le temps où 50 % de la différence d'absorbance est atteinte est identifié. Le temps de délai, t_D , correspond à la différence entre ce temps et le début du saut. Pour obtenir le volume de délai V_D , on multiplie par le débit [Jablonski *et al.*, 2009].



(a) Détermination du volume de délai pour le système analytique. Débit : 0,15 mL/min

(b) Détermination du volume de délai pour le système préparatif. Débit : 7,5 mL/min

Figure 2.12 – Détermination des volumes de délai.

Les résultats obtenus sont présentés dans les Figures 2.12a, pour le système analytique et 2.12b, pour le système préparatif. Dans le cas du système préparatif, la largeur du pic d'injection ne permettant pas un retour à la ligne de base avant le saut à 100 % B, le calcul est effectué avec les données lors du saut pour le retour aux conditions initiales, mais le principe reste le même.

Des volumes de délais de 0,41 et 17,1 mL sont obtenus respectivement pour les systèmes analytique et préparatif.

Volume de décalage (*Offset volume*) Le volume de décalage (*offset volume*) correspond à la somme des volumes mort de la colonne, V_0 , et de délai, V_D . Il représente ainsi le décalage entre le point où les éluants sont combinés dans le mélangeur de la pompe pour obtenir une proportion donnée, et la détection des composés éluant à cette dite proportion. Il est notamment utile quand on cherche à estimer la proportion effective de solvant permettant l'élution d'un pic dans le chromatogramme (notamment dans l'élaboration de gradients ciblés, comme décrit dans la partie 2.3.5).

Il est estimé à 0,71 mL pour le système analytique et à 52,6 mL pour le système préparatif.

2.4 Spectrométrie de masse

2.4.1 Spectrométrie de masse à basse résolution simple MS

Un spectromètre Orbitrap™ Exactive™^{xxii} (ThermoScientific) équipé d'une source électrospray HESI II a été utilisé, couplé à la HPLC. L'appareil est piloté avec les logiciels Xcalibur et Exactive Tune. Les spectres de masse ont été enregistrés sur une gamme de m/z de 100 à 1500.

L'ionisation électrospray a été réalisée en mode positif (ESI^+). Les conditions suivantes ont été appliquées : potentiel du capillaire (*spray voltage*) 3 500 V, température du capillaire 275°C, débit du gaz de nébullisation (*sheath gas*) 15 unités arbitraires et débit du gaz de désolvatation (*auxiliary gas*) 5 unités arbitraires. L'azote a été utilisé comme gaz de nébullisation et de désolvatation.

xxii. Un problème technique a empêché durant la période de cette thèse l'utilisation de ce spectromètre à haute résolution.

2.4.2 Spectrométrie de masse à basse résolution tandem MS-MS

Les analyses ont été réalisées en couplage à la HPLC ou en infusion directe.

Pour les analyses en infusion directe, les composés analysés ont été solubilisés dans un mélange méthanol-eau 1 : 1 et les échantillons ont été introduits dans le spectromètre à un débit de 50 µL/min.

Un spectromètre triple quadripôle (QqQ) TSQ Quantum Ultra équipé d'une source source électrospray HESI II a été utilisé. L'appareil est piloté avec les logiciels Xcalibur et TSQ Tune.

L'ionisation électrospray a été réalisée en mode positif (ESI⁺). Les conditions suivantes ont été appliquées : potentiel du capillaire (*spray voltage*) 4 000 V, température du capillaire 275°C, pression du gaz de nébullisation (*sheath gas*) 15 unités arbitraires et pression du gaz de désolvatation (*auxiliary gas*) 5 unités arbitraires. L'azote a été utilisé comme gaz de nébullisation et de désolvatation.

Des énergies de collision de 10 à 40 eV ont été appliquées avec de l'argon comme gaz de collision.

2.4.3 Spectrométrie de masse à haute résolution - FT-ICR-MS

Les composés analysés ont été solubilisés dans un mélange méthanol-eau 1 :1. Ils ont été introduits dans le spectromètre avec un débit de 120 µL/h.

Les spectres de masse à haute résolution ont été enregistrés sur un spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR-MS) 7T APEX-Qe hybride équipé d'une source électrospray ESI Apollo II (Bruker, Billerica, MA, USA) en infusion directe. La gamme de masse scannée est de 100 à 1000 Da. Pour chaque spectre, 20 scans ont été accumulés.

Les analyses ont été menées en ionisations positive (ESI⁺) et négative (ESI⁻). En ESI⁺, les conditions suivantes ont été appliquées : potentiel du capillaire (*spray voltage*) 4 500 V, débit du gaz de nébullisation (*nebulizer gas*) 4,5 L/s et pression du gaz de séchage (*dry gas*) 1.2 bar.

La calibration a été réalisée avec une solution de trifluoroacétate de sodium (TFANa) à pH 3,5.

2.5 Spectroscopies d'absorption et de fluorescence UV-Vis

2.5.1 Spectroscopie d'absorption UV-Vis en transmission

Les analyses ont été réalisées dans des cuves en quartz Suprasil™ QS-100 de 2 ou 10 mm (Hellma). Une cuve remplie d'eau ultra-pure a été utilisée comme référence.

Deux spectrophomètres d'absorption en transmission ont été utilisés.

Le premier est un spectrophotomètre Cary 5000 (Agilent) permettant des mesures dans le domaine UV, visible et proche infrarouge (200-1000 nm). Il possède deux sources lumineuses : une lampe tungstène-halogène et une lampe à arc au deutérium. Les détecteurs sont un PMT R928 dans la gamme UV-Vis et PdS pour le proche IR avec des résolutions spectrales inférieures au nm. Il est piloté par le logiciel Cary WinUV.

Le second est un spectrophomètre Duetta (Horiba) permettant la mesure combinée de l'absorption et de la fluorescence. Pour l'absorption, la source lumineuse est une lampe à arc au xénon (75 W) et le détecteur est une photodiode de silicium, permettant l'acquisition des spectres entre 250 et 1000 nm, avec une résolution spatiale de ± 1 nm. Il est piloté par le logiciel EZSpec.

2.5.2 Spectroscopie d'absorption UV-Vis en réflexion diffuse (par fibre optique)

Pour les mesures en réflexion, un spectrophotomètre FieldSpec4 Hi-Res (ASD) a été utilisé dans le domaine proche UV, visible et infrarouge (350-1000 nm). Le capteur est une barrette de photodiodes avec une résolution spectrale de 3 nm.

L'échantillon à analyser est éclairé par une source halogène, positionnée perpendiculairement à sa surface (0°C). Le signal réfléchi est collecté par une fibre optique à 45°C. Deux lasers en croix, de faible intensité, sont alignés avec le point de focalisation de la fibre de collecte, permettant un réglage précis et répétable de la distance de travail. La taille du point de mesure est d'environ 5 mm de diamètre.

À chaque acquisition, 50 spectres sont accumulés avec un temps d'intégration de 8,5 ms chacun.

Afin de calibrer l'intensité mesurée (I), l'intensité réfléchie par un blanc de référence^{xxiii} (B) et du bruit noir^{xxiv} (N) ont été mesurées. La valeur finale du facteur de réflexion R convertie par le logiciel d'acquisition (Indico Pro) pour chaque longueur d'onde est la suivante :

$$R = \frac{I - N}{B - N} \quad (2.10)$$

La valeur du facteur de réflexion ainsi obtenue est comprise entre 0 et 1 et indépendante des conditions d'éclairage et des caractéristiques du capteur.

Les données obtenues à partir des spectres de réflexion ont été converties en coordonnées colorimétriques dans l'espace de couleurs $L^*a^*b^*$ CIE 1976 avec un illuminant D65 et un angle d'observation de 2° ^{xxv}. Les écarts de couleurs ont été évalués par le calcul de la distance chromatique $\Delta E(76)$, d'après l'équation (2.8). Les coordonnées rouge-vert-bleu (RVB) ont également été calculées^{xxvi} afin de pouvoir représenter un rendu visuel des points de coordonnées $L^*a^*b^*$ par des patchs de couleur associés.

2.5.3 Spectroscopie de fluorescence

Les analyses des solutions ont été réalisées dans des cuves en quartz Suprasil™ QS-100 de 2 ou 10 mm (Hellma).

Deux spectrofluorimètres ont été utilisés.

Le premier est un spectrofluorimètre Cary Eclipse Fluorescence (Agilent). Il a été utilisé pour la mesure de la fluorescence de solutions et d'échantillons solides. La source est une lampe flash au xénon (80 Hz) permettant une excitation sur la gamme 200-900 nm. Le détecteur est un tube photomultiplicateur R928 permettant une détection sur la gamme 200-900 nm.

Le second est le spectrophomètre Duetta (Horiba), précédemment décrit, et permettant la mesure combinée de l'absorption et la fluorescence. Il a été utilisé pour la mesure de la fluorescence de solutions. La source lumineuse est une lampe à arc au xénon (75 W) permettant une excitation de 250 à 1000 nm. Le détecteur est un capteur photographique CCD/Spectrograph permettant une détection sur la gamme 250-1100 nm. Il permet d'appliquer une correction du signal de fluorescence pour prendre en compte l'auto-absorption (effet de filtre interne).

xxiii. Constitué d'une plaque de Spectralon® (Labsphere) réfléchissant 100 % de la lumière pour toutes les longueurs d'onde.

xxiv. Généré par le capteur lorsque la fibre de collection est obstruée.

xxv. Grâce à un calculateur développé en interne au laboratoire.

xxvi. Avec le même calculateur.

2.6 Spectroscopies vibrationnelles

2.6.1 Spectroscopie d'absorption infrarouge

En transmission, les spectres d'absorption infrarouge ont été obtenus avec un spectrophotomètre FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific) équipé d'un microscope infrarouge Nicolet Continuum XL (Thermo Electron Corporation) avec un détecteur tellure de mercure-cadmium (MCTA). Les mesures ont été réalisées via l'objectif x32. Les spectres ont été enregistrés sur une gamme entre 500 et 4000 cm^{-1} , avec une résolution de 4 cm^{-1} . Pour chaque spectre, 200 scans ont été accumulés.

En réflexion totale atténuée, les mesures d'absorption infrarouge ont été faites avec un spectrophotomètre FT-IR Nicolet iS5 (Thermo Scientific) équipé d'un module ATR iD7 avec un détecteur sulfate de triglycine deutéré (DTGS). Les spectres ont été enregistrés sur une gamme entre 600 et 4000 cm^{-1} , avec une résolution de 4 cm^{-1} . Pour chaque spectre, 512 scans ont été accumulés.

Ces deux appareils sont pilotés par le logiciel OMNIC (Thermo Scientific).

2.6.2 Spectroscopie de diffusion Raman

Les spectres de diffusion Raman ont été enregistrés avec un spectromètre inVia (Renishaw) équipé d'un microscope confocal et de deux lasers Nd:YAG (532 et 785 nm). Les mesures ont été réalisées via l'objectif x50 (Leica). Les spectres ont été enregistrés entre 400 et 1800 cm^{-1} , avec une résolution de 2 cm^{-1} . Selon les échantillons, les paramètres suivants ont été adaptés : puissance du laser entre 0,1 et 1 %, temps d'exposition de 3 à 60 s, nombre d'accumulations entre 1 et 20.

Le logiciel d'acquisition associé à cet équipement est le logiciel WIRE 3.3 (Renishaw). La ligne de base des spectres a été soustraite automatiquement avec le logiciel OMNIC.

2.7 Spectroscopie RMN

Les composés purifiés ont été solubilisés dans du DMSO- d_6 et du CD_3OD . Des tubes RMN en verre Select Series™ 3 mm (Norell, Morganto, NC, USA) ont été utilisés.

Les spectres RMN 1D ^1H et 2D COSY, NOESY, ROESY, HSQC et HMBC ont été enregistrés à 298 K avec un spectromètre AVANCE III HD 600 MHz (Bruker, Wissembourg, France) équipé d'une sonde cryogénique TCI 5 mm (Z-gradient) triple résonance (^1H - ^{13}C - ^{15}N).

L'acquisition et le traitement des spectres a été réalisé avec le logiciel TopSpin.

2.8 Vieillissements artificiels à la lumière

2.8.1 Enceinte de vieillissement

L'enceinte de vieillissement Xenotest ALPHA+ (Atlas) a été utilisée. Les échantillons ont été placés sur des supports en rotation autour d'une lampe xénon équipée un filtre simulant le spectre solaire derrière une vitre de 3 mm d'épaisseur (simulation de conditions intérieures). L'irradiance a été fixée à 50 W/m^2 dans la gamme 300-400 nm. Les valeurs des paramètres liés aux conditions dans la chambre de vieillissement sont les suivantes : une température de l'étalon noir^{xxvii} (BST, *Black-standard temperature*) de $40 \pm 5^\circ\text{C}$, une température de chambre (CHT, *Chamber temperature*) de $25 \pm 5^\circ\text{C}$ et une humidité relative de $50 \pm 5 \%$. Les échantillons ont été exposés en continu à la lumière durant 26 h.

2.8.2 Micro-décolorimétrie (MFT)

Les expériences de micro-décolorimétrie ont été réalisées avec une lampe xénon (75 W) équipée d'un filtre UV et d'un filtre de densité neutre de 0,09. L'échantillon est éclairé via une fibre optique de 600 μm de diamètre, au bout de laquelle une série de lentilles est disposée afin de concentrer le faisceau de lumière sur zone de diamètre inférieure à 0,5 mm de diamètre. Comme pour les mesures en réflexion diffuse, la collection du signal se fait avec une géométrie de $0^\circ/45^\circ$. Le spectrophotomètre FieldSpec4 Hi-Res (ASD) piloté par le logiciel Indico Pro a été utilisé pour la détection.

2.9 Photographies sous UV

Pour les photographies prises sous éclairage UV, une source lumineuse Crime-lite® 2 UV (Foster + Freeman) avec une longueur d'onde λ_{max} de 365 nm a été utilisée. Le temps de pose était de 20 s.

xxvii. Permet de contrôler la température superficielle des éprouvettes. Étant donné qu'il n'est pas pratique de surveiller individuellement la température de chaque éprouvette, la température est mesurée sur un capteur thermique à surface noire exposé de la même façon que les éprouvettes.

Chapitre 3

Étude de l'extrait de *Justicia spicigera*

Comme évoqué précédemment, l'hypothétique identification du colorant extrait de *Justicia spicigera* dans des peintures brunes du *Codex Borbonicus* par des techniques spectroscopiques *in situ* a motivé son étude approfondie en laboratoire. Les différentes expériences entreprises ont pour objectif final de relier la composition moléculaire du colorant à sa signature spectrale. *In fine*, on cherchera à caractériser les molécules colorantes présentes dans l'extrait et à comparer leurs propriétés spectrales à celles de l'extrait total afin de pouvoir interpréter la signature spectrale enregistrée sur le manuscrit.

Ce chapitre vise à enrichir les connaissances concernant l'extraction, les réponses spectrales et la composition du colorant extrait des feuilles de *Justicia spicigera* ainsi que sa préparation en tant que peinture.

Dans un premier temps, le choix des conditions d'extraction du colorant est présenté et discuté.

Par la suite, les caractéristiques spectrales telles que l'absorption, l'émission de fluorescence UV-Vis et la diffusion Raman obtenues pour le colorant bleu-violet extrait et de ses dépôts sur support solide sont détaillées. Ces signatures spectrales sont notamment comparées à celles obtenues pour les peintures du *Codex Borbonicus*. Une étude préliminaire de la composition moléculaire par chromatographie en phase liquide est exposée, avec notamment pour but de repérer les principaux composés colorés.

L'extrait coloré s'étant révélé instable, son évolution au cours du temps a ensuite été considérée. Les résultats du suivi des propriétés spectrales et de la composition moléculaire au cours du temps sont présentés.

Nous nous sommes ensuite intéressés au mode de préparation du colorant en tant que peinture. Pour rappel, aucune source historique ne mentionne une telle préparation et les couches picturales du *Codex Borbonicus* dans lesquelles a été suspecté *Justicia*

spicigera sont brunes. Dans nos expériences, nous avons donc cherché à évaluer dans quelle mesure il était possible de reproduire l'apparence et la signature spectrale des peintures du manuscrit à partir du colorant bleu-violet extrait des feuilles de *Justicia spicigera*.

Pour conclure ce chapitre, une étude de vieillissement artificiel à la lumière a été menée afin d'estimer la sensibilité du colorant à la lumière. Nous souhaitons notamment évaluer la stabilité des signaux spectraux caractéristiques de *Justicia spicigera* face à un vieillissement afin d'estimer les possibilités d'identification de ce colorant dans des objets historiques dégradés.

N.B. La caractérisation spectrale de l'extrait aqueux de *Justicia spicigera* et l'étude préliminaire de sa composition, détaillées dans ce chapitre (partie 2), ont fait l'objet d'une publication dans *The Analyst* [Arberet *et al.*, 2021].

Sommaire

1	Extraction du colorant	91
2	Caractérisation de l'extrait aqueux	95
2.1	Absorption et émission de fluorescence UV-Vis	95
2.1.1	Extrait en solution	95
2.1.2	Dépôt sur support	98
2.2	Diffusion Raman	100
2.3	Composition de l'extrait	101
3	Suivi de l'évolution de l'extrait aqueux	107
3.1	Influence sur l'absorption et la fluorescence de l'extrait	108
3.2	Influence sur le signal Raman	110
3.3	Influence sur la composition moléculaire	111
3.4	Évolution de l'extrait déposé sur papier	114
4	Préparation du colorant pour une application en peinture	117
4.1	Élaboration d'un colorant en poudre	117
4.2	Préparation de couches picturales	121
5	Vieillissement artificiel à la lumière	128
5.1	Vieillissement des dépôts d'extrait aqueux	129
5.2	Vieillissement des couches picturales	132
6	Bilan du chapitre	139

1 Extraction du colorant

Commençons par nous intéresser aux conditions d'extraction du colorant à partir de la matière première végétale : les feuilles de *Justicia spicigera*ⁱ. L'extraction solide-liquide consiste en la mise en contact de la matière végétale et d'un fluide afin d'en extraire des composés d'intérêt, dans notre cas les molécules colorantes. Lors de l'extraction, plusieurs paramètres influent sur les caractéristiques de l'extrait obtenu (couleur, signature spectrale, composition). Ils sont reliés à la matière première végétale et à sa préparation, aux propriétés du solvant et aux modalités du procédé d'extraction lui-même [Handa *et al.*, 2008].

La matière première végétale est l'un des paramètres les plus importants, mais c'est également le plus difficile à maîtriser. De fait, pour une même espèce de plante, la teneur des différents constituants peut dépendre des conditions climatiques, de l'origine géographique, des pratiques de culture, etc. Il faut également prendre en compte les étapes de traitement du végétal (lavage, séchage, tri, découpe, broyage) ayant lieu en amont de l'extraction [Brenac, 2014].

Le choix du solvant joue un rôle important dans l'extrait final obtenu, les composés extraits dépendant de leur affinité avec le solvant extracteur [Azmir *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2018].

Les paramètres propres au procédé comme la durée d'extraction, la température, la pression, l'agitation, etc. influencent également la teneur en composés d'intérêt des extraits obtenus [Zhang *et al.*, 2018].

Notre but étant de caractériser le colorant extrait de *Justicia spicigera* tel qu'il aurait pu être obtenu pour la préparation des peintures du *Codex Borbonicus* au 16^{ème} siècle, nous nous limiterons à des conditions d'extraction cohérentes avec des pratiques que nous pouvons imaginer être appliquées à cette époqueⁱⁱ. Par ailleurs, comme nous le détaillerons un peu plus loin, le colorant est très facilement et rapidement obtenu lors d'une extraction par simple macération dans de l'eau, à température ambiante. Nous n'avons donc pas particulièrement cherché à optimiser son extraction. Nous avons cependant consciencieusement fixé certains des paramètres pour limiter les variations de l'extrait résultant. Les conditions d'extraction retenues sont présentées ci-dessous.

i. Fournies par le Jardin botanique Val Rahmeh de Menton.

ii. Nous ne disposons que de peu d'informations historiques sur l'extraction et la préparation du colorant par les Aztèques au 16^{ème} siècle, mais nous pouvons supposer que les pratiques léguées de génération en génération et encore utilisées par les populations locales d'Amérique Centrale sont de bons indicateurs (Chapitre 1, partie 3.2.3).

Concernant le **matériel végétal**, nous ne pouvons évidemment pas garantir qu'il soit strictement identique à celui rencontré dans la vallée de Mexico-Tenochtitlan au 16^{ème} siècle. Mais comme nous allons le voir, malgré les potentielles variations dues au climat ou à l'origine géographique, les feuilles de *Justicia spicigera* fournies par le Jardin botanique Val Rahmeh de Menton contiennent bien les composés responsables des signaux spectraux enregistrés dans les peintures du *Codex Borbonicus*.

Des feuilles fraîches de *Justicia spicigera* sont *a priori* plutôt utilisées pour la production du colorant au vu de la proximité entre les lieux d'approvisionnement en matériel végétal et les lieux de fabrication des objets (Chapitre 1, partie 3.2.3). Toutefois, nous avons fait le choix de travailler avec des **feuilles séchées**. En effet, dans la mesure où le matériel végétal n'était pas disponible à proximité des laboratoires d'étude, travailler avec des feuilles fraîches s'est révélé rapidement assez contraignant. La conservation des feuilles fraîches dans le temps était assez limitée (de l'ordre d'une semaine) et cela aurait impliqué des envois de feuilles plus fréquents, augmentant la potentielle variabilité due à la saison de prélèvement, aux conditions extérieures, etc ⁱⁱⁱ. Ainsi, nous avons cherché un mode de stockage pratique à mettre œuvre et pour lequel les propriétés de l'extrait en résultant (composition et réponse spectrale) étaient comparables à celles des feuilles fraîches. Le potentiel du séchage et de la congélation a été évalué dans des expériences préliminaires (Annexe D). Nous avons pu mettre en évidence que, contrairement à la congélation, le procédé de séchage ne semble affecter ni la composition de l'extrait de *Justicia spicigera* (Figure D.3) ni les propriétés spectrales (émission de fluorescence et Raman, Figures D.4 et D.5) ayant permis son identification dans le *Codex Borbonicus* ^{iv}. Dès leur réception au laboratoire, nous avons donc procédé au séchage des feuilles fraîches avant leur stockage et leur future utilisation.

Les feuilles séchées ont été **grossièrement effritées** à la main afin d'augmenter la surface de contact lors de la macération. Elles n'ont toutefois pas été réduites jusqu'à l'état de poudre afin de faciliter l'étape ultérieure de filtration (risque de bouchage des filtres).

iii. Ces propos sont illustrés en Annexe D (Figures D.1 et D.2), où nous avons pu constater une différence dans la composition des extraits de différents lots de feuilles après séchage. Cela n'a toutefois pas fait l'objet d'une étude plus approfondie.

iv. Ou tout du moins, pas si les feuilles sont mises à sécher alors qu'elles sont encore bien fraîches et en bon état. En effet, nous avons pu remarquer que lorsque l'opération de séchage est réalisée alors que l'état des feuilles a déjà commencé à se dégrader, il n'est ensuite pas possible d'extraire le beau colorant violet, des extraits bruns sont plutôt obtenus.

Concernant le **solvant d'extraction**, dans l'histoire de l'extraction végétale, les premiers procédés s'appuyaient sur des extractions aqueuses, essentiellement ou des fermentations alcooliques^v [Handa *et al.*, 2008]. Nous avons fait le choix de nous focaliser sur une **extraction à l'eau**. Cela est cohérent avec les pratiques locales reportées pour l'extraction du colorant de *Justicia spicigera* (Chapitre 1, partie 3.2.3). Même si des procédés de fermentation sont également ponctuellement cités, nous avons décidé de réaliser l'extraction dans les conditions les plus simples possibles et de ne pas ajouter ce paramètre supplémentaire.

Par ailleurs, des tests rapides d'extraction avec des solvants organiques ont montré que l'eau restait le meilleur solvant pour extraire le colorant de *Justicia spicigera* (Annexe D : Figures D.8a et D.8b).

Les principaux modes d'extraction végétale compatibles avec des pratiques anciennes sont la macération, l'infusion, la décoction et la percolation. Pour la macération, l'extraction est réalisée en laissant en contact le matériel végétal et le solvant à température ambiante. Dans le procédé d'infusion, le solvant bouillant est versé sur les plantes, puis le mélange est laissé à refroidir pour un temps donné. Lors d'une décoction, le mélange constitué du solvant et des plantes sont portés à ébullition. La percolation consiste à faire passer le solvant extracteur à travers le matériel végétal. La solution obtenue à l'issue de ces procédés (solvant + composés d'intérêt) constitue l'extrait. Il est ensuite isolé de la matière première végétale par filtration, centrifugation ou décantation.

Dans les procédés de teinture à partir du colorant de *Justicia spicigera* reportés dans le Chapitre 1 (partie 3.2.3), nous identifions principalement des extractions par macération ou décoction. Nous avons fait le choix du procédé le plus simple : la **macération**, ne faisant pas intervenir de chauffage du mélange. En effet, nous avons pu remarquer qu'en chauffant le mélange, l'évaporation de la solution entraînait la formation d'un précipité. C'est pourquoi, pour limiter ce phénomène complexifiant l'extrait obtenu, nous avons préféré une extraction à **température ambiante**. Nous noterons qu'il n'est pas exclu que la température ambiante à laquelle nous avons été amenés à travailler diffère de celle rencontrée en Amérique Centrale au 16^{ème} siècle; nous estimons cependant que cet écart a une influence négligeable.

Enfin, la durée de l'extraction a été établie. Selon les procédés de teinture décrits dans le Chapitre 1 (partie 3.2.3), les temps de macération sont assez variables, pouvant aller de 30 min à plusieurs jours. Dans la plupart des exemples, ils ne sont pas mentionnés précisément et sont probablement adaptés au cas par cas par l'artisan, qui connaît amplement le matériel végétal avec lequel il travaille. Une étude préliminaire nous a

v. Processus biochimique par lequel des sucres des plantes sont transformés en alcool dans un milieu liquide et en l'absence d'oxygène.

permis d'estimer que le temps de macération avait peu d'influence sur la composition et la concentration de l'extrait (Annexe D : Figures D.6 et D.7). Ainsi, pour des raisons pratiques, nous avons travaillé avec des temps de macération plutôt courts de **5 à 10 min.**

Le colorant a donc été extrait des feuilles séchées et effritées de *Justicia spicigera* par macération dans de l'eau pour une durée de 5 à 10 min, à température ambiante.

Au début de l'extraction, la solution se teinte en rose-rouge (Figure 3.1a) puis vire au violet au fur et à mesure (Figure 3.1b). Après sa filtration, permettant de retirer les feuilles, l'extrait obtenu présente une teinte violette vive, avec des reflets rouges (Figure 3.1c). Comme le mentionnait [Thomas, 1866], nous observons que la coloration de la solution varie du bleu-violet au rouge, selon l'angle d'observation par rapport à l'orientation d'une source lumineuse. Cela pourrait s'expliquer par l'impression d'une certaine fluorescence de la solution obtenue.

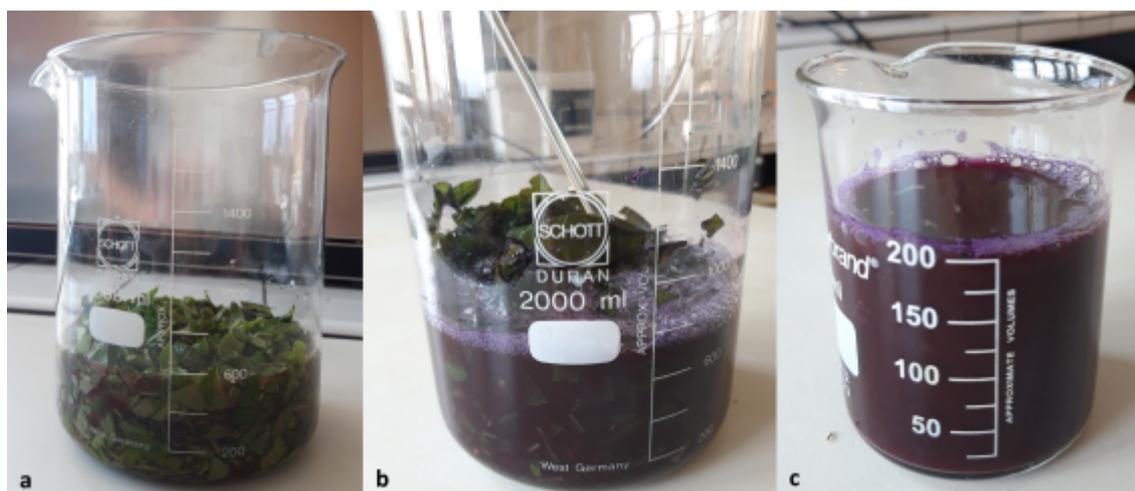


Figure 3.1 - Extraction du colorant des feuilles de *Justicia spicigera*.
a) Apparition d'une teinte rosée lors de la mise en contact des feuilles et de l'eau,
b) Développement du violet intense et c) Extrait après filtration. ©Éline Jourdan.

La partie suivante concerne l'analyse plus détaillée de l'extrait coloré ainsi obtenu. Les propriétés spectrales de la solution et une première évaluation de sa composition chimique ont été étudiées.

2 Caractérisation de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux coloré violet obtenu par macération des feuilles de *Justicia spicigera* a été étudié par spectroscopie d'absorption et de fluorescence UV-Vis.

Le colorant de *Justicia spicigera* ayant été reporté comme sensible aux variations de pH du milieu [Thomas, 1866, Parkin, 1905] (Chapitre 1, partie 3.3.1), les réponses spectrales ont été enregistrées pour différentes conditions de pH. Ces premières expériences ont eu pour but premier de comprendre le comportement global de la solution. Elles ont également permis de choisir les paramètres pour les analyses de la composition chimique par chromatographie en phase liquide (pH de la phase mobile, longueur d'onde de détection). Une première évaluation de la composition moléculaire de l'extrait a ainsi été menée. Les principaux composés colorés ont été identifiés et leurs propriétés (rétention, absorption UV-Vis, spectre de masse) ont été comparées à celles de familles de colorants connus.

En parallèle, l'extrait coloré a été déposé sur support solide afin de pouvoir comparer ses propriétés d'absorption, d'émission de fluorescence et de diffusion Raman à celles enregistrées pour les peintures brunes du *Codex Borbonicus* dans lesquelles a été identifié *Justicia spicigera*.

2.1 Absorption et émission de fluorescence UV-Vis

L'extrait aqueux coloré de *Justicia spicigera* obtenu dans les conditions décrites précédemment (partie 1) a tout d'abord été analysé par spectroscopie d'absorption et d'émission de fluorescence UV-Vis. Les analyses ont été menées pour l'extrait coloré en solution, mais aussi déposé sur support solide.

2.1.1 Extrait en solution

Les spectres d'absorption de l'extrait aqueux ont été enregistrés pour différentes valeurs de pH et sont présentés dans la Figure 3.2.

L'extrait brut, d'une valeur de pH d'environ 8, présente une coloration violette et un maximum d'absorption dans le visible détecté à environ 590 nm. Quand le pH est augmenté jusqu'à 10, l'absorbance augmente légèrement, mais aucun changement dans la forme du spectre n'est observé. Dans des conditions de pH inférieur à 6, l'extrait présente une coloration orange, avec un décalage du maximum d'absorption autour de 490 nm. L'équilibre entre les deux formes du colorant semble avoir lieu à un pH proche de 6, pour lequel les deux maxima d'absorption sont enregistrés résultant en

une coloration rouge. Ces résultats sont cohérents avec ceux déjà publiés pour l'extrait de *Justicia spicigera* par [Ushida *et al.*, 2005, Espinosa-Morales *et al.*, 2012].

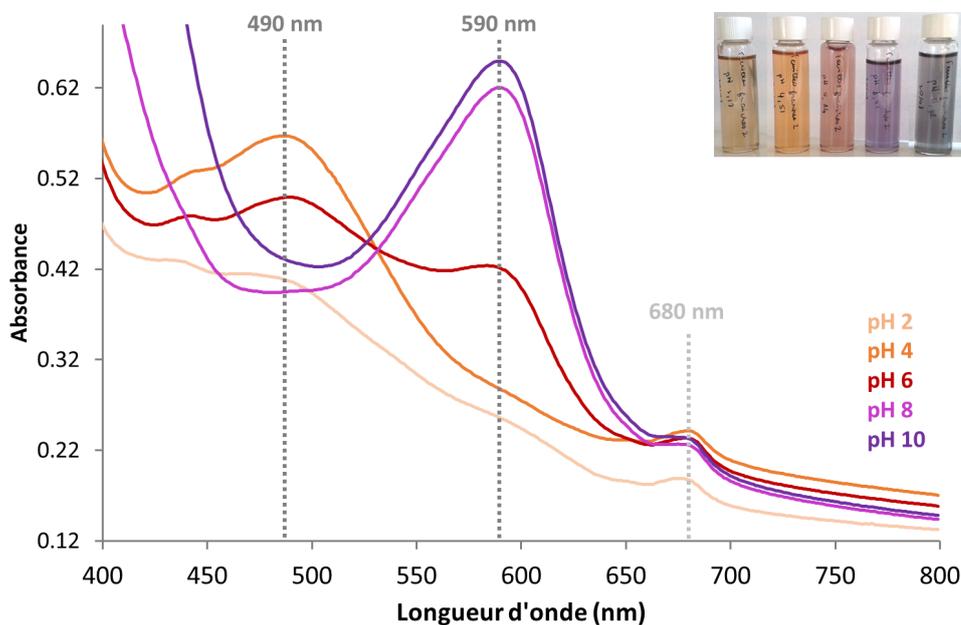


Figure 3.2 – Spectres d'absorption Vis pour l'extrait aqueux de feuilles de *J. spicigera*, à différentes valeurs du pH. Lot de feuilles : 03/2018. Encart : Photographie des solutions de la gamme de pH.

Ces données montrent également qu'il est *a priori* possible d'écarter le fait que les colorants principaux de l'extrait de *Justicia spicigera* soient des anthocyanes, contrairement à ce qui a été suggéré par plusieurs auteurs [Casanova-González *et al.*, 2012, Espinosa-Morales *et al.*, 2012]. En effet, pour cette famille de colorants, dont la couleur est également dépendant des conditions de pH, les couleurs et les propriétés d'absorption associées sont différentes de celles obtenues pour l'extrait de *Justicia spicigera*. Pour des pH inférieurs à 3, un extrait de couleur rouge (λ_{\max} autour de 520 nm) est attendu avec la prédominance du cation flavylium. Pour des valeurs de pH supérieures à 4, les formes neutres et anioniques menant à des colorations bleue-violettes sont instables et ne sont pas observées; elles sont hydratées en hémicétal incolore puis en chalcones, jaunes pâles [Castañeda-Ovando *et al.*, 2009, Houghton *et al.*, 2021].

Par contre, comme mentionné par [Thomas, 1866] (Chapitre 1, partie 3.3.1), le comportement en absorption de l'extrait de *Justicia spicigera* en fonction du pH du milieu est proche de celui observé pour des colorants de la famille des phénoxazones (la teinture de tournesol ou l'orseille^{vi}). Ils présentent en solution une coloration orange-rouge

vi. Appellation vernaculaire ambiguë en français, orseille désigne quelques espèces de lichens dont on extrait le mélange colorant, mais aussi le nom du mélange colorant lui-même (composé d'hydroxy- et d'amino-orcéines).

dans des conditions acides (λ_{\max} autour de 500 nm) qui vire au bleu-violet pour des pH supérieurs à 7 (λ_{\max} autour de 575 nm avec un épaulement vers 540 nm) [Beecken *et al.*, 2003, Clementi *et al.*, 2006, Aceto *et al.*, 2017].

Par ailleurs, les pics d'absorption minoritaires enregistrés autour de 440 et 680 nm, indépendamment de la valeur de pH peuvent être attribués à l'absorption de la chlorophylle [Alves *et al.*, 2018]. Même si les chlorophylles sont plutôt hydrophobes, elles ont pu être extraites avec le colorant principal. La présence de flavonoïdes, reporté dans l'extrait de *Justicia spicigera* par [Dominguez *et al.*, 1990, Euler et Alam, 1982, Esquivel-Gutierrez *et al.*, 2013, Ortiz-Andrade *et al.*, 2012], peut expliquer l'intense absorption enregistrée pour les longueurs d'ondes inférieures à 450 nm [Jurasekova *et al.*, 2006, Surowiec *et al.*, 2008].

La fluorescence de l'extrait aqueux brut (pH 8) de *Justicia spicigera* a également été enregistrée. En solution, l'extrait présente un maximum d'émission de fluorescence centré à 620 nm avec un épaulement à 675-685 nm (Figure 3.3).

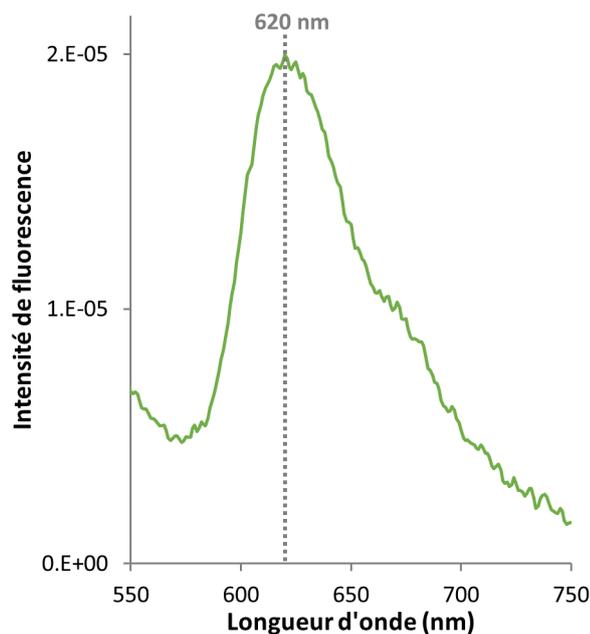


Figure 3.3 – Spectre d'émission de fluorescence de l'extrait aqueux brut de *J. spicigera*.
Lot de feuilles : 03/2018. λ_{ex} 365 nm.

2.1.2 Dépôt sur support

Afin de permettre une comparaison avec les profils spectraux obtenus sur le *Codex Borbonicus*, la solution aqueuse colorée brute (pH 8) a été déposée sur un support papier. Le papier Whatman 1 a été choisi, car il présente l'avantage d'être neutre et de ne pas contenir d'additifs particuliers, limitant ainsi son influence sur la coloration obtenue lors du dépôt.

Le dépôt obtenu présente une coloration violette vive (Figure 3.4a). Son apparence est bien différente des couches brunes obtenues dans le *Codex Borbonicus*, ce qui suggère une préparation particulière du colorant pour son utilisation en tant que peinture. Cet aspect sera traité dans une partie ultérieure (partie 4). Les propriétés spectrales (spectres de réflexion, d'émission de fluorescence et Raman) ont toutefois été enregistrées pour l'échantillon violet, afin de les relier à celles obtenues pour l'extrait liquide.

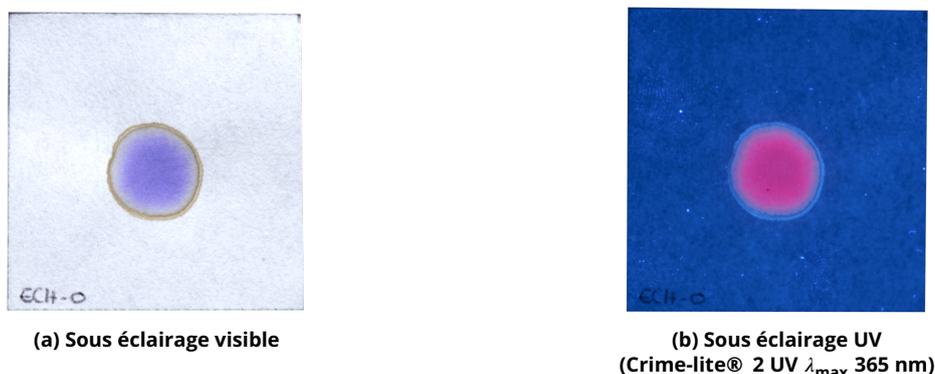


Figure 3.4 – Photographie du dépôt brut (pH 8) sur papier Whatman 1 de la solution de *J. spicigera*.

Premièrement, le spectre de réflexion dans le visible a été enregistré et est présenté en Figure 3.5a. Une bande d'absorption est détectée à 599 nm, avec un épaulement à 565 nm. Cela correspond à ce qui a été observé en solution (Figure 3.2), avec un léger décalage du maximum d'une dizaine de nm. Comme nous pouvons nous y attendre au vu de l'apparence du dépôt coloré, le spectre de réflexion diffère grandement de celui qui a été obtenu sur les peintures brunes du *Codex Borbonicus* (Chapitre 1, Figure 1.19a).

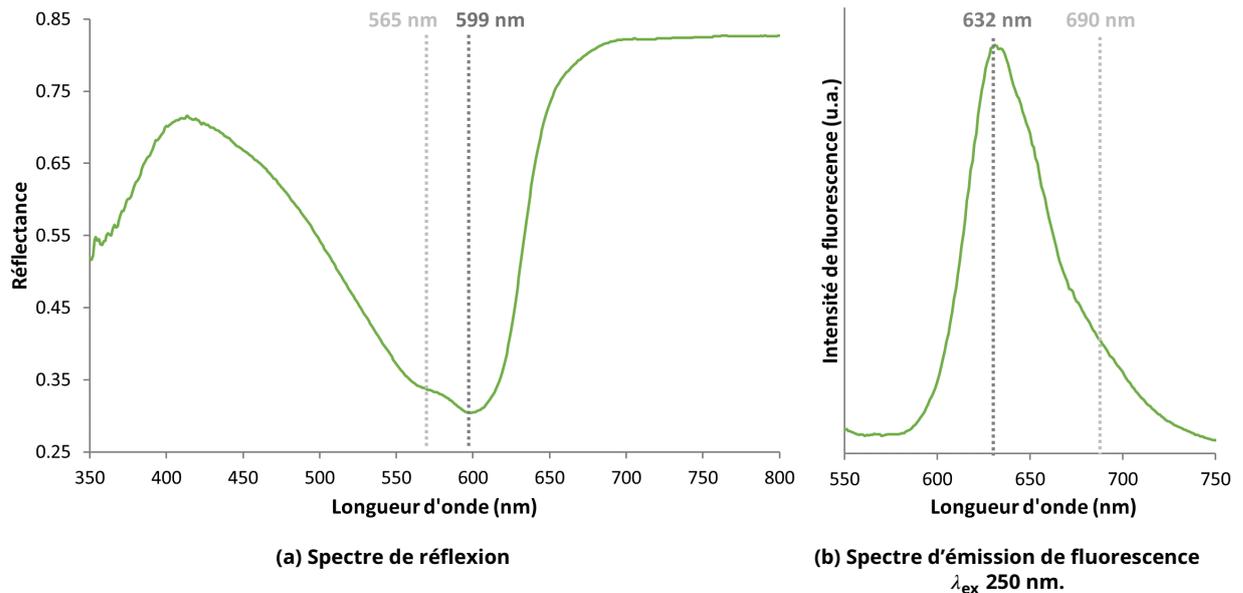


Figure 3.5 – Spectres de réflexion et d'émission de fluorescence de l'extrait aqueux de *J. spicigera* brut (pH 8) déposé sur papier Whatman 1.

Conformément à ce que l'on a pu observer en solution, nous avons pu constater une similarité entre les spectres de réflexion de l'extrait de *Justicia spicigera* et de l'orseille. Pour cette dernière, deux bandes d'absorption sont détectées : la première autour de 545-550 nm et la seconde dans la gamme 585-595 nm [Aceto *et al.*, 2017].

Éclairé sous UV, l'extrait déposé sur papier présente une intense fluorescence rouge (Figure 3.4b). Le spectre d'émission de fluorescence a été enregistré pour une longueur d'onde excitatrice λ_{ex} de 250 nm (Figure 3.5b). Le maximum d'émission est centré autour de 632 nm, avec un épaulement vers 690 nm. Ces données sont cohérentes avec les propriétés d'émission de l'extrait en solution. Le décalage du maximum entre l'extrait en solution et le dépôt sur support a été également observé pour d'autres colorants, et pourrait s'expliquer par l'interaction avec le support [Miliani *et al.*, 1998]. Le maximum d'émission de l'extrait déposé sur papier est en adéquation avec celui enregistré pour les couches brunes du *Codex Borbonicus* aux alentours de 630 nm (Chapitre 1, Figure 1.19b).

Ainsi, même si la couleur apparente du dépôt de la solution sur papier est différente de celle des peintures du *Codex Borbonicus*, les fluorophores détectés dans celles-ci semblent être présents dans l'extrait coloré. Cette observation est toutefois à nuancer car l'intensité d'émission de fluorescence semble bien plus importante pour le dépôt de solution (Figure 3.5b) que pour les peintures du manuscrit (Figure 1.19b)^{vii}. Nous ne

vii. Il est difficile de faire une comparaison parfaite de l'intensité car deux appareillages différents ont été utilisés et l'intensité n'a pas été calibrée, mais le rapport signal/bruit bien plus important dans le cas des peintures suggère cela.

pouvons pas savoir si cette différence d'intensité est due à la présence de deux fluorophores distincts ou au mode de préparation des peintures, qui atténuerait la fluorescence (par exemple par auto-absorption [Pottier *et al.*, 2018]).

À nouveau, cette propriété de l'extrait de *Justicia spicigera* permet de le rapprocher de l'orseille, pour laquelle une émission de fluorescence centrée autour de 630 nm (λ_{ex} 350 nm) est aussi détectée sur support (textile ou peintures) [Clementi *et al.*, 2009].

2.2 Diffusion Raman

Dans l'optique de continuer la comparaison des propriétés spectrales de l'extrait coloré de *Justicia spicigera* déposé sur support et des peintures du *Codex Borbonicus*, le signal Raman de l'extrait est enregistré.

Pour permettre une mesure en spectroscopie Raman de l'extrait liquide, celui-ci est déposé sur une lamelle de verre et analysé après séchage. Ces mesures ont été réalisées sur du verre plutôt que sur le papier Whatman, car la couche colorante était trop peu couvrante pour masquer la contribution du papier sous-jacent, empêchant d'obtenir un spectre Raman exploitable. Le spectre Raman obtenu est présenté en Figure 3.6.

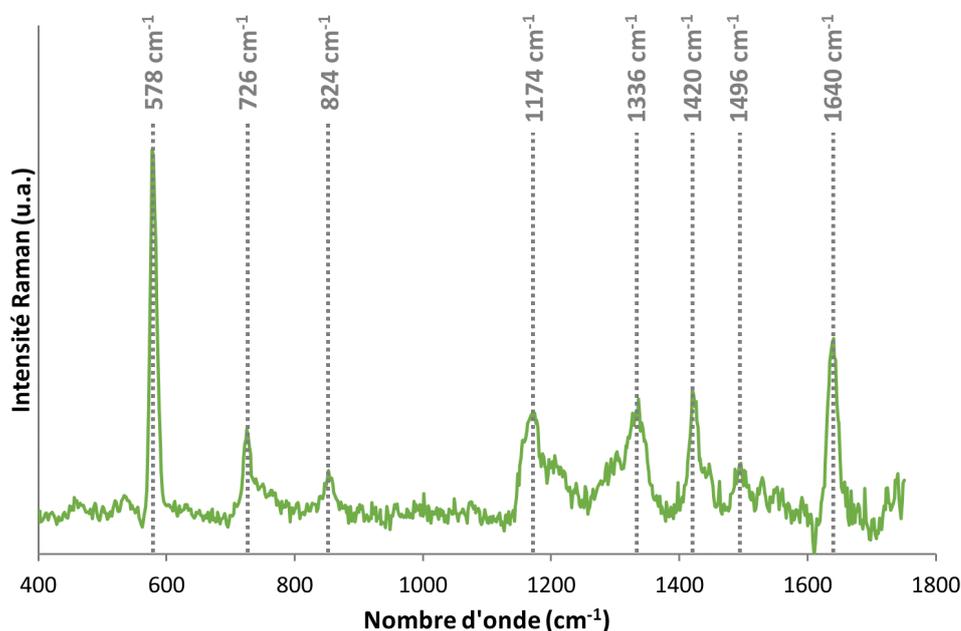


Figure 3.6 – Spectre Raman de l'extrait aqueux de *J. spicigera* déposé sur une lame de verre. Laser 532 nm. Soustraction de la ligne de base.

Les principales bandes sont détectées à 578, 726, 824, 1174, 1336, 1420, 1496 et 1640 cm^{-1} . Le profil spectral correspond à celui enregistré pour les peintures brunes de la partie II du *Codex Borbonicus* (Chapitre 1, Figure 1.20).

Contrairement à l'hypothèse formulée par [Casanova-González *et al.*, 2012], il est peu probable que les flavonoïdes présents dans l'extrait, comme le kaempférol et ses glycosides, soient responsables de la signature Raman enregistrée. De fait, la comparaison de spectres Raman obtenus pour l'extrait de *Justicia spicigera* et pour une référence de kaempféritrine (kaempférol-3,7-dirhamnose) a montré de grandes divergences des signaux (Annexe F, Figure F.1).

La corrélation entre les signaux Raman et d'émission de fluorescence de l'extrait de feuilles de *Justicia spicigera* et des peintures brunes de la partie II du *Codex Borbonicus* a mis en évidence que les composés responsables de la signature spectrale détectée *in situ* sont bien présents dans les extraits colorés de la plante. L'origine moléculaire de ces signaux est maintenant à étudier.

2.3 Composition de l'extrait

Nous nous sommes intéressés à la composition de l'extrait aqueux afin de révéler les composés responsables de sa coloration et d'évaluer leur potentielle contribution aux signaux spectroscopiques enregistrés sur les peintures brunes du *Codex Borbonicus*.

Pour ce faire, des analyses de l'extrait en HPLC-DAD-MS ont été menées^{viii}. Comme montré précédemment, l'extrait coloré est sensible aux variations de pH et l'équilibre apparent des deux formes se trouve aux alentours d'un pH de 6 (Figure 3.2, partie 2.1). Les expériences ont été conduites à deux valeurs distinctes de pH de phase mobile (pH 3 et pH 8)^{ix} pour examiner la composition du colorant dans ses deux formes. Les chromatogrammes obtenus pour une détection en total scan (200-750 nm) ou uniquement dans le visible (400-750 nm) sont représentés dans les Figures 3.7 et 3.8, pour les deux valeurs de pH.

viii. Ces expériences préliminaires en HPLC n'ont pas fait l'objet d'optimisation de méthode. Elles ont été réalisées avec des gradients génériques définis dans l'Annexe E, s'appuyant sur des conditions couramment utilisées pour l'analyse des colorants (cf Chapitre 2, partie 1.1.3). Dans la suite du travail (Chapitre 4), l'optimisation des conditions chromatographiques (phase stationnaire, phase mobile et programmation de gradient) sera par contre traitée dans l'objectif de développer d'une méthode de purification des composés colorés.

ix. Valeurs de pH de la phase aqueuse de la phase mobile, avant son mélange avec la phase organique lors de la programmation en gradient d'élution

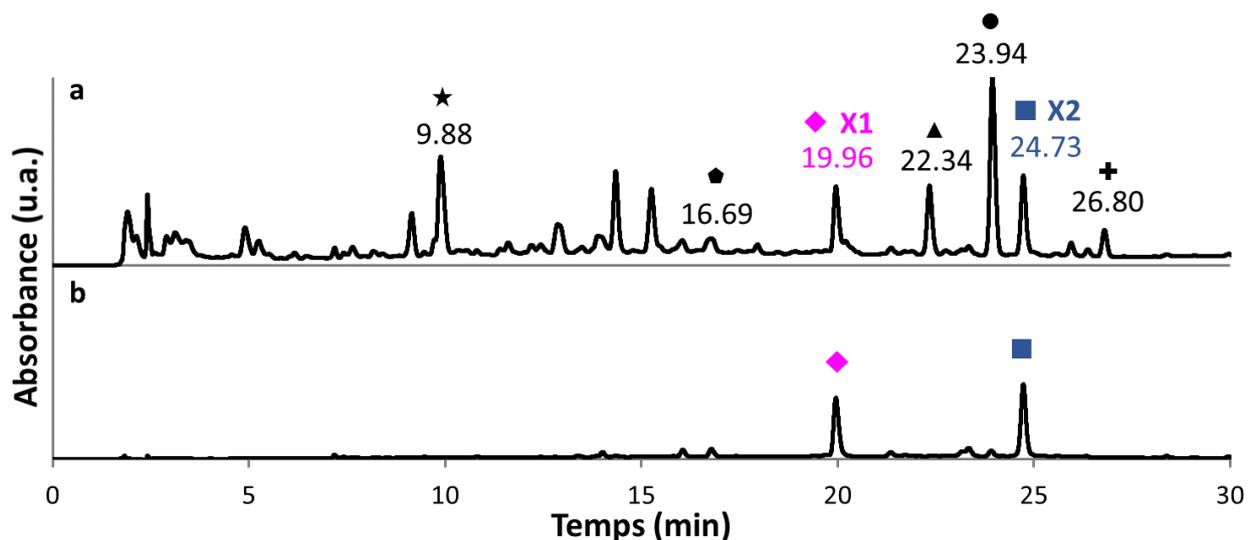


Figure 3.7 – Chromatogrammes de l'extrait aqueux de *Justicia spicigera* à pH 3.
 Détection DAD : a) DAD Total scan 200-750 nm et b) Visible 400-750 nm.
 Phase stationnaire : puriFlash® C18-XS. Phase mobile : A - HCOOH 0,1 % pH 3 / B - MeOH.
 Gradient : 5-80 % B de 0 à 30 min.
 Composés identifiés : ★ : A1; ♠ : A2; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; ■ : X2; + : F3.
 (Attributions correspondant au Tableau 3.1)

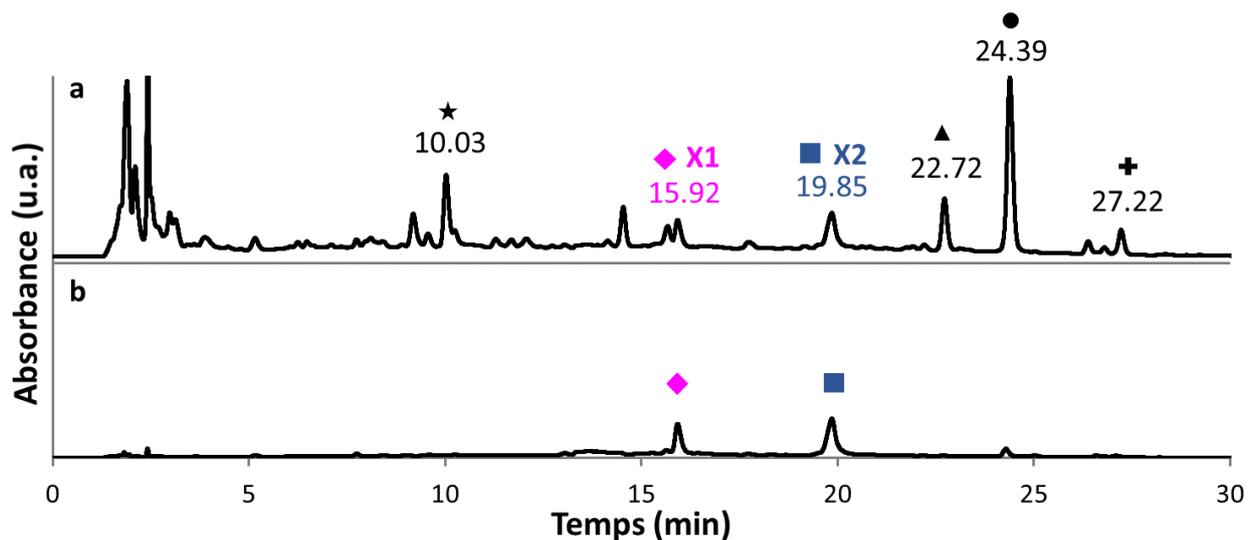


Figure 3.8 – Chromatogrammes de l'extrait aqueux de *Justicia spicigera* à pH 8.
 Détection DAD : a) DAD Total scan 200-750 nm et b) Visible 400-750 nm.
 Phase stationnaire : puriFlash® C18-XS. Phase mobile : A - HCOONH₄ 5 mM pH 8 / B - MeOH.
 Gradient : 5-80 % B de 0 à 30 min.
 Composés identifiés : ★ : A1; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; ■ : X2; + : F3.
 (Attributions correspondant au Tableau 3.1)

Les analyses chromatographiques de l'extrait ont révélé une composition complexe - comme nous pouvions nous y attendre pour un extrait de produit naturel - avec plusieurs composés absorbant dans l'UV et le visible (Figures 3.7a et 3.8a). Sept composés ont notamment été repérés et leurs caractéristiques sont rassemblées dans le Tableau 3.1.

Tableau 3.1 – Composés présents dans l'extrait aqueux de *Justicia spicigera*.
Phase stationnaire : puriFlash® C18-XS.
Phase mobile : A - HCOOH 0,1 % pH 3 ou HCOONH₄ 5 mM pH 8 / B - MeOH.
Gradient : 5-80 % B de 0 à 30 min. En MS², CE 10 eV.

	t_R (min)		Composé	λ_{max} (nm)		[M+H] ⁺ (m/z)	Ions fragments (m/z)
	pH 3	pH 8		pH 3	pH 8		
★	9,88	10,03	A1 : Justiciamide	251, 299		315	297
◆	16,69	?	A2 : Acide 4-amino-3-hydroxy-N-(2-hydroxy-4,5-diméthoxyphényl)-4-oxobutanoïque	254, 302	?	286	268
◆	19,96	15,92	X1	239, 492	251, 587	404	386, 259
▲	22,34	22,72	F1 : kaempférol 3-arabinose-7-rhamnose?	266, 350		565	433, 287
●	23,94	24,39	F2 : Kaempféritrine	266, 344		579	433, 287
■	24,73	19,85	X2	233, 492	236, 596	259	-
+	26,80	27,22	F3 : Kaempférol-3-(3'-acétyl-rhamnose)-7-rhamnose	266, 347		621	433, 247

Cinq de ces composés absorbent principalement dans l'UV. Même s'ils ne font pas l'objet de ce travail de caractérisation des composés responsables de la coloration violette de l'extrait, nous détaillons ici leurs caractéristiques et leur éventuelle identification, car nous avons été souvent amenés à nous en servir comme composés repères au cours de nos expériences.

Trois glycosides de flavonols (F1, F2 et F3) ont notamment été identifiés avec une absorption caractéristique à 345 nm. La **kaempféritrine** (kaempférol-3,7-dirhamnose, F2) dont la présence dans l'extrait de *J. spicigera* a été précédemment mise en évidence par [Dominguez *et al.*, 1990, Euler et Alam, 1982, Ortiz-Andrade *et al.*, 2012], a été identifiée avec un temps de rétention d'environ 24 min, des maxima d'absorption de 266 et 344 nm, indépendants du pH (spectre en Annexe F, Figure F.2) et un ion pseudo moléculaire [M+H]⁺ à m/z 579. Les ions de fragmentation détectés pour m/z 433 (579-146) et 287 (433-146) correspondent à la perte successive de deux unités de rhamnose. Le **kaempférol-3-(3'-acétyl-rhamnose)-7-rhamnose** (F3), décrit par [Pérez-Vásquez *et al.*, 2022], a été détecté pour un temps de rétention d'environ 27 min, des maxima d'absorption de 266 et 347 nm (spectre en Annexe F, Figure F.2) et un ion pseudo molé-

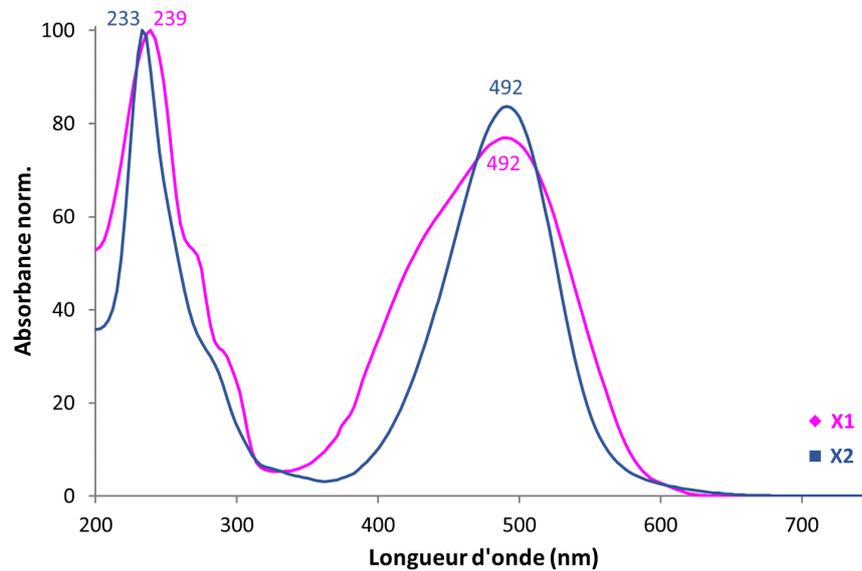
culaire $[M+H]^+$ à m/z 621. Les ions de fragmentation à m/z 433 (621-188) et 287 (433-146) correspondent aux pertes d'acétyl-rhamnose et de rhamnose. Un autre composé (F1) avec des maxima d'absorption caractéristiques de la famille des flavonoïdes a été identifié à un temps de rétention d'environ 22,5 min (spectre en Annexe F, Figure F.2) et un ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ de m/z 565. Les ions fragments détectés à m/z 433 (565-132) et 287 (433-146) suggèrent un dérivé de kaempférol (ou isomère de la formule $C_{15}H_{10}O_6$) avec des pertes d'unités de O-pentose (comme l'arabinose) et de O-déoxyhexose (comme le rhamnose) [Kachlicki *et al.*, 2016]. Le **kaempférol 3-arabinose-7-rhamnose** pourrait, par exemple, correspondre à ce dérivé.

Deux dérivés du 2-amino-4,5-diméthoxyphénol, précédemment isolés d'extraits de *J. spicigera* par [Ismail *et al.*, 1998, Lorenz *et al.*, 1999], ont également été identifiés dans nos analyses. La justiciamide (4-hydroxy-N-(2-hydroxy-4,5-diméthoxyphényl)-L-glutamine, A1) a été détectée pour un temps de rétention d'environ 10 min, des maxima d'absorption à 251 et 299 nm (spectre en Annexe F, Figure F.3) et un ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 315. Un ion fragment a été enregistré pour un m/z de 297 (315-18) correspondant à une perte d' H_2O , peu spécifique mais cohérente avec la présence d'un acide carboxylique [Levsen *et al.*, 2007]. L'acide 4-amino-3-hydroxy-N-(2-hydroxy-4,5-diméthoxyphényl)-4-oxobutanoïque (A2) a été identifié avec un temps de rétention de 16,69 min pour une phase mobile de pH 3^x, des maxima d'absorption à 254 nm et 302 nm (spectre en Annexe F, Figure F.3) et un ion pseudo moléculaire à m/z 286. Un ion fragment à m/z 268 (286-18) a été détecté et correspond à une perte d'eau, comme pour le composé A1.

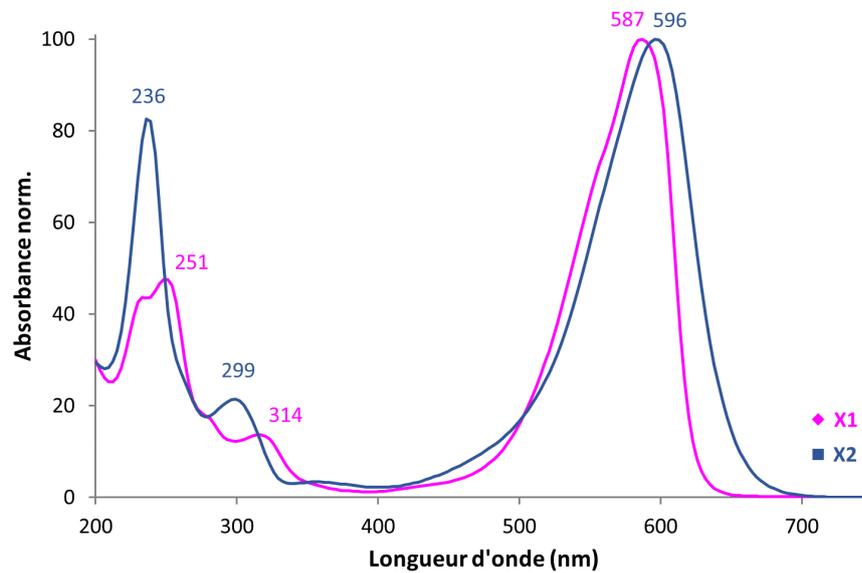
Concernant les composés présentant une importante absorption relative dans la gamme du visible (400-750 nm) et donc responsables de la coloration de l'extrait, deux composés principaux ont été repérés. Le premier, que l'on nommera, dans toute la suite de ce mémoire X1, a un ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 404 et le second, X2, à m/z 259. À pH 3, ils ont respectivement des temps de rétention de 19,96 et 24,73 min et des maxima d'absorption à 230-240 et 492 nm. La forme caractéristique de leur spectre d'absorption a permis de les distinguer aisément (Figure 3.9a). En augmentant le pH de la phase mobile à 8, la rétention de ces deux composés diminue (temps de rétention respectifs de 15,92 et 19,85 min). En RPLC, la diminution de la rétention lors d'une augmentation de pH est caractéristique de composés acides, ionisés aux pH les plus élevés et donc moins retenus que leurs formes neutres à bas pH [Dolan, 2017]. Les propriétés d'absorption des composés X1 et X2 sont aussi sensibles à la variation de pH : lors de l'augmentation du pH, le maximum d'absorption dans le visible se décale

x. Nous n'avons pas réussi à identifier ce composé dans les conditions d'élution à pH 8.

vers des longueurs d'onde plus grandes (déplacement bathochrome de 492 à 587 nm pour X1 et de 492 à 596 nm pour X2) (Figure 3.9b). La variation de leur absorption en fonction du pH explique ainsi la variation observée pour l'extrait total (Figure 3.2, partie 2.1).



(a) Spectres absorption UV-Vis à pH 3



(b) Spectres absorption UV-Vis à pH 8

Figure 3.9 – Spectre d'absorption UV-Vis (DAD) des composés X1 et X2.

Les composés X1 et X2 sont ainsi *a priori* responsables de la coloration de l'extrait. Leur rétention, leurs spectres d'absorption UV-Vis ou leur fragmentation en spectrométrie de masse à basse résolution n'ont pas permis d'identifier précisément les structures de ces deux composés. Seul le rapprochement avec les composés de la famille des phénoxazones, comme précédemment mentionné lors de l'exploitation des spectres d'absorption et de fluorescence obtenues pour l'extrait total (partie 2.1), a été suggéré par ces données.

Il s'agira de vérifier cette hypothèse et d'élucider la structure moléculaire de ces deux composés. Cela sera traité par la suite : le Chapitre 4 est dédié au développement d'une méthode de purification de ces deux composés cibles et le Chapitre 5 détaille les analyses approfondies menées par spectroscopie RMN et par spectrométrie de masse à haute résolution en infusion directe afin d'en proposer une structure. De même, l'évaluation de leur contribution aux signaux d'émission de fluorescence et Raman détectés pour les peintures brunes du *Codex Borbonicus* sera abordée.

Bilan intermédiaire Le colorant violet extrait des feuilles de *Justicia spicigera* se caractérise par un maximum d'absorption centré à 590 nm et un maximum d'émission de fluorescence à 620 nm. Des maxima comparables sont obtenus pour les dépôts de cette solution colorée sur un support papier.

L'extrait coloré de *Justicia spicigera* génère bien les mêmes signaux caractéristiques d'émission de fluorescence et Raman que ceux des peintures brunes du *Codex Borbonicus*. Cependant, l'origine moléculaire de ces signaux reste inconnue.

Les analyses chromatographiques ont permis d'identifier deux composés, X1 et X2, responsables de la coloration bleu-violette de l'extrait. Leur structure moléculaire n'est cependant pas connue et leur contribution à la signature spectrale caractéristique de l'extrait (émission de fluorescence et Raman) reste à évaluer.

3 Suivi de l'évolution de l'extrait aqueux

Lors de la préparation de l'extrait, nous avons pu constater que la solution colorée filtrée évoluait, à commencer par sa coloration. Nous avons alors cherché à mettre en évidence l'influence de cette évolution sur les réponses spectrales et la composition moléculaire.

Des photographies de l'extrait liquide filtré à différents temps de repos après le début de l'extraction^{xi} sont présentées dans la Figure 3.10. Comme décrit précédemment et comme nous pouvons le voir sur ces photographies, peu de temps après le début de l'extraction, la solution a une coloration violette avec des reflets rouges. Au cours du temps, ces reflets s'estompent pour laisser place à une solution tirant sur le bleu-violet^{xii}.

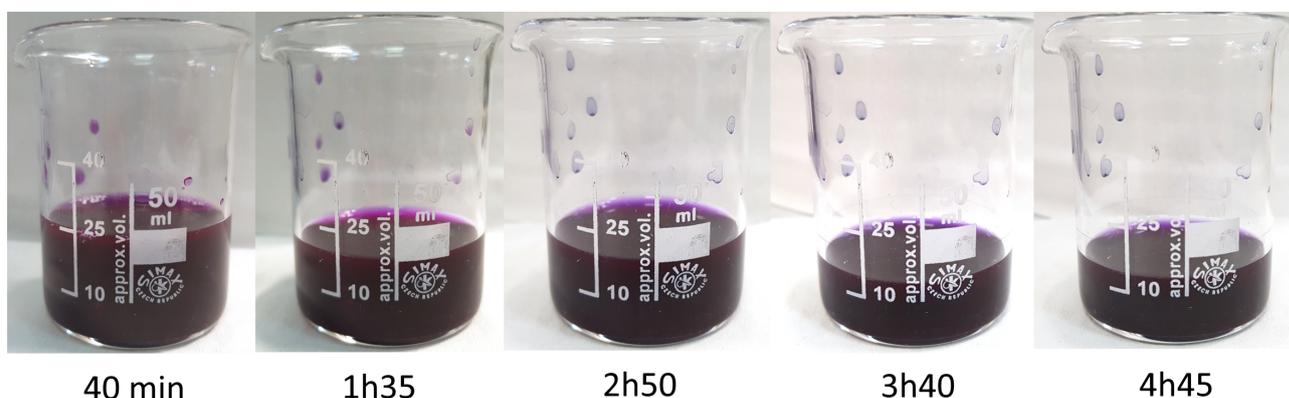


Figure 3.10 – Évolution de l'extrait au cours d'un temps de repos.

N.B. Le niveau de la solution n'est pas constant en raison de prélèvements successifs entre les photos.

Nous avons ensuite naturellement cherché à mettre en évidence l'effet de cette évolution sur la signature spectrale du colorant ainsi que sur sa composition moléculaire.

xi. Temps séparant le début de l'extraction et l'observation, avec une filtration de la solution après 5 à 10 min de macération.

xii. L'épaisseur du contenant ne permet de discerner très clairement ces changements sur photographies; ces différences sont sur ces représentations surtout visibles en surface

3.1 Influence sur l'absorption et la fluorescence de l'extrait

Les spectres d'absorption de l'extrait coloré en solution pour différents temps de repos ont été enregistrés dans la gamme visible et sont tracés dans la Figure 3.11.

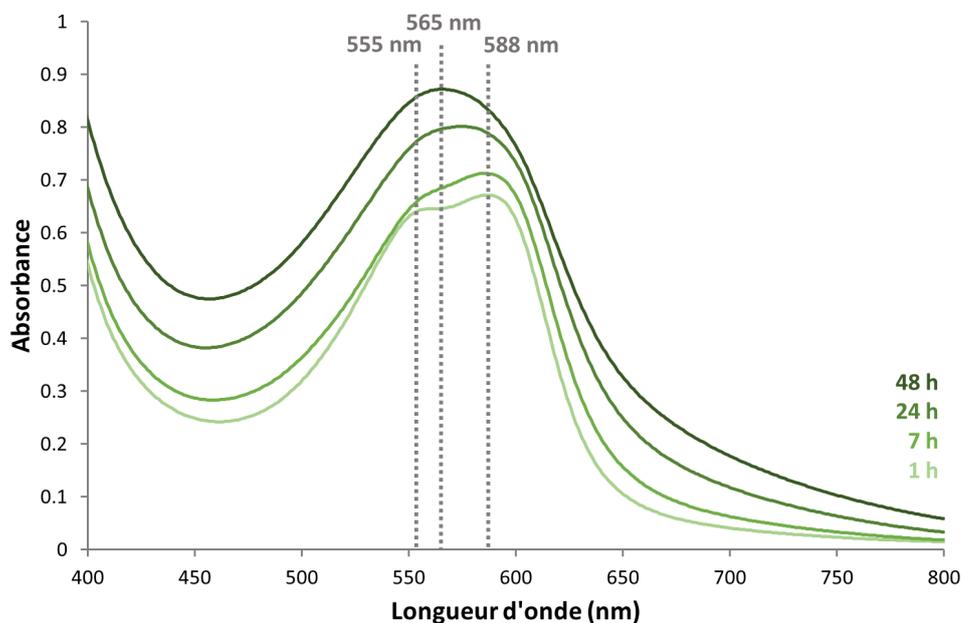


Figure 3.11 – Spectre d'absorption de l'extrait aqueux de *J. spicigera* à différents temps de repos : 1 h, 7 h 24 h et 48 h. Lot de feuilles : 11/2020.

Pour un temps proche du début de l'extraction (1 h), deux maxima centrés à 555 nm et 588 nm ont été enregistrés. Au cours du repos de la solution, nous observons un élargissement de la bande d'absorption avec un maxima centré autour de 565 nm, 48 h après le début de l'extraction.

Nous avons ensuite cherché à évaluer l'influence du repos de la solution sur l'apparence colorée et les propriétés spectrales d'un dépôt sur papier d'une telle solution.

Nous avons choisi de ne pas multiplier les dépôts à différents temps de repos et de nous concentrer uniquement sur le dépôt d'une solution avec un temps de repos assez avancé de 48 h. Comme précédemment dans le cas de la solution fraîche^{xiii} dans la partie 2.1.2, la solution a été déposée sur du papier Whatman 1 pour enregistrer les spectres de réflexion et d'émission de fluorescence.

^{xiii}. Par solution fraîche, nous faisons référence à des solutions ayant subi des temps de repos courts, de quelques minutes à quelques heures, à l'échelle du temps des manipulations (comme cela était le cas dans la partie 2). En opposition à des solutions avec des temps de repos plus conséquents (de l'ordre d'une à plusieurs journées).

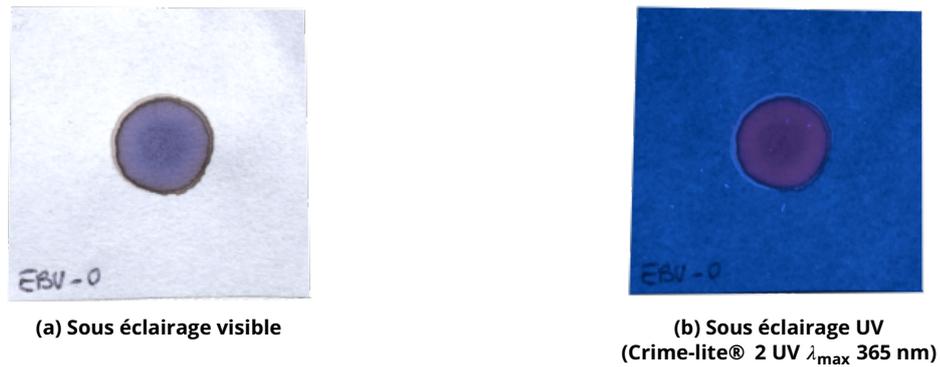


Figure 3.12 – Photographie du dépôt sur papier Whatman 1 d'une solution de *J. spicigera* ayant reposé 48 h après le début de l'extraction.

Le dépôt présente une coloration violette foncée (Figure 3.12a) et dans son spectre de réflexion est détectée une large bande d'absorption centrée autour de 596 nm (Figure 3.13a). Nous observons donc un comportement similaire à celui observé en solution avec la disparition de l'épaule à 565 nm et un élargissement de la bande principale lorsque la solution subit un temps de repos long.

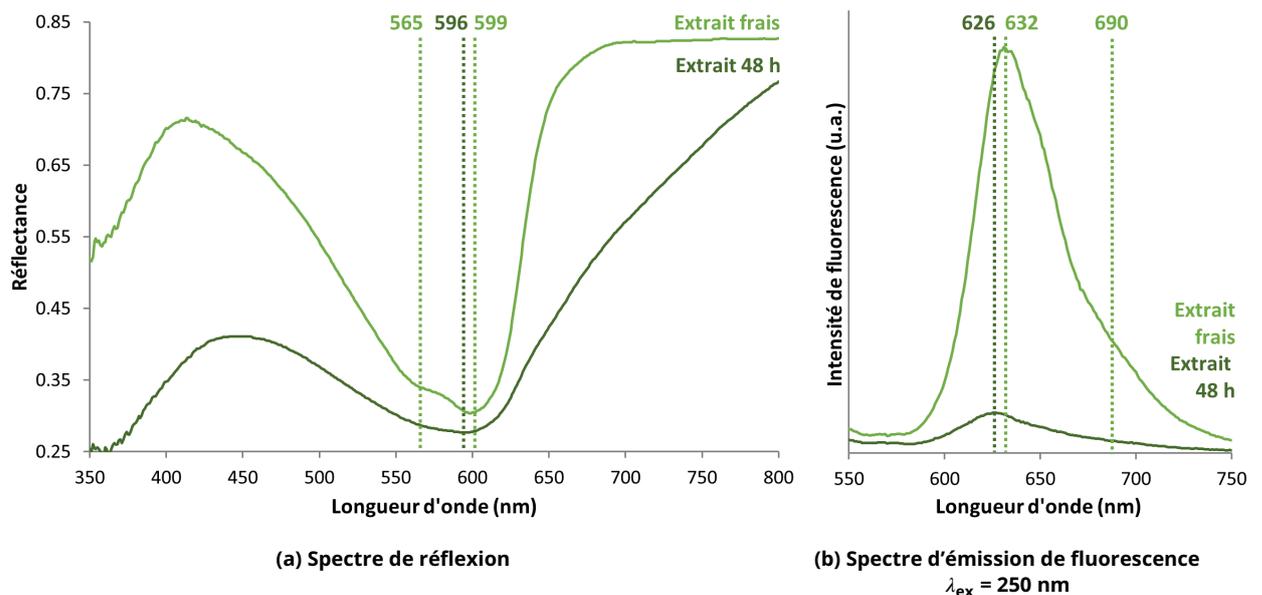


Figure 3.13 – Spectres de réflexion et d'émission de fluorescence de dépôts sur papier Whatman 1 d'extrait aqueux de *J. spicigera* frais, repos d'environ 1 h (vert clair) et avec un temps de repos de 48 h (vert foncé).

Sous éclairage UV, le dépôt présente une faible fluorescence rouge-rose (Figure 3.12b). Son spectre d'émission de fluorescence est enregistré et tracé dans la Figure 3.13b. Nous observons une émission de fluorescence fortement atténuée par rapport au dépôt d'extrait frais (probablement par auto-absorption). Un léger décalage du maximum d'émission de 630 nm à 626 nm a été constaté.

3.2 Influence sur le signal Raman

Un extrait ayant reposé 48 h a été déposé sur lame de verre pour enregistrer son spectre Raman. Il est comparé à celui obtenu dans le cas d'une solution fraîche (repos d'environ 1 h) dans la Figure 3.14.

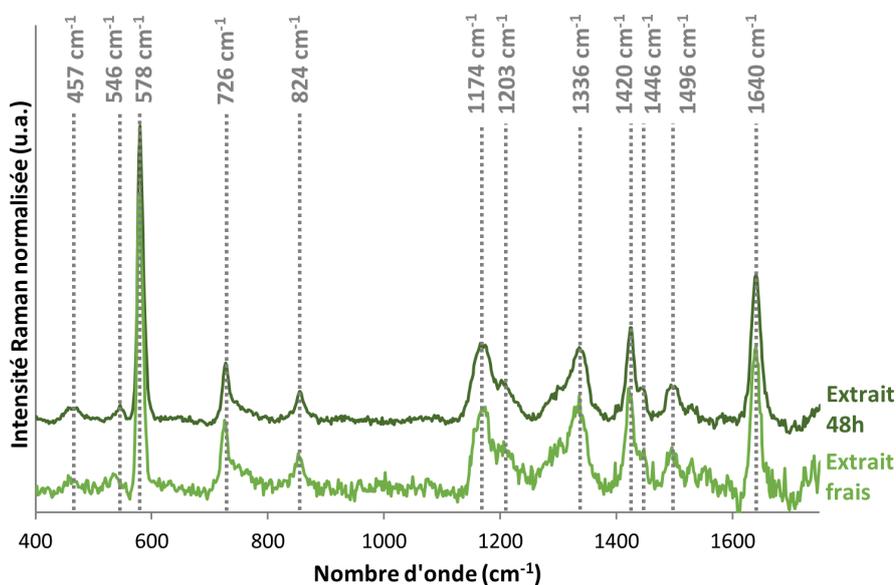


Figure 3.14 - Spectre Raman sur lame de verre de l'extrait aqueux de *J. spicigera* frais, repos d'environ 1 h (vert clair) et déposé 48 h de repos (vert foncé). Laser 532 nm. Soustraction de la ligne de base.

Quel que soit le temps de repos, les signatures spectrales sont identiques. Nous notons cependant un meilleur rapport signal/bruit pour le dépôt correspondant à une solution ayant un temps de repos plus long.

Nous avons ainsi mis en évidence que lorsque la solution filtrée est laissée au repos une variation de la couleur, que ce soit à l'état liquide ou déposé sur support papier, est observée. Elle s'accompagne d'un élargissement du maximum d'absorption et d'une atténuation de l'émission de fluorescence. La signature Raman ne subit quant à elle pas de variation notable, si ce n'est une meilleure définition des bandes dans le cas d'une solution ayant subi un temps de repos plus long.

Nous allons donc maintenant nous intéresser à l'évolution de la composition moléculaire de l'extrait pour comprendre l'origine de ces variations spectrales.

3.3 Influence sur la composition moléculaire

Un extrait aqueux a été préparé. Après sa filtration, il a été stocké dans le passeur de la chaîne HPLC et analysé à différents temps de repos (de 10 min à 6 jours) afin de mettre en évidence l'évolution de la composition moléculaire, et particulièrement celle des molécules colorantes. Les chromatogrammes obtenus pour une détection dans le visible (400-750 nm) sont présentés dans la Figure 3.15.

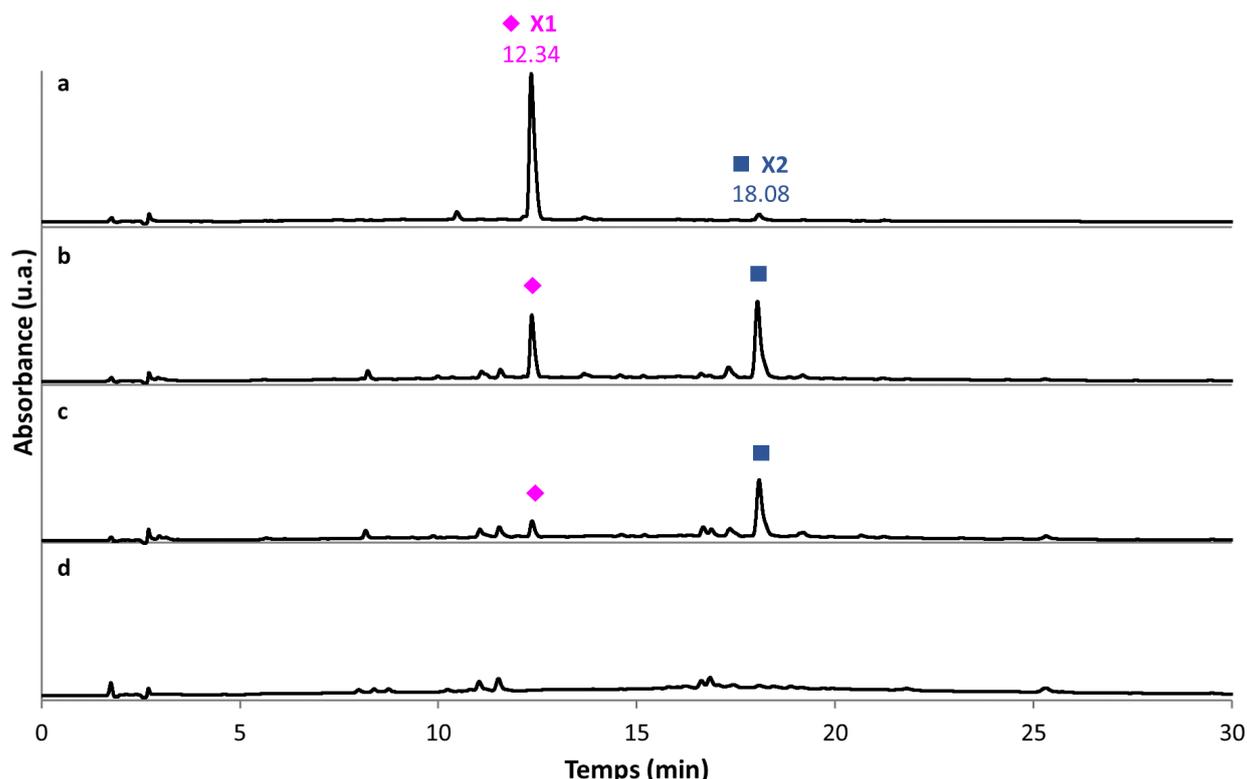


Figure 3.15 – Chromatogrammes de l'extrait aqueux pour des temps de repos distincts :

a) 10 min, b) 5 h, c) 8 h et d) 6 jours.

Phase stationnaire : Strategy™ C18-HQ. Phase mobile : A - H₂O 0,1 % HCOOH / B - MeCN.
Gradient : 5-50 % B de 0 à 30 min puis 50 % B de 30 à 40 min. Détection : DAD 400-750 nm.

Nous observons une évolution des proportions relatives des composés X1 et X2 selon le temps de repos. Si le composé X1 est majoritaire pour un temps de repos proche du début de l'extraction (10 min, Figure 3.15a), sa concentration est plus faible pour un temps de repos de 8 h (Figure 3.15b). Elle diminue encore après 8 h (Figure 3.15c), jusqu'à ce que son pic ne soit plus détectable après 6 jours de repos (Figure 3.15d). Quant au composé X2, sa concentration maximale semble être atteinte pour des temps de repos intermédiaires (ici 5h, Figure 3.15b) puis décroît, comme celle de X1, jusqu'à ce que son pic ne soit plus détecté (Figure 3.15d).

Un suivi plus précis de l'évolution de la concentration des composés X1 et X2 a été

mené pour 13 temps de repos distincts entre 10 min et 12 heures (Annexe G, Figure G.2). La décroissance de X1 a été mise en évidence, et ce, dès le début du temps de repos. Cela suggère que sa formation au moment de l'extraction est très rapide, mais qu'il présente une grande instabilité dans la solution colorée. Quant à la concentration du composé X2, elle augmente du début du temps de repos jusqu'à un temps compris entre 100 et 400 min (selon les expériences) où elle atteint son maximum, avant de diminuer, comme celle de X1 jusqu'à des valeurs très faibles. Il semblerait que la diminution de la concentration en X1 se fasse au profit de celle en X2.

Par ailleurs, pour un temps de repos long, l'absorbance des autres composés détectés est relativement faible (Figure 3.15d). Nous pouvons tout de même repérer les plus intenses d'entre eux : deux composés avec un ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 358 et des maxima d'absorption centrés à 497 nm à pH 3 et à 605 nm à pH 8 (spectres en Annexe F, Figure F.4) ou encore deux composés avec un ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ 359 et des maxima d'absorption centrés à 449 nm à pH 3 (non identifiés pour pH 8) (spectres en Annexe F, Figure F.5).

Plusieurs autres composés mineurs dont les propriétés d'absorption semblent également dépendre du pH ont également été détectés avec des maxima d'absorption entre 450 nm et 550 à pH 3 et entre 590 et 640 nm à pH 8^{xiv} (exemples de spectres en Annexe F, Figure F.6). Ces composés contribuent ainsi à la coloration de l'extrait total pour des temps de repos longs.

Par ailleurs, aucune évolution notable des autres composés de l'extrait, tels que les flavonols, n'a été observée (Annexe G, Figure G.1).

Ainsi, l'évolution de la couleur de l'extrait tout comme celle des propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence UV-Vis discutées précédemment semblent être principalement liées à la variation de la concentration des composés colorés principaux, X1 et X2, au cours du temps.

Les reflets rouges observés dans la solution à des temps de repos courts et disparaissant au fur et à mesure sont donc certainement donnés par le composé X1, dont la concentration diminue au cours du temps de repos. De même, l'intense fluorescence mesurée pour un dépôt de solution fraîche s'atténuant grandement pour la solution déposée après 48 h est vraisemblablement générée par le composé X1. En effet, nous avons pu montrer grâce à des analyses en HPLC-FLD ($\lambda_{\text{ex}} = 500$ nm et $\lambda_{\text{em}} = 600$ nm) que le composé X1 présente une émission de fluorescence dans ces conditions, contrairement au composé X2 dont le pic n'est pas détecté (Annexe H, Figure H.1).

xiv. La faible intensité de ces composés n'a cependant pas permis de détecter leurs ions pseudo-moléculaires; il n'a donc pas été possible d'attribuer les spectres d'absorption à pH 3 et pH 8 aux composés correspondants.

De plus, à des temps de repos très avancés, la présence de plusieurs composés minoritaires absorbant tous à des longueurs d'onde légèrement différents peut expliquer l'élargissement de la bande d'absorption UV-Vis de l'extrait total constatée dans la partie 3.1 (Figure 3.11).

Dans l'objectif de caractériser les molécules colorantes de l'extrait de *Justicia spicigera*, nous avons fait le choix de nous concentrer sur l'élucidation des structures des composés X1 et X2, même s'ils ne sont pas les seuls à contribuer à sa coloration et ce pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, ces composés sont *a priori* présents dès les premiers instants de l'extraction^{xv}. Ils semblent ainsi être les précurseurs des autres composés colorés détectés ensuite pour des temps de repos plus longs. Si cette hypothèse s'avère vraie, connaître leur structure devrait donner accès à la famille moléculaire à laquelle appartient l'ensemble de ces composés.

Par ailleurs, s'ajoutent des raisons pratiques qui auront leur importance lors de l'étape de purification. Ils présentent *a priori* des concentrations dans l'extrait plus importantes que les autres composés^{xvi}, ce qui assurera leur isolement en plus grande quantité comme le requièrent certaines des analyses structurales envisagées. De plus, la concentration de X1 et X2 étant maximisée pour des temps de repos relativement proches du début de l'extraction, il ne sera pas nécessaire d'envisager la préparation d'extrait longtemps en amont de l'analyse ou de la purification. Pour finir, nous avons pu constater que la présence des composés minoritaires était peu reproductible d'un extrait à l'autre (données non présentées), alors que nous sommes en mesure d'identifier facilement les composés X1 et X2 dans n'importe quel extrait.

La solution colorée s'étant révélée instable dans le temps, nous nous sommes interrogés sur la stabilité des dépôts colorés sur papier.

xv. Même si les temps incompressibles de macération et de filtration de l'extrait avant son analyse ne nous ont pas permis d'obtenir de chromatogramme avant 10 min.

xvi. En faisant l'hypothèse que les composés colorés de l'extrait ont des structures proches, leurs coefficients d'extinction molaire sont alors comparables et il est possible de comparer leurs absorptions pour estimer leurs concentrations relatives.

3.4 Évolution de l'extrait déposé sur papier

En premier lieu, nous avons évalué si l'évolution de la composition moléculaire constatée en solution avait aussi lieu lorsque le colorant était déposé sur un support.

Pour ce faire, une méthode de réextraction du colorant pour permettre son analyse en HPLC a été développée et optimisée (détails en Annexe I). Les couches colorées sont découpées en petits morceaux, immergées dans un mélange méthanol-eau 50/50 pendant 20 min puis la solution colorée résultant est filtrée avant son analyse chromatographique.

Un dépôt sur papier Whatman de solution fraîche de *Justicia spicigera* a été préparé (selon le même protocole qu'en partie 2.1.2). Après 2 h de séchage du dépôt à l'abri de la lumière, le colorant a été extrait des couches selon la méthode décrite au-dessus, puis analysé en HPLC. Le chromatogramme obtenu est tracé dans la Figure 3.16a.

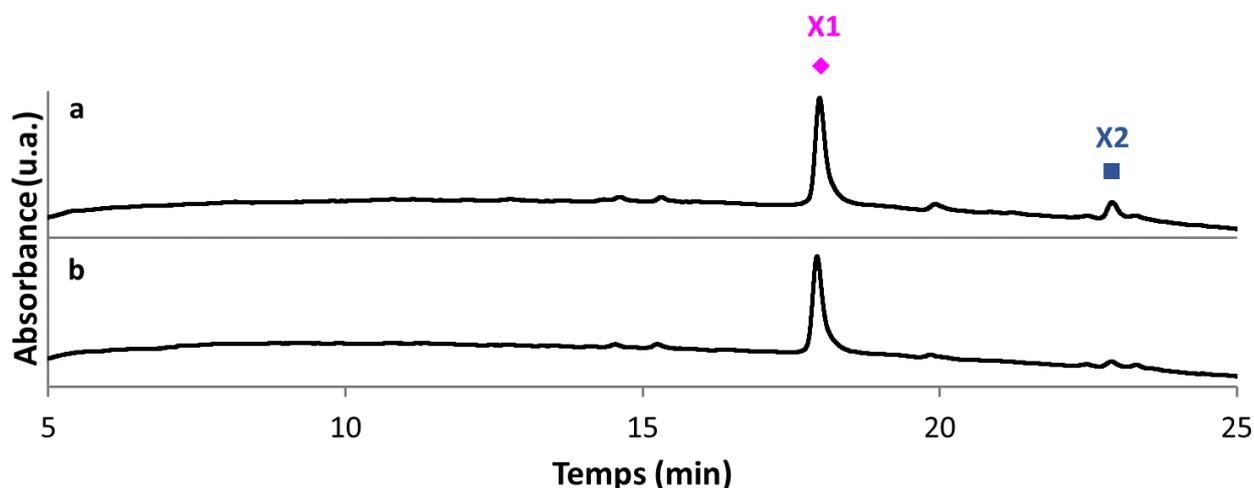


Figure 3.16 - Chromatogrammes de l'extrait aqueux déposé sur papier et réextrait avec mélange MeOH/H₂O après a) 2 h de séchage et b) 13 jours de séchage.

Phase stationnaire : Strategy™ C18-HQ. Phase mobile : A - H₂ 0,1 % HCOOH / B - MeOH.
Gradient : 5-80 % B de 0 à 30 min puis 80 % B de 30 à 40 min. Détection : DAD 400-750 nm.

Conformément à ce qui est attendu pour une solution fraîche, le composé X1 est majoritaire dans le chromatogramme avec une détection dans le visible. Le composé X2 est également présent, en faible quantité.

On a pu noter que l'absorbance du colorant réextrait du dépôt sur papier était nettement inférieure à celle de l'extrait aqueux décrit dans les parties précédentes (comparaison de chromatogrammes non présentée). Cela est une conséquence directe du protocole de réextraction qui induit d'une part, une dilution du colorant et d'autre part, une certaine perte de matière, non réextraite du support papier. Il est cependant toujours possible d'identifier les deux composés colorés sans difficulté.

Ce dépôt a ensuite été stocké à l'abri de la lumière pour une durée de 13 jours. Le colorant a été réextrait à l'issue de la période de stockage et analysé en HPLC (Figure 3.16b). Nous retrouvons un chromatogramme très semblable à celui obtenu avant la période de stockage : le composé X1 est détecté comme composé majoritaire. Or, d'après la partie 3.3, nous savons qu'en solution, la concentration de X1 diminue rapidement et qu'après 12 h, nous ne le détectons plus dans l'extrait. L'évolution de la composition n'a donc pas eu lieu pour le colorant déposé sur un support papier.

Nous pouvons ainsi déduire que le **dépôt sur papier bloque l'évolution de l'extrait coloré**. Il n'est donc pas improbable que, malgré les 400 ans du *Codex Borbonicus*, ce soit les composés colorés X1 et X2 qui génèrent les signatures spectrales enregistrés sur les peintures brunes de la partie II. Cependant, comme nous l'avons constaté précédemment dans la partie 2, sans préparation supplémentaire de l'extrait coloré frais, riche en X1 et en X2, il semble difficile de s'approcher d'une apparence de peintures, comme celles présentes dans le manuscrit. Nous traiterons ces questions de préparation du colorant dans la partie suivante (partie 4).

Bilan intermédiaire Nous avons ainsi pu mettre en évidence une **variation de la composition** de l'extrait en fonction du **temps de repos de la solution**. Les composés X1 et X2 contribuent majoritairement à la coloration de l'extrait pour des temps de repos proches du début de l'extraction. Plusieurs composés, plus difficilement identifiables car ayant des absorbances bien moins importantes, semblent responsables de la coloration pour des temps de repos plus longs. Malgré la contribution de ces composés minoritaires à la coloration finale de l'extrait, nos efforts de caractérisation moléculaire de l'extrait coloré de *Justicia spicigera* sont restés toutefois centrés sur les composés X1 et X2, car ils sont probablement les précurseurs de tous les autres composés formés lors du repos de la solution.

Pour l'étape de purification de ces deux composés colorés cibles (Chapitre 4), nous avons pris en compte que pour maximiser leurs concentrations respectives, il était pertinent de travailler avec des solutions fraîches, pour un temps de repos le plus court possible pour l'isolement du composé X1 et avec des solutions ayant reposé quelques heures (approximativement entre 3 et 6 heures) pour celles du composé X2.

Des **variations de propriétés spectrales** ont été observées et sont les conséquences directes de l'évolution de la composition moléculaire de l'extrait. En effet, si l'absorption des solutions fraîches se caractérise par deux bandes d'absorption proches, attribuables aux deux composés colorés X1 et X2, le signal des solutions aux temps de repos longs est quant à lui dominé par une large bande d'absorption, témoignant de la

multiplicité des composés se formant dans l'extrait au cours du temps et absorbant à des maxima distincts dans le visible.

Par ailleurs, l'atténuation de l'émission de fluorescence pour les solutions ayant subi des temps de repos avancés s'explique par la disparition du composé X1, principal responsable de cette fluorescence. Le composé X2 ainsi que les autres composés mineurs semblent présenter une fluorescence moindre, contribuant toutefois au signal global résiduel détecté.

Enfin, la signature spectrale de diffusion Raman ne semble pas particulièrement affectée par l'évolution de la solution : les mêmes bandes sont détectées quel que soit le temps de repos de la solution. On note toutefois une meilleure définition des bandes (rapport signal/bruit supérieur) pour les temps de repos les plus longs, laissant supposer que le X1 a une moindre réponse en spectroscopie Raman que les autres composés.

Pour finir, nous avons pu constater que lorsque le colorant est déposé sur un support papier, les propriétés spectrales et la composition moléculaire ne sont plus sujettes à variation. L'état solide stoppe ainsi son évolution.

Maintenant que nous avons acquis une meilleure connaissance du colorant extrait des feuilles de *Justicia spicigera* en solution, nous pouvons nous intéresser aux caractéristiques du colorant en tant que peinture, à commencer par les modalités de sa préparation.

4 Préparation du colorant pour une application en peinture

Dans les parties précédentes, nous avons réalisé des dépôts du colorant sur support papier. S'ils présentaient les signatures spectrales caractéristiques des peintures du *Codex Borbonicus* (émission de fluorescence et signal Raman), leur apparence était quant à elle plutôt éloignée de celle des couches picturales brunes du manuscrit. Des dépôts violets, peu couvrants ont été obtenus alors que les peintures du *Codex Borbonicus* sont d'un brun sombre (Figure 3.17).



Figure 3.17 – Photographies de dépôts de la solution de *J. spicigera* sur papier Whatman 1 et des peintures brunes du *Codex Borbonicus*.

Dans cette partie, nous avons ainsi testé différents modes de préparation du colorant afin de se rapprocher d'un rendu (couleur et texture) proche de celui des couches picturales du *Codex Borbonicus*. Nous avons également cherché à vérifier si les signatures spectrales des échantillons obtenus quel que soit le mode de préparation étaient en adéquation avec celles enregistrées sur le manuscrit.

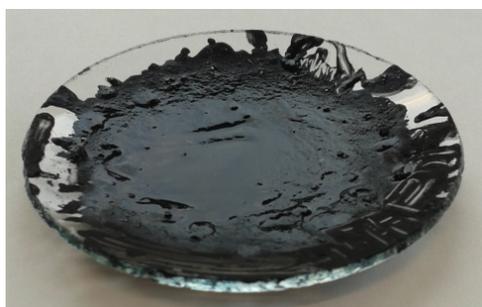
4.1 Élaboration d'un colorant en poudre

Au vu de l'instabilité du colorant en solution, il nous a semblé raisonnable d'imaginer que les artistes aient cherché à travailler avec un matériau moins changeant pour atteindre une certaine reproductibilité dans les couches de peintures produites. De plus, si l'utilisation de l'extrait coloré liquide est fréquent dans le domaine de la teinture, il ne semble que peu adapté au domaine de la peinture où l'obtention de couches couvrantes est souvent recherchée^{xvii}. Travailler avec le colorant transformé sous forme de poudre serait notamment une solution permettant de répondre à ces deux aspects.

xvii. À l'exception de l'aquarelle ou de glacis en peinture à l'huile.

Lors des différents tests d'extraction préalablement menés, nous avons remarqué l'apparition d'un précipité lors du repos de la solution colorée à l'air libre, quand la solution commence à s'évaporer (légèrement visible au centre du dépôt dans Figure 3.17b). Nous avons ainsi cherché à évaporer totalement l'extrait pour travailler avec le résidu solide formé. [Thomas, 1866] mentionne également un protocole, dont on s'est inspiré, pour obtenir la matière colorante sèche extraite des feuilles de *Justicia spicigera*, par évaporation de la solution colorée (Chapitre 1, partie subsubsec : observations).

La solution aqueuse colorée est déposée dans un verre de montre et laissée à évaporer à l'air libre jusqu'à siccité (Figure 3.18a). Le résidu solide sec est réduit en poudre; une poudre foncée est ainsi obtenue (Figure 3.18b).



(a) Évaporation de l'extrait aqueux coloré pour l'obtention d'une poudre.



(b) Poudre obtenue à l'issue de l'évaporation et du broyage.

Figure 3.18 - Élaboration d'un colorant en poudre à partir de l'extrait de *Justicia spicigera*.

Selon la quantité de solution à évaporer, la température de la pièce ou la surface de contact exposée à l'air, le temps nécessaire à l'obtention de cette poudre était variable (estimé de plusieurs heures à 2 jours^{xviii}). Compte tenu de l'évolution de la composition de la solution lors d'un temps de repos (d'après la partie 3.3), nous nous attendions à ce que la poudre corresponde à une composition moléculaire d'un état d'évolution assez avancé. Dans cette partie, les propriétés spectrales et la composition de la poudre obtenue ont donc plutôt été comparées avec celles de solutions et de dépôts de solution ayant subi des temps de repos assez longs.

La poudre obtenue est soluble dans l'eau^{xix}. Sa dissolution aboutit à l'obtention d'une solution violette, dont le maximum d'absorption est centré à 585 nm, avec un épaulement autour de 555 nm, conformément à ce que l'on trouvait pour l'extrait aqueux obtenu à partir des feuilles de *Justicia spicigera* (Figure 3.19). La dépendance au pH de

xviii. Le temps d'évaporation aurait pu être accéléré par chauffage, mais nous avons préféré ne pas rajouter ce paramètre supplémentaire.

xix. Il ne s'agit donc pas d'un pigment, d'après les définitions présentées dans le Chapitre 1 partie 1.1, d'où notre choix de l'appellation « poudre colorante ».

la solution obtenue à partir de la poudre est également similaire à celle observée pour les extraits obtenus à partir de feuilles (spectres non présentés).

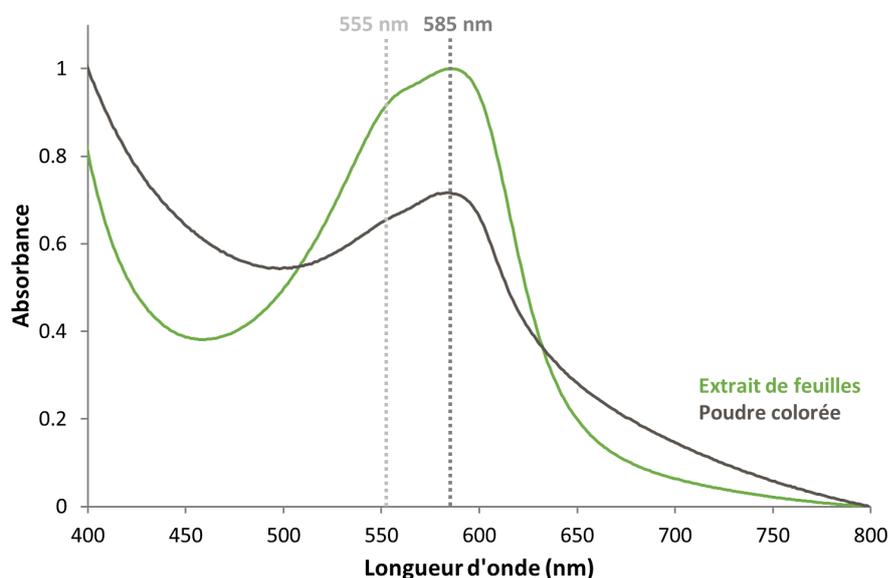


Figure 3.19 – Spectres d'absorption Vis de la poudre remise en solution (en gris) et d'un extrait obtenu à partir de feuilles de *J. spicigera* et ayant subi un temps de repos de 7 h (en vert).

Le spectre Raman enregistré pour la poudre colorée obtenue présente également une signature identique à celle de l'extrait liquide de feuilles déposé sur support (Figure 3.20).

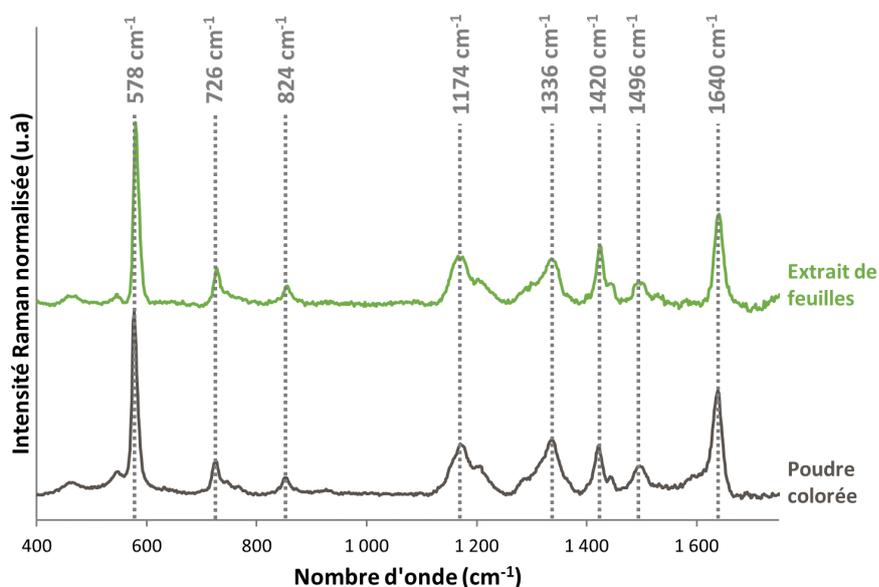


Figure 3.20 – Spectres Raman du colorant en poudre (en gris) et d'un extrait déposé sur verre après un repos de 48 h (en vert). Laser 532 nm. Soustraction de la ligne de base.

La solution obtenue par dissolution de la poudre a également été analysée par HPLC. Le chromatogramme obtenu est présenté en Figure 3.21.

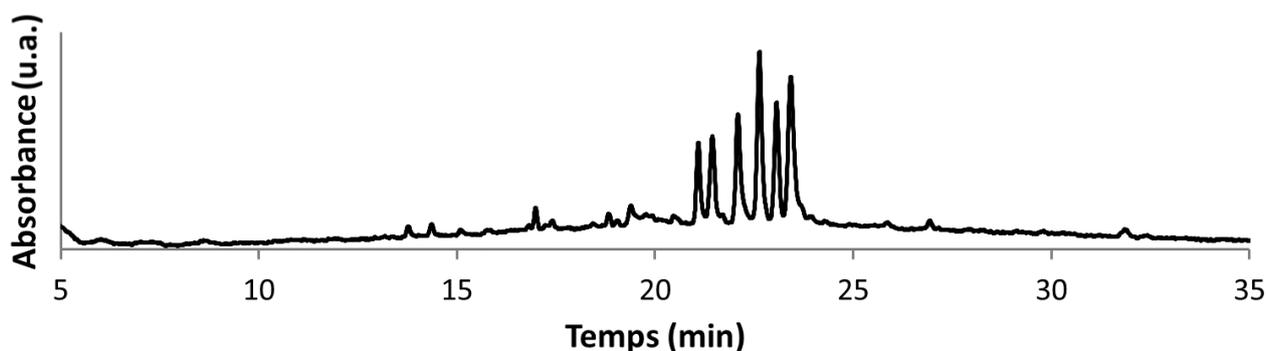


Figure 3.21 – Chromatogramme de la poudre colorante en solution.
Phase stationnaire : Aquasil C18. Phase mobile : A - H₂O HCOOH 0,1 % / B - MeCN HCOOH 0,1 %.
Gradient : 5 % de B de 0 à 1 min; 5-60 % B de 1 à 41 min. Débit : 0,3 mL/min. Détection 485 nm.

Plusieurs composés colorés ont été détectés pour des temps de rétention compris entre 20 et 25 min. Comme pour les extraits ayant subi des temps de repos longs (précédemment détaillé dans la partie 3.3), ils présentent de très faibles absorptions et pour cette raison, il n'a pas été possible de les rapprocher des composés préalablement identifiés dans les extraits via la comparaison de leur spectre d'absorption. Il est ainsi difficile d'évaluer si la composition moléculaire de l'extrait est exactement conservée lors du procédé de séchage jusqu'à l'obtention d'une poudre. Les résultats ne sont toutefois pas incompatibles avec la présence de potentiels composés communs dans les deux extraits (poudre en solution et extrait de feuilles à des temps de repos avancés). En outre, les composés X1 et X2 ne semblent pas présents dans la composition de la poudre, ce qui est cohérent avec le procédé d'évaporation de l'extrait durant plusieurs heures pour obtenir la poudre sèche.

Comme mentionné dans le Chapitre 1, une autre technique courante pour transformer des colorants liquides en poudre consiste en la préparation de pigments laqués : le colorant organique est précipité sur une charge inorganique, afin de le rendre insoluble. Des tests de préparation de pigments laqués sur aluminium à partir de l'extrait coloré de feuilles de *Justicia spicigera* ont été réalisés. Nous avons fait varier le pH initial de la solution colorée et la nature du composé alcalin ajouté (Na₂CO₃ ou Ca(OH)₂). Quelles que soient les conditions de préparation testées, la dispersion des poudres obtenues dans un liant et leur application en couches picturales ont mené à l'obtention de nuances roses-violettes, proches de la coloration de l'extrait en solution (Annexe J, Figure J.1). Nous avons décidé de ne pas poursuivre cette piste, nous semblant peu prometteuse vu l'apparence des couches trop éloignées de celles du *Codex Borbonicus*.

Nous nous sommes ainsi plutôt concentrés sur la préparation de couches picturales à partir du colorant en poudre résultant de l'évaporation de l'extrait de *Justicia spicigera*. La couleur de cette dernière semblait plus propice à l'obtention de peintures brunes comme dans le manuscrit. L'influence de différents supports d'application et liants sur l'apparence et la signature spectrale est examinée dans la partie suivante.

4.2 Préparation de couches picturales

La présente partie est dédiée à la préparation de couches picturales à partir du colorant en poudre obtenu par séchage de l'extrait coloré de *Justicia spicigera*.

En peinture, pour appliquer une couche colorée, la matière colorante est mélangée à un liant. Il permet notamment la fixation de la poudre colorée (pigment ou colorant) au support. La concentration de la matière colorante dans le liant permet d'ajuster la texture et la saturation en couleur des peintures obtenues.

Aucune analyse matérielle de codices mésoaméricains n'a permis d'identifier la nature des liants rencontrés dans ces manuscrits. Les sources historiques décrivent le *tzauhtli*, une colle organique extraite de pseudo-bulbes d'orchidées (*Epidendrum pastoris* ou *Bletia campanulata*, le plus souvent) pouvant être également mélangée à des grains et tiges de maïs broyés. Il est utilisé comme adhésif pour le papier ou dans les peintures *a tempera* [González Tirado, 2006]. Les auteurs du 16^{ème} siècle ne mentionnent *a priori* pas son utilisation dans les codices, mais selon [Torres Montes, 2000] cette colle serait mélangée au gypse pour produire la couche préparatoire de base des codices. Des analyses menées en chromatographie en phase gazeuse sur des extraits de mucilage^{xx} d'orchidées ont mis en évidence la présence de monosaccharides (fructose, glucose) et du disaccharide associé (saccharose) pour ce qui est des sucres libres; l'hydrolyse totale des polysaccharides du mucilage a révélé la présence de galactose [Pena *et al.*, 1995].

Sans plus d'information à notre disposition, nous avons fait le choix d'utiliser deux liants courants, de source végétale et riches en polysaccharides : la gomme arabique^{xxi} et la colle végétale d'amidon de maïs^{xxii}, pour y mélanger le colorant en poudre et réaliser des couches picturales.

xx. Substance [végétale] qui se gonfle au contact de l'eau sans s'y dissoudre mais en formant une matière visqueuse [noa, a]. Mucilage désigne aussi la préparation élaborée à partir du mucilage ou de la dissolution d'une gomme végétale dans de l'eau.

xxi. Exsudat de sève durcie provenant d'arbres de la famille des acacias. Mélange complexe de polysaccharides (riches en galactose et arabinose) et de protéines.

xxii. Dispersion d'amidon de maïs dans de l'eau. L'amidon est un polysaccharide complexe composé d'unités de glucose

Par ailleurs, comme mentionné dans la partie 2.2 du Chapitre 1, les analyses menées sur le *Codex Borbonicus* ont mis en évidence que le support fibreux du manuscrit était enduit d'une couche préparatoire de gypse. Afin d'évaluer l'influence de cette couche préparatoire, nous avons réalisé des échantillons modèles de peintures sur des papiers avec ou sans couche préparatoire à base de gypse.

Le colorant en poudre a été mélangé aux deux liants choisis, la gomme arabique et la colle de maïs, pour trois concentrations différentes : 60, 120 et 240 g/L. Les matières colorées ainsi obtenues ont été appliquées au pinceau sur du papier Whatman 1 seul ou préalablement enduit d'une couche préparatoire de gypse (Figures 3.22).

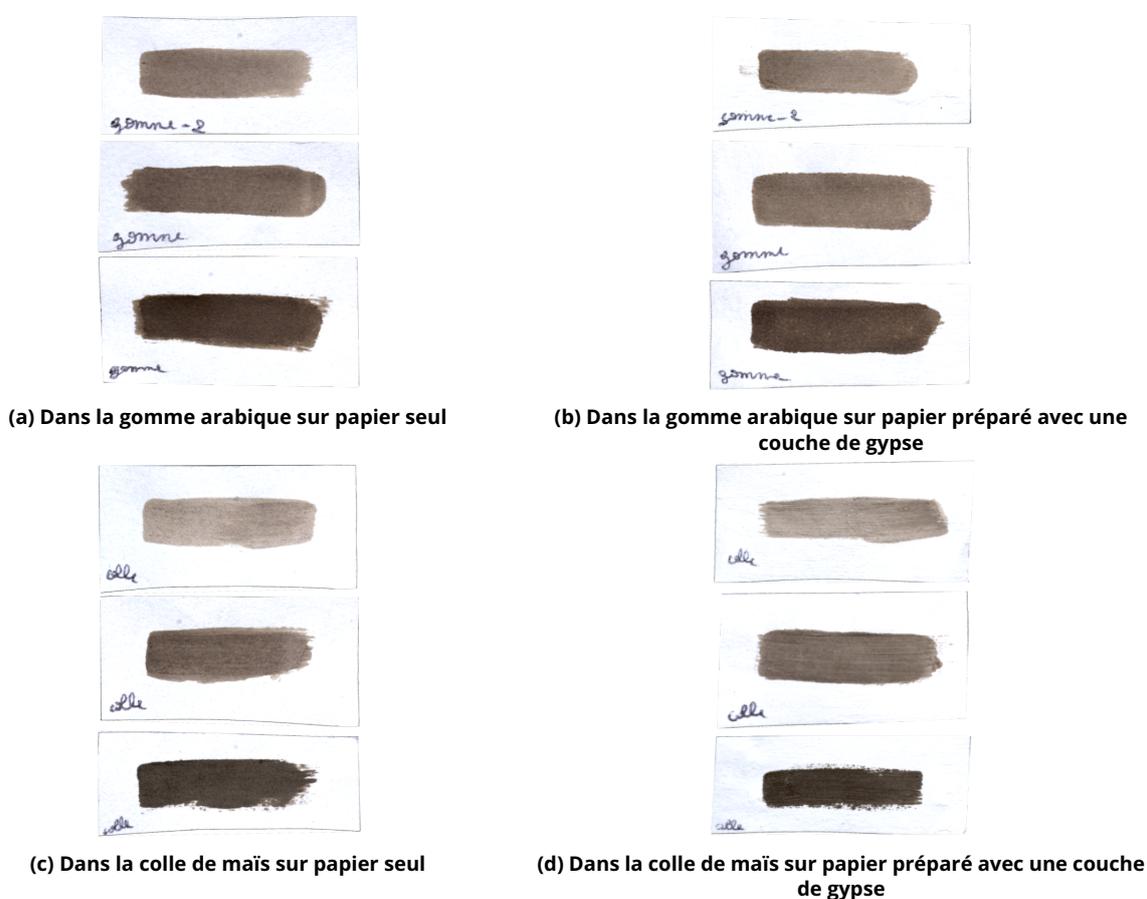
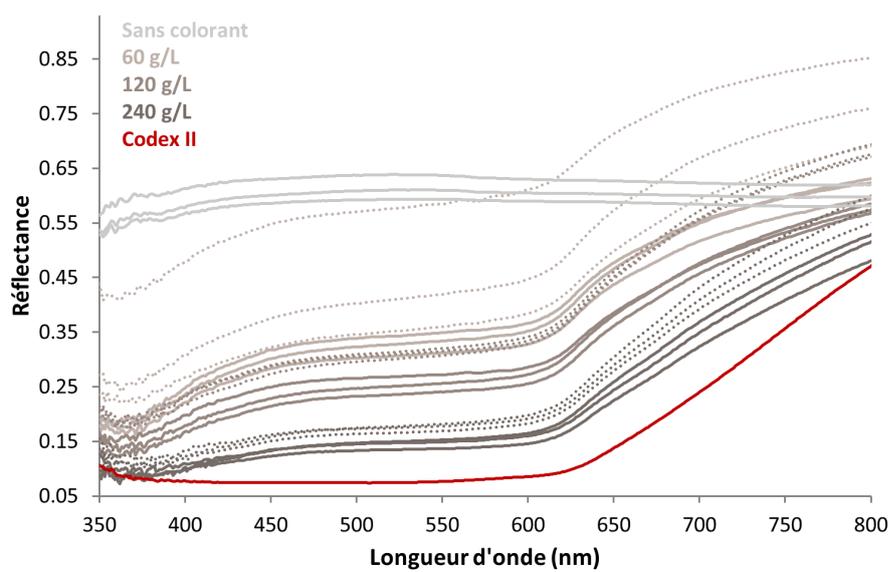


Figure 3.22 – Photographies des échantillons préparés à partir du colorant de *J. spicigera* en poudre dispersé dans les liants pour des concentrations de 60, 120 et 240 g/L.

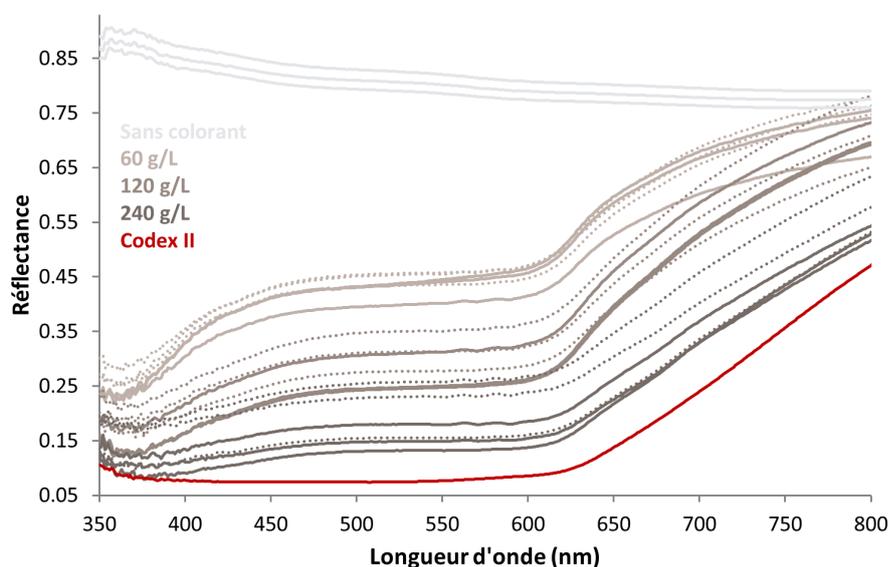
Les couches picturales obtenues présentent des colorations brunes, plus ou moins saturées selon leur concentration. Seule une très légère influence du liant sur le rendu coloré des peintures est perceptible. L'apparence globale de ces peintures modèles, surtout pour les plus concentrées, est bien plus proche de celles du *Codex Borbonicus* que tous les essais obtenus précédemment (dépôts de solution coloré, pigments laqués).

Nous avons donc évalué si les peintures ainsi obtenues présentaient des caractéristiques spectrales (absorption, fluorescence et diffusion Raman) similaires à celles du manuscrit.

Tout d'abord, les spectres de réflexion des couches picturales produites ont été enregistrés (Figure 3.23) comparés avec le spectre des peintures brunes de la seconde partie du *Codex Borbonicus*.



(a) Échantillons préparés dans la gomme arabique



(b) Échantillons préparés dans la colle de maïs

Figure 3.23 – Spectres de réflexion pour les échantillons préparés à partir du colorant de *J. spicigera* en poudre et peintures brunes du *Codex Borbonicus* partie II. Traits continus pour papier seul; pointillés pour papier préparé avec une couche de gypse. Pour comparaison, spectres des liants déposés sur papier sans colorant.

L'ensemble des échantillons présente une forme de spectre similaire, ayant comme seule principale différence le niveau d'absorbance : plus important pour les échantillons les plus concentrés et plus faible pour les moins concentrés. Nous pouvons également noter que les spectres mesurés pour les échantillons les plus concentrés se rapprochent de la signature spectrale des couches brunes du *Codex Borbonicus*. Une concentration supérieure en poudre colorée devrait permettre une meilleure adéquation.

Afin de rendre compte de façon quantitative des différences de couleurs entre les couches produites et les peintures du *Codex Borbonicus*, les coordonnées colorimétriques dans l'espace CIE $L^*a^*b^*$ ont été extraites à partir des données des spectres de réflexion. Elles sont représentées et comparées à celles des peintures brunes du manuscrit dans la Figure 3.24.

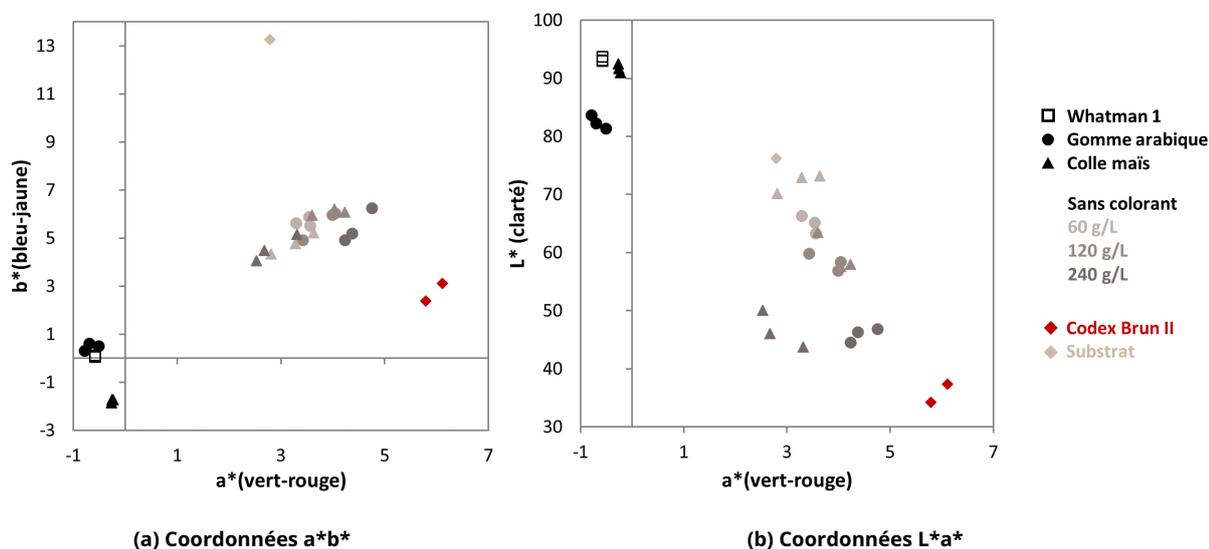


Figure 3.24 – Coordonnées $L^*a^*b^*$ des échantillons préparés à partir du colorant de *J. spicigera* en poudre dans de la gomme arabique et de la colle de maïs sur papier sans couche préparatoire. Pour comparaison, papier Whatman 1 sans peinture, gomme arabique et colle de maïs déposées sur papier sans colorant, substrat fibreux et peintures brunes de la partie II du *Codex Borbonicus*.

Dans le diagramme a^*b^* (Figure 3.24a), les points correspondants aux peintures brunes fabriquées sont relativement proches indépendamment du liant utilisé et de la concentration en poudre. Nous notons également que les points associés aux coordonnées des peintures brunes du *Codex Borbonicus* se différencient de ceux des reproductions modèles par des contributions rouge et bleu très légèrement supérieures. Cela suggère que la préparation mise en œuvre pour l'obtention des peintures du manuscrit permet d'un peu mieux conserver la teinte violette initiale du colorant (possiblement associée à la présence des composés X1 et X2).

4. Préparation du colorant pour une application en peinture

Dans le diagramme $L^*a^*b^*$, les échantillons se répartissent selon leur concentration : les moins concentrés donnant des nuances plus claires et les plus concentrés les plus foncées. Comme déjà mentionné pour les spectres de réflexion, les peintures brunes du *Codex Borbonicus* sont plus foncées que les couches modèles produites les plus concentrées. Il aurait ainsi été intéressant de tester des concentrations supérieures à 240 g/L pour tenter d'atteindre des saturations similaires à celles des couches picturales du manuscrit.

Ces différences de coloration peuvent être appréciées dans les rendus RVB correspondant à ces mesures colorimétriques (Figure 3.25). Pour chaque échantillon, trois points de mesure des coordonnées $L^*a^*b^*$ ont été réalisés. Sur la Figure 3.25, chaque carré associé à un échantillon est ainsi constitué de trois bandes horizontales correspondant à la simulation de la couleur de chaque réplicat, permettant de représenter les éventuelles inhomogénéités de la couche de peinture. À titre indicatif, la simulation des couleurs apparentes du papier Whatman 1 et des liants sans colorant y sont également présentés.

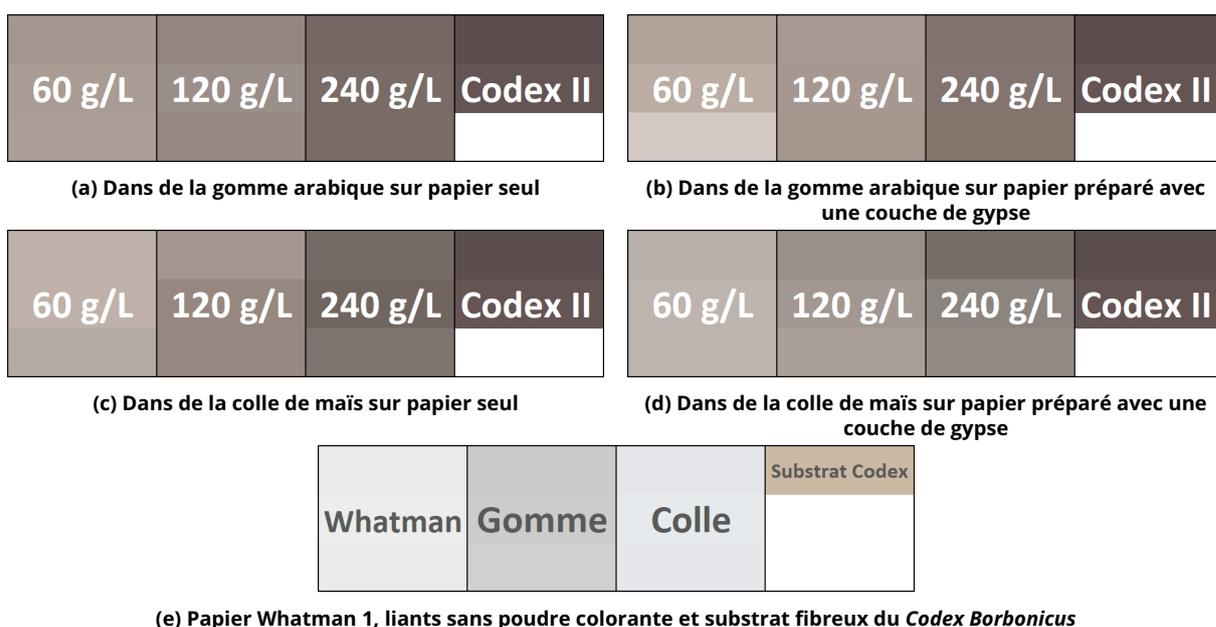
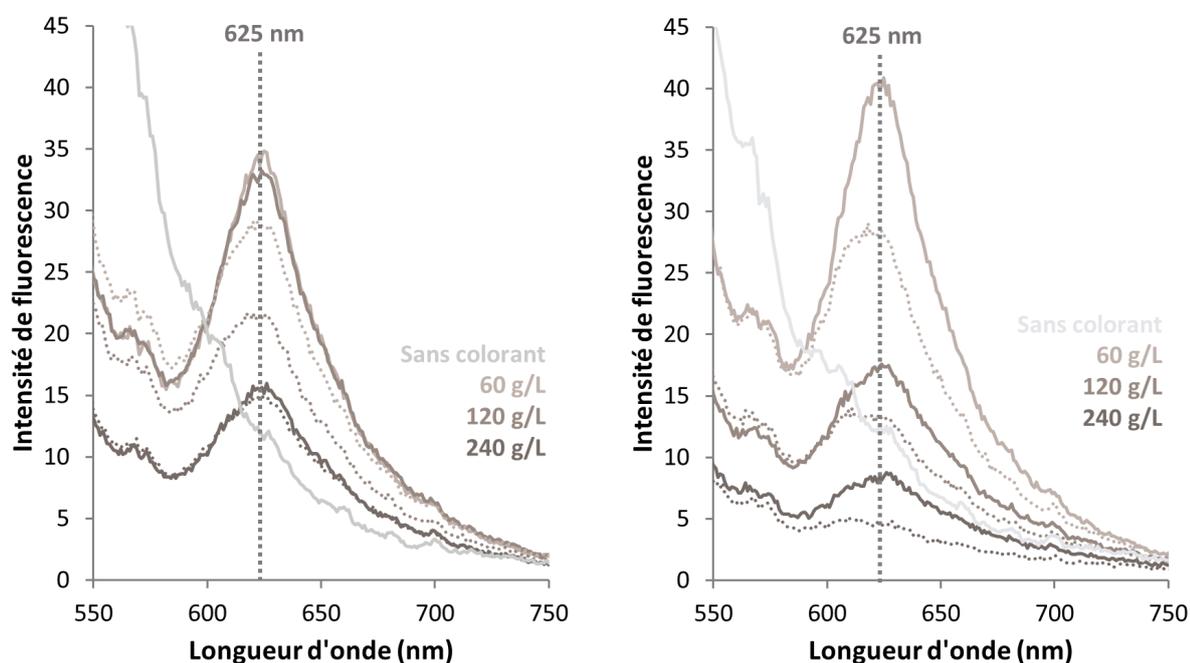


Figure 3.25 – Rendus RVB correspondant aux coordonnées colorimétriques $L^*a^*b^*$ mesurées pour les échantillons préparés à partir du colorant de *J. spicigera* en poudre. Pour chaque échantillon, la mesure a été faite en triplicat et les carrés sont découpés en trois bandes horizontales correspondant à chacune des mesures. Pour comparaison, substrat fibreux et peintures brunes du *Codex Borbonicus* partie II.

Les spectres d'émission de fluorescence des échantillons modèles produits ont été également enregistrés (Figure 3.26).



(a) Échantillons préparés dans la gomme arabique.

(b) Échantillons préparés dans la colle de maïs.

Figure 3.26 – Spectres d'émission de fluorescence pour les échantillons préparés à partir du colorant de *J. spicigera* en poudre. λ_{ex} 250 nm.

Traits continus pour papier seul; pointillés pour papier préparé avec une couche de gypse. Pour comparaison, spectres des liants déposés sur papier sans colorant.

Nous retrouvons l'émission de fluorescence caractéristique de l'extrait de *Justicia spicigera* centrée autour de 625 nm. On peut noter que les intensités d'émission sont relativement faibles. Il n'est malheureusement pas possible de comparer leur niveau à celui de l'émission des peintures du *Codex Borbonicus*, car deux dispositifs de mesure distincts ont été utilisés et que l'intensité n'a pas été calibrée. Nous observons que l'augmentation de la concentration entraîne en une atténuation de l'intensité du signal, résultant probablement de l'absorption de l'émission par la couche colorée.

Comme dans le cas des dépôts de solution sur papier Whatman avec des temps de repos longs (décrits dans la partie 3.1), la fluorescence enregistrée n'est *a priori* pas générée par les composés X1 et X2 absents de l'extrait, mais probablement par des composés minoritaires dérivés.

Les spectres Raman des couches picturales obtenus ont également été enregistrés. À titre d'exemple, le signal obtenu pour les peintures les plus concentrées dans la colle de maïs est présenté en Figure 3.27.

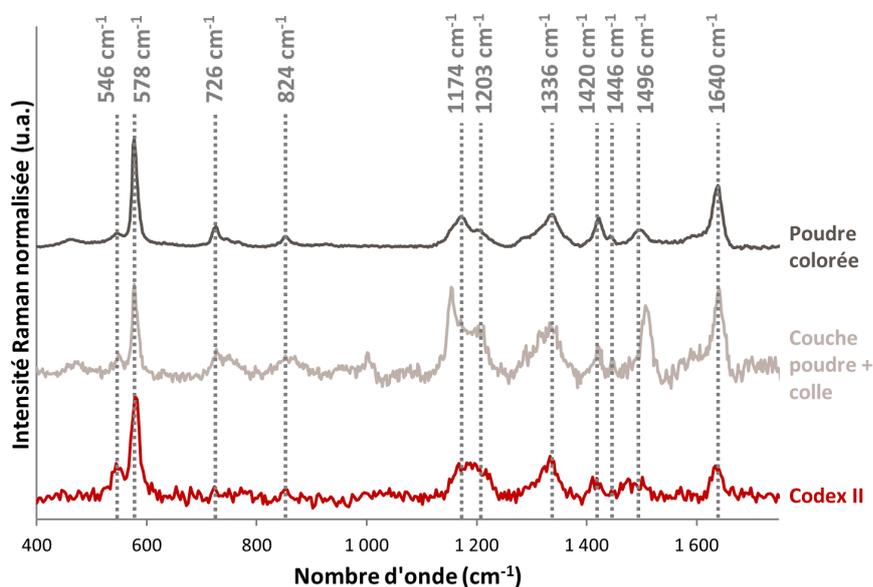


Figure 3.27 – Spectres Raman du colorant de *J. spicigera* en poudre, des échantillons de peinture préparés à partir de la poudre dans de la colle de maïs à 240 g/L et des peintures brunes du *Codex Borbonicus* partie II. Laser 532 nm. Soustraction de la ligne de base.

Malgré une importante fluorescence due à la présence des liants, nous retrouvons pour les peintures fabriquées en laboratoire, les bandes Raman caractéristiques de la poudre colorante de *Justicia spicigera*. Le rapport signal/bruit est assez bas mais comparable à celui du signal enregistré pour les couches brunes du *Codex Borbonicus*.

Bilan intermédiaire Nous avons donc ainsi montré qu'il était possible d'obtenir des couches de peintures brunes à partir de la **poudre colorante** résultant de l'évaporation de l'extrait coloré des feuilles de *Justicia spicigera*. La transformation du colorant sous forme de poudre a permis de faciliter son utilisation pour l'obtention de peinture. En effet, de cette façon, il était possible de stocker le colorant sans craindre son évolution au cours du temps, contrairement à l'extrait liquide. De plus, en modifiant la concentration du colorant en poudre dans le liant dans lequel elle est dispersée, l'apparence des peintures résultantes était facilement modifiable.

Si les peintures obtenues avec cette poudre colorante présentent les signatures spectrales caractéristiques (émission de fluorescence et signal Raman) enregistrées dans les peintures du *Codex Borbonicus*, leur apparence n'est toutefois pas exactement identique, notamment au niveau de la teinte obtenue. Elle apparaît comme légèrement

plus violette dans le cas des peintures du *Codex Borbonicus*, d'après les coordonnées a^*b^* . Il est à ce stade difficile de connaître l'origine précise de cette différence. Cela peut évidemment provenir du protocole de préparation du colorant en poudre ne permettant pas de suffisamment conserver la coloration violette initiale de l'extrait (associée à l'éventuelle présence des composés X1 et X2), mais aussi du liant utilisé ou encore de la contribution du support sous-jacent.

Pour conclure ce chapitre et faire le lien avec les problématiques de conservation des matériaux du patrimoine, nous nous sommes intéressés à la sensibilité à la lumière du colorant de *Justicia spicigera*, notamment dans le cas des couches de peintures produites. La sensibilité à la lumière ayant été évaluée *in situ* pour les peintures brunes du *Codex Borbonicus*, cela a fait l'objet d'un dernier point de comparaison entre les propriétés des peintures produites en laboratoire et celle du manuscrit pour évaluer la cohérence du protocole de fabrication que nous avons adopté.

5 Vieillessement artificiel à la lumière

Dans cette partie, nous avons ainsi cherché à mettre en évidence l'éventuelle influence d'un vieillissement à la lumière sur l'apparence, la signature spectrale et la composition moléculaire des couches picturales préparées à base du colorant extrait de *Justicia spicigera*. Le but a été notamment d'évaluer les possibilités d'identification du colorant dans des objets historiques dégradés.

Dans un premier temps, l'influence du vieillissement à la lumière a été étudiée sur les dépôts de solutions aqueuses fraîches. Même si ces couches colorées ne présentent pas l'apparence des peintures du *Codex Borbonicus*, elles présentent l'avantage d'avoir une composition moléculaire bien connue à laquelle nous pouvons relier, en partie, les signatures spectrales associées. Nous les avons donc considérées comme point de départ de cette étude de vieillissement.

Par la suite, la stabilité face à un vieillissement à la lumière des couches picturales produites à partir du colorant en poudre a également été évaluée.

5.1 Vieillissement des dépôts d'extrait aqueux

Des dépôts de solution colorée fraîche sur papier Whatman 1, tels que décrits précédemment (partie 2.1.2) ont été exposés à un vieillissement artificiel à la lumière dans des conditions de température et d'humidité régulées pendant 26 h. L'évolution des dépôts en fonction du temps de vieillissement est présentée dans le suivi photographique de la Figure 3.28, sous éclairage visible et sous UV. Nous pouvons constater la perte de la coloration violette du dépôt, associée à une diminution de la fluorescence rouge.

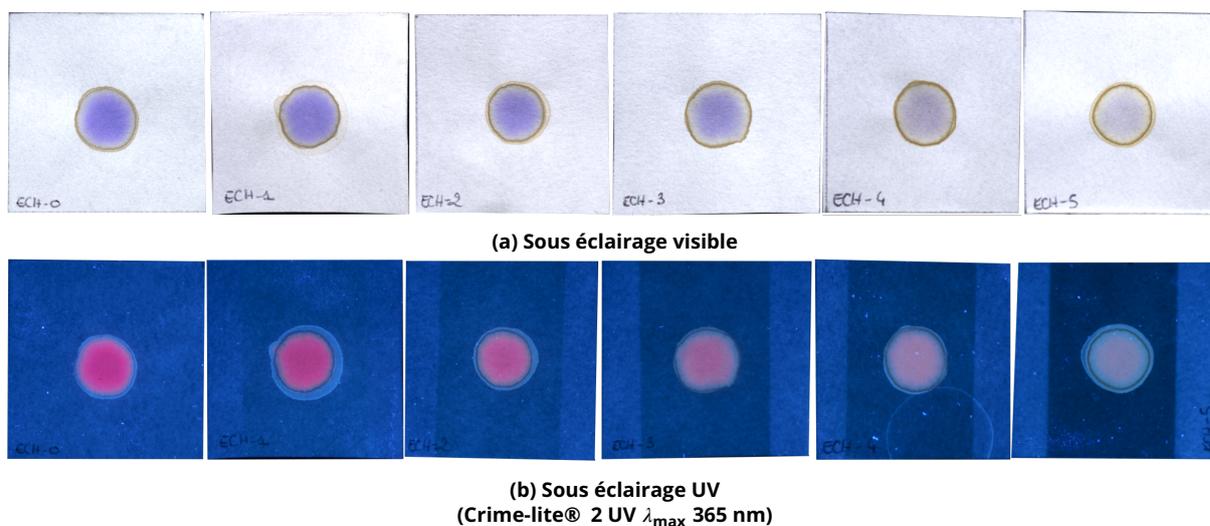


Figure 3.28 – Évolution de l'extrait aqueux frais de *J. spicigera* déposé sur support papier. De gauche à droite : sans vieillissement, 1 h, 2 h, 3 h, 5,5 h et 26 h.

Les spectres de réflexion et d'émission de fluorescence associés aux différents points de vieillissement sont tracés dans la Figure 3.29. Nous observons une diminution de l'intensité de la bande d'absorbance centrée autour de 599 nm ainsi qu'une diminution de l'intensité de la bande d'émission de fluorescence centrée à 632 nm, en adéquation avec les observations visuelles.

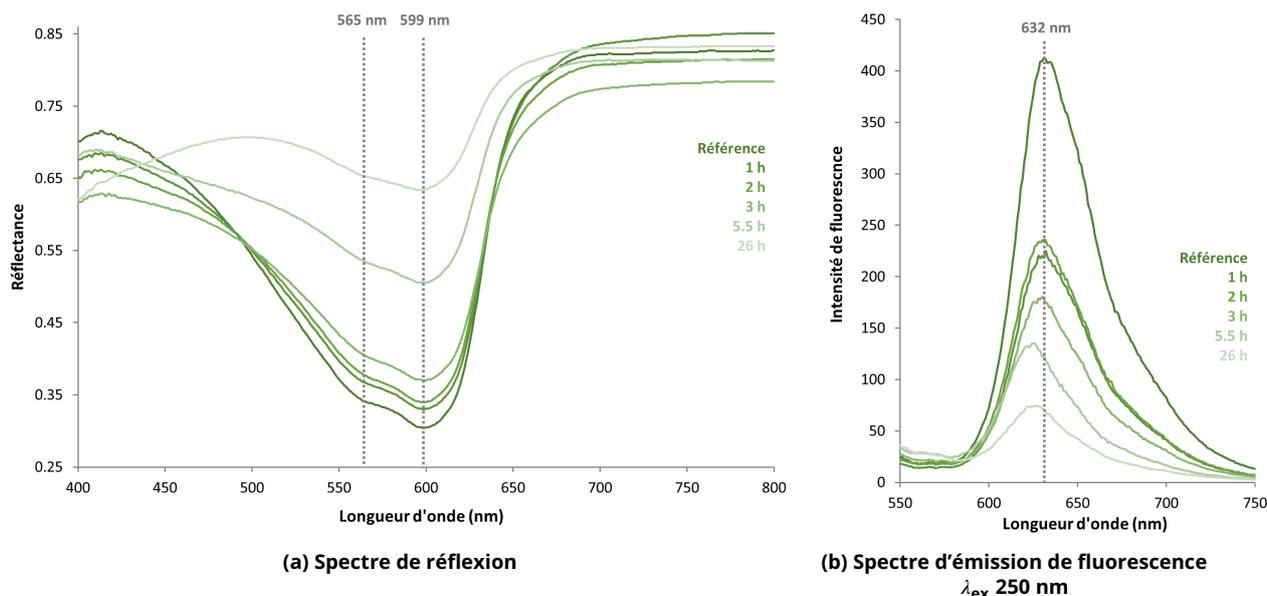


Figure 3.29 – Spectres de réflexion et d’émission de fluorescence de l’extrait aqueux frais de *J. spicigera* déposé sur papier au cours du vieillissement.

Nous avons ensuite examiné les possibilités de relier ces modifications spectrales à des variations de la composition moléculaire.

La composition des dépôts exposés au vieillissement à la lumière a donc été étudiée par HPLC. Le colorant des dépôts vieillis pendant 1 h et 24 h a été réextrait du support avec un mélange méthanol-eau 50/50, selon le protocole mentionné précédemment^{xxiii}. Les profils chromatographiques correspondants aux extraits des dépôts vieillis sont comparés à celui d’un extrait d’un dépôt de référence n’ayant pas subi le vieillissement (Figures 3.30 et 3.31, respectivement pour une détection dans le visible et en total scan).

Pour l’échantillon ayant subi un vieillissement de 1 h, aucune différence notable n’est observée dans sa composition par rapport au dépôt de référence, que ce soit pour les composés colorés (Figure 3.30) ou les autres composés (Figure 3.31). Dans le cas du dépôt vieilli 26 h, nous constatons la quasi complète disparition des composés responsables de la coloration (essentiellement X1) et une diminution de la concentration des autres composés comme les flavonols (F1, F2 et F3). Nous notons l’apparition, avec une faible absorption, d’un composé détecté pour un temps de rétention de 22,5 min avec des maxima d’absorption à 266 et 368 nm (spectre en Annexe F, Figure F.7). Aucune apparition flagrante de produits de dégradation associé la perte de la coloration n’est observée dans les chromatogrammes obtenus par détection DAD ou MS.

xxiii. Et dont l’optimisation est détaillée en Annexe I

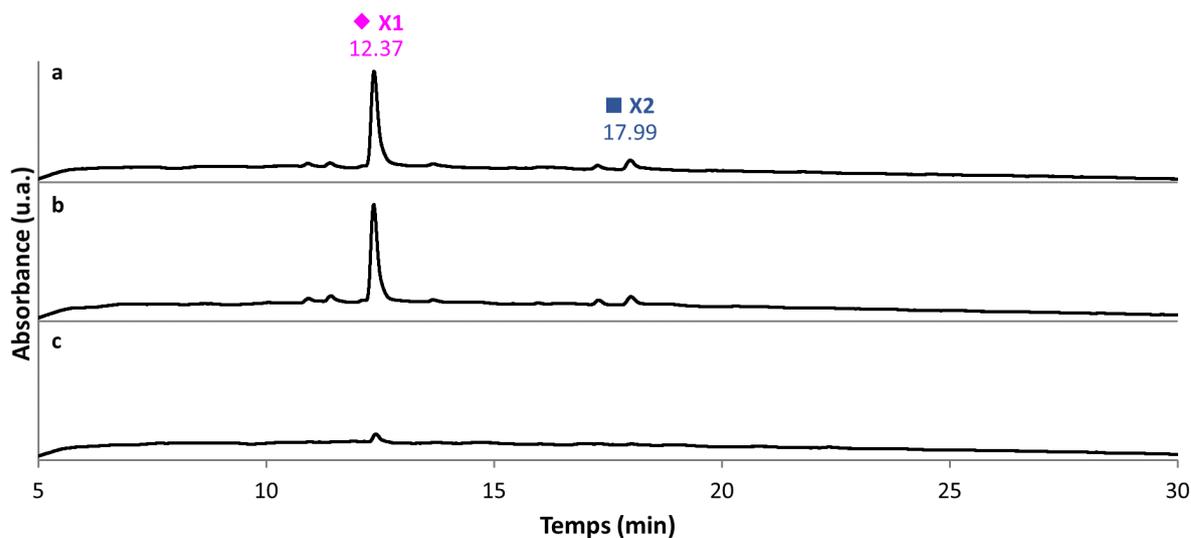


Figure 3.30 – Chromatogrammes du colorant réextrait du papier.
a) Sans vieillissement b) 1 h de vieillissement et c) 26 h de vieillissement.

Phase stationnaire : Strategy™ C18-HQ.

Phase mobile : A - H₂ 0,1 % HCOOH / B- MeCN 0,1 % HCOOH.

Gradient : 5-50 % B de 0 à 30 min puis 50 % B de 30 à 40 min. Détection DAD 400-750 nm.

Composés identifiés : ★ : A1; ◆ : A2; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; ■ : X2; + : F3.

(Attributions correspondant au Tableau 3.1)

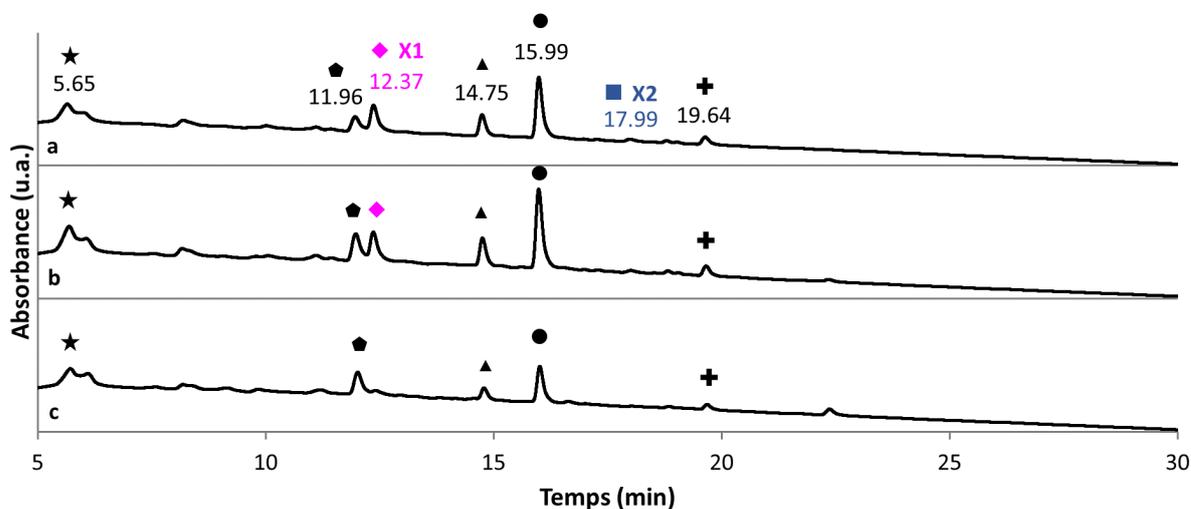


Figure 3.31 – Chromatogrammes du colorant réextrait du papier.
a) Sans vieillissement b) 1 h de vieillissement et c) 26 h de vieillissement.

Phase stationnaire : Strategy™ C18-HQ.

Phase mobile : A - H₂ 0,1 % HCOOH / B- MeCN 0,1 % HCOOH.

Gradient : 5-50 % B de 0 à 30 min puis 50 % B de 30 à 40 min. Détection DAD 200-750 nm.

Composés identifiés : ★ : A1; ◆ : A2; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; ■ : X2; + : F3.

(Attributions correspondant au Tableau 3.1)

Il est à noter que les concentrations récupérées suite à l'extraction des dépôts vieillis artificiellement étaient particulièrement faibles et que cela n'est pas favorable à la détection de produits de dégradation pouvant être présents à l'état de traces ou présentant des faibles absorptions dans le domaine UV-Vis.

Ces analyses de suivi de la composition chimique du colorant suite à un vieillissement à la lumière ne nous ont pas permis de comprendre la transformation moléculaire associée à la décoloration et à la perte de fluorescence des échantillons. Elles mériteraient d'être approfondies notamment en modifiant les méthodes d'extraction des dépôts et de séparation en HPLC. En effet, celles mises en œuvre ont été initialement optimisées pour l'extraction et l'analyse de composés colorés. Elles sont probablement peu adaptées à leurs produits de dégradation. Cela n'a cependant pas pu être traité dans le cadre de ce travail.

Enfin, pour conclure ce chapitre, l'évaluation de la stabilité des couches de peintures fabriquées à partir du colorant de *Justicia spicigera* en poudre est présentée dans la partie suivante.

5.2 Vieillissement des couches picturales

Dans cette partie, l'influence du vieillissement artificiel à la lumière sur l'apparence et la signature spectrale des couches picturales a été examiné.

L'impact du vieillissement à la lumière sur les couches picturales fabriquées en laboratoire n'a été évalué que sur les peintures les plus concentrées (240 g/L) en raison de leur ressemblance aux peintures brunes du manuscrit (comme détaillé dans la partie 4.2). Les échantillons ont subi un vieillissement artificiel à la lumière jusqu'à 26 h, en conditions de température et d'humidité régulées. Le suivi photographique au cours du vieillissement est présenté en Figure 3.32 pour les différentes couches de peinture.

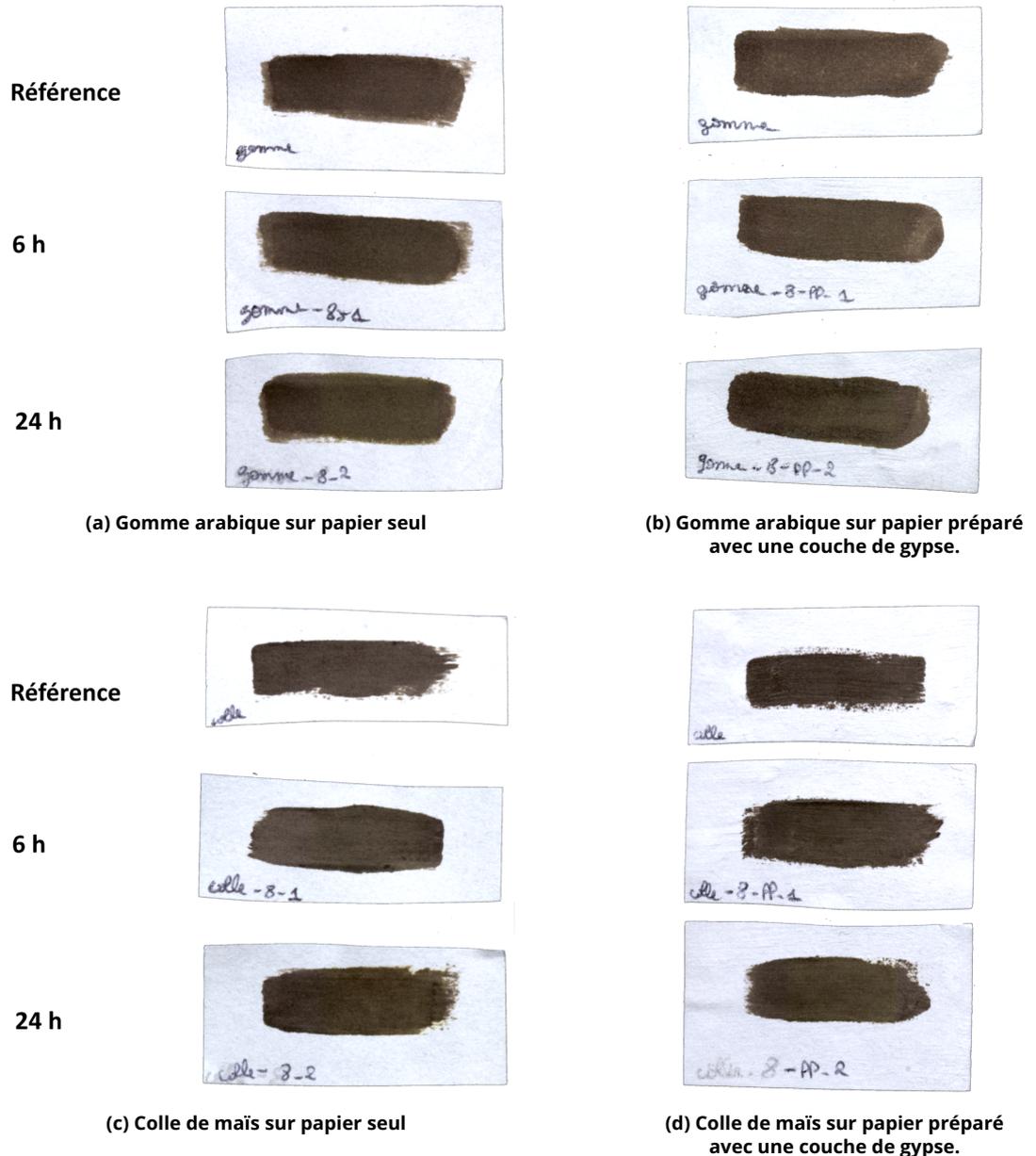


Figure 3.32 – Photo des échantillons à 240 g/L au cours du vieillissement à la lumière. De haut en bas : Référence non vieillie, vieillissement 6 h et 24 h.

Peu de différences sont visibles à l'œil nu sur le suivi photographique. Pour une évaluation plus fine des différences de couleurs, les rendus RGB obtenus à partir des coordonnées colorimétriques $L^*a^*b^*$ sont présentés dans la Figure 3.33. Comme précédemment, trois points de mesure de ces coordonnées ont été réalisés sur un même échantillon, permettant de constater d'éventuelles inhomogénéités des échantillons. Certaines sont notamment visibles par exemple pour l'échantillon dans la gomme sur papier non préparé avec un vieillissement de 24 h (Figure 3.33a) ou pour celui dans la colle sur papier préparé vieilli 6 h (Figure 3.33d).

La décoloration a été évaluée en calculant les écarts chromatiques $\Delta E(76)$ moyens entre les échantillons vieillis et l'échantillon référence non vieilli. Ils sont indiqués sur la Figure 3.33. Les valeurs obtenues sont relativement faibles et cohérentes avec l'absence de variation flagrante de coloration des échantillons (Figure 3.32). La préparation du colorant sous forme de peinture a donc permis d'améliorer sa résistance à la lumière, par rapport à ce que nous avons pu observer pour les dépôts de solution colorée fraîche (partie 5.1).

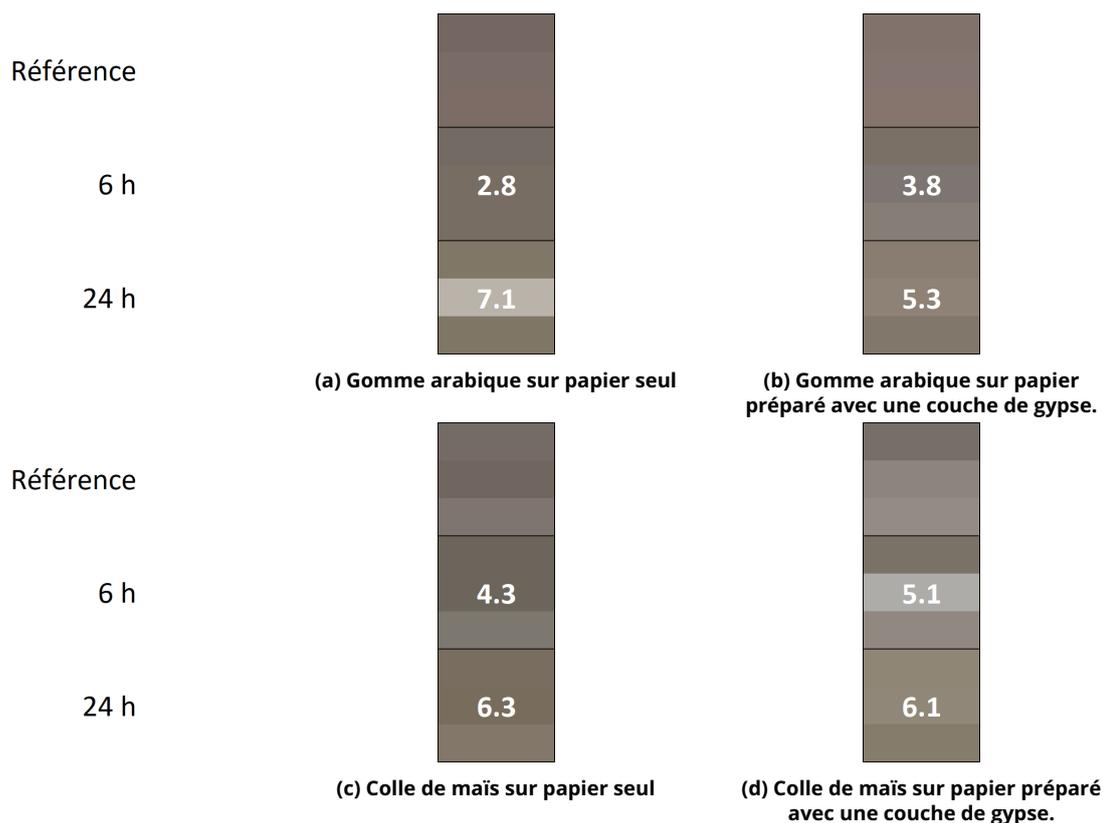
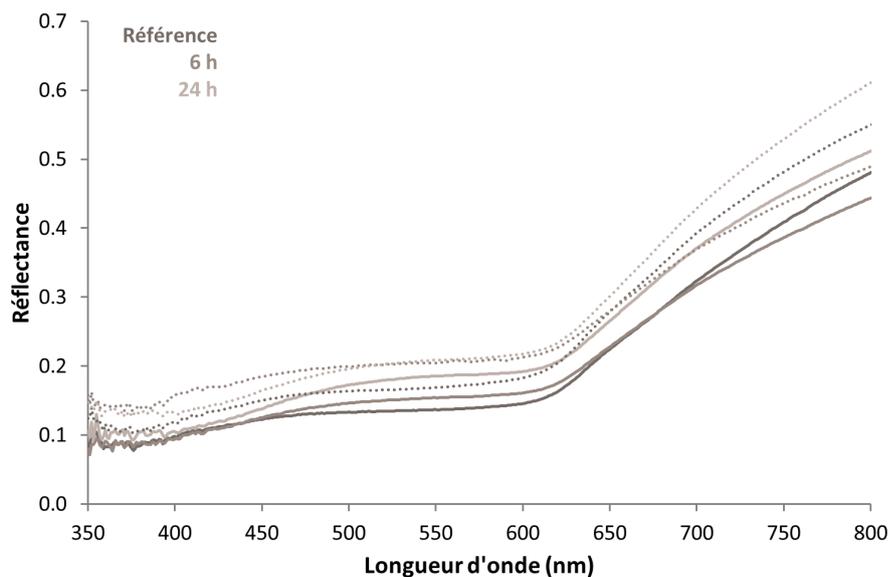


Figure 3.33 - Simulation du rendu couleur RGB pour les échantillons à 240 g/L au cours du vieillissement.

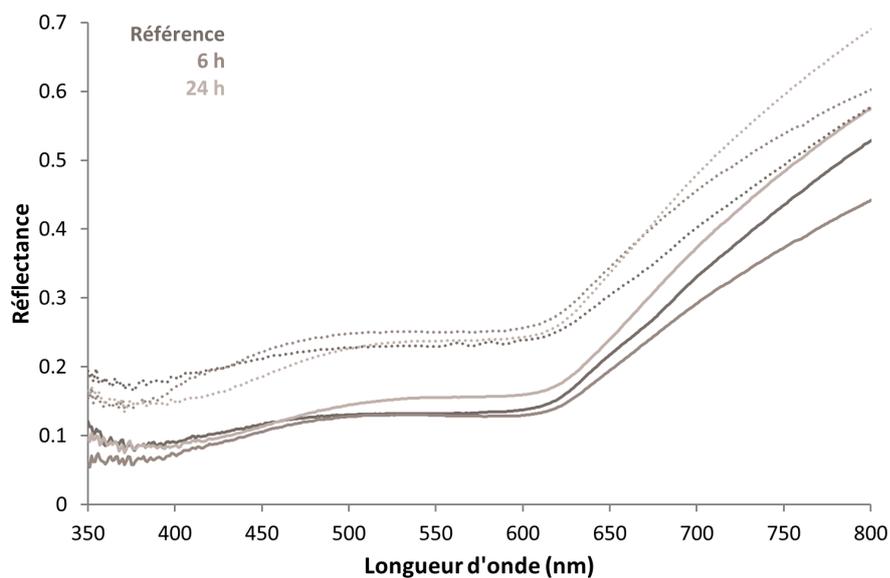
De haut en bas : référence non vieilli, vieillissement 6 h et vieillissement 24 h. Pour chaque échantillon, la mesure a été faite en triplicat; les carrés sont découpés en trois bandes horizontales correspondant à chacune des mesures. Valeurs de $\Delta E(76)$ moyens.

Nous avons ensuite suivi les variations des caractéristiques spectrales (absorption et fluorescence) des peintures sous l'effet du vieillissement à la lumière.

Tout d'abord, aucune différence significative n'a été observée entre les caractéristiques des spectres de réflexion des échantillons vieillis et des échantillons de référence non vieillis (Figure 3.34). Cela était assez prévisible au vu de l'absence de variation dans la couleur des couches, décrite au-dessus.



(a) Échantillons préparés dans la gomme arabique



(b) Échantillons préparés dans la colle de maïs

Figure 3.34 – Spectres de réflectance pour les échantillons préparés à partir du colorant de *J. spicigera* en poudre dans les liants (240 g/L) au cours du vieillissement à la lumière : 6 h et 24 h de vieillissement.

Traits continus pour papier seul ; pointillés pour papier préparé avec une couche de gypse.

Enfin, les spectres d'émission de fluorescence des échantillons de peintures au cours du vieillissement sont présentés en Figure 3.35.

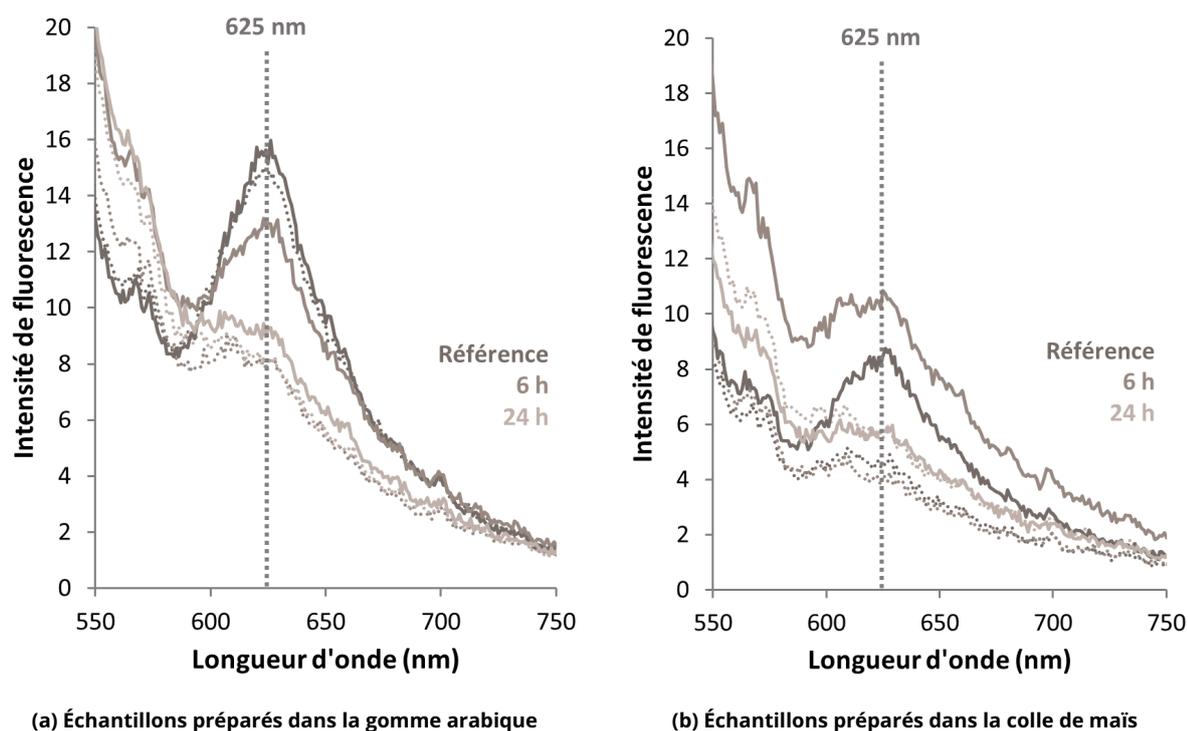


Figure 3.35 - Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 250 \text{ nm}$) pour les échantillons préparés à partir du colorant de *J. spicigera* en poudre à 240 g/L dans les liants au cours du vieillissement à la lumière : 6 h et 24 h de vieillissement.

Traits continus pour papier seul ; pointillés pour papier préparé avec une couche de gypse.

Le maximum d'émission centré à 625 nm est détecté pour tous les échantillons. Nous notons toutefois son atténuation considérable pour les échantillons ayant subi un vieillissement de 24 h, suggérant l'instabilité des fluorophores face à une exposition lumineuse prolongée.

Une émission de fluorescence étant détectée pour les peintures brunes du *Codex Borbonicus*, nous pouvons supposer que les couches du *Codex Borbonicus* n'ont pas subi de dommages liés à une exposition prolongée à la lumière. On ne peut pas non plus exclure que le mode de préparation des peintures soit différent de celui mis en œuvre dans cette thèse et qu'il permette une meilleure stabilité des fluorophores.

Pour rappel, les différences d'intensité de fluorescence entre les échantillons modèles et les peintures du *Codex Borbonicus* sont difficilement comparables car elles ont été réalisées avec des dispositifs distincts et n'ont pas été calibrées.

Il serait pertinent de pouvoir relier la diminution de la fluorescence à une évolution moléculaire. Cependant au vu de la complexité de la composition moléculaire associée à la poudre (précédemment discutée dans la partie 4.1) et des faiblesses de notre protocole de réextraction du colorant après son application sur un support, nous avons jugé prématuré de réaliser les analyses chromatographiques associées au vieillisse-

ment des couches de peintures. Cette diminution de la fluorescence demeure une piste très intéressante à creuser : elle pourrait s'avérer être un indicateur spécifique d'un état dégradé du colorant dans les matériaux du patrimoine.

Pour une meilleure compréhension des phénomènes associés à l'exposition à la lumière de ces peintures, il serait également intéressant de réaliser des vieillissements sur des temps plus longs, jusqu'à une décoloration marquée.

Hors du contexte du laboratoire, la sensibilité à la lumière des objets historiques peut être évaluée *in situ* grâce à des expériences en micro-décolorimétrie (MFT, *micro-fading test*).

Une source de lumière très intense est concentrée sur une zone de diamètre restreint et le suivi de la décoloration du matériau étudié, induite par la source lumineuse est mesuré en temps réel grâce à la mesure des spectres de réflexion au cours du temps. Les spectres mesurés sont convertis en coordonnées colorimétriques CIE $L^*a^*b^*$ et les écarts chromatiques $\Delta E(76)$ entre la mesure initiale et la mesure à chaque instant permet de suivre le changement de couleur. Cette technique est particulièrement adaptée aux objets historiques, car la valeur du ΔE pouvant être suivie en temps réel, il suffit d'arrêter l'expérience avant que le changement de couleur ne soit perceptible, pour conserver l'intégrité visuelle de l'objet étudié.

Une échelle de référence, l'échelle des laines bleues, est utilisée pour évaluer la sensibilité à la lumière d'un échantillon ou objet inconnu. Elle est constituée de 8 laines teintées, plus ou moins sensibles à la lumière^{xxiv}. La décoloration ΔE de l'échantillon étudié est comparée à celle de chacune des laines dans les mêmes conditions d'exposition à la lumière. L'échantillon est ainsi positionné dans une gamme relative de sensibilité à la lumière : très sensible pour des décolorations plus importantes que la laine bleue 1, sensible pour des décolorations comprises entre celles de la laine bleue 1 et 2, modérément sensible pour des décolorations comprises entre la laine bleue 2 et 3 et enfin, peu sensible pour des décolorations moins importantes que celles de la laine bleue 3 [del Hoyo-Meléndez et Mecklenburg, 2012].

Des résultats quant à la résistance des peintures brunes du *Codex Borbonicus* ont été obtenus en appliquant cette méthodologie lors de la thèse Fabien Pottier [Pottier, 2017].

Ainsi, pour finir et compléter les analyses menées sur les peintures fabriquées en laboratoire à partir du colorant de *Justicia spicigera* en poudre, nous avons donc examiné leur stabilité avec le même dispositif de micro-décolorimétrie. Les résultats obtenus ont pu directement être comparés à ceux obtenus pour les peintures du manuscrit.

xxiv. La laine bleue 1 ou LB1 est la plus sensible et la laine bleue 8 ou LB8, la plus résistante.

Les courbes de décoloration obtenues en micro-décolorimétrie pour les peintures du *Codex Borbonicus* et les couches picturales les plus concentrées produites à partir du colorant en poudre sont présentées en Figure 3.36.

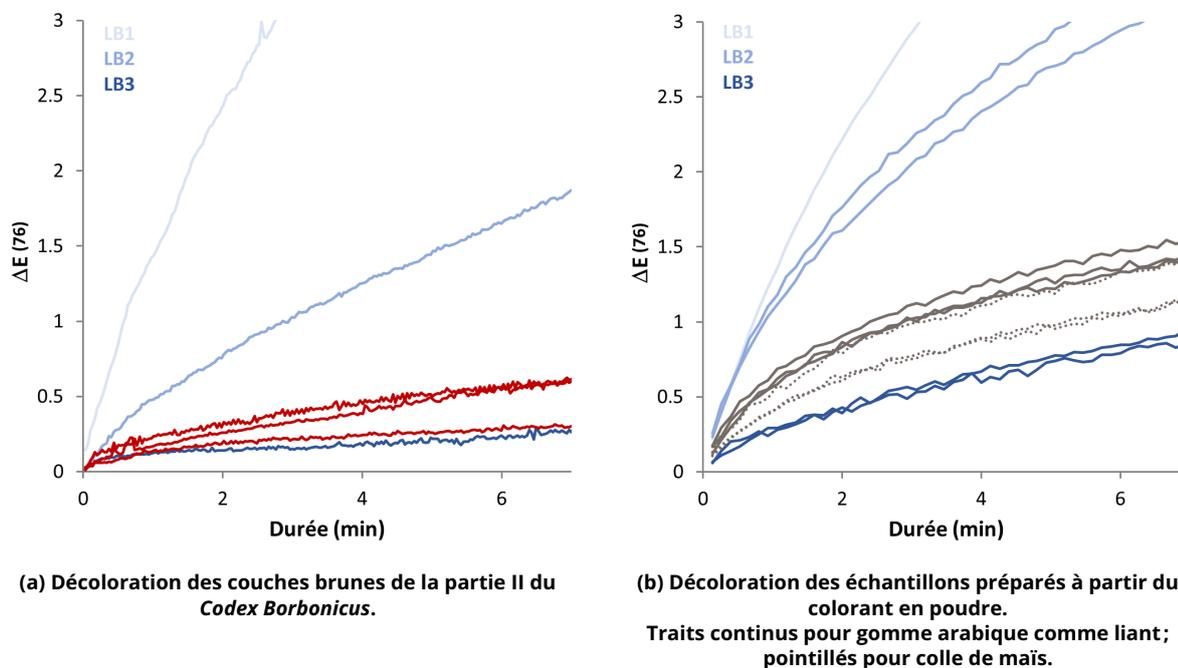


Figure 3.36 – Décoloration des couches brunes du *Codex Borbonicus* et des échantillons préparés à partir du colorant de *Justicia spicigera* en poudre à 240 g/L dans les liants, comparées aux standards LB1, LB2 et LB3..

Une décoloration similaire, comprise entre les laines bleues 2 et 3^{xxv}, est observée pour les peintures brunes du *Codex Borbonicus* et les reproductions de couches picturales à partir du colorant de *Justicia spicigera* en poudre, témoignant de leur sensibilité modérée à la lumière.

Même si rien ne peut nous garantir que le procédé que nous avons mis en œuvre est identique à celui employé lors de la réalisation du *Codex Borbonicus*, le mélange de la poudre colorée résultant de l'évaporation de l'extrait de feuilles de *Justicia spicigera* à un liant (gomme arabique ou colle végétale de maïs), nous a permis de reproduire des couches picturales présentant une apparence, une signature spectrale et une sensibilité à la lumière comparables à celles des peintures brunes rencontrées dans le manuscrit.

xxv. Les différences constatées entre les courbes des laines bleues des deux expériences peuvent s'expliquer par des variations de puissance de la lampe utilisée.

6 Bilan du chapitre

L'extrait coloré obtenu par macération des feuilles de *Justicia spicigera* dans de l'eau à température ambiante se caractérise par une coloration violette, associée à un maximum d'absorption centré à 590 nm. Comme de nombreux colorants, il est sensible aux variations de pH. Pour des valeurs de pH inférieures à 6, l'extrait vire au orange, avec un décalage du maximum d'absorption autour de 490 nm. Ce comportement suggère le caractère ionisable des composés responsables de la coloration de l'extrait. La solution colorée présente aussi une fluorescence intrinsèque dont le maximum d'émission est détecté autour de 620 nm.

Lorsque l'extrait coloré est déposé sur un support papier, des maxima d'absorption et d'émission de fluorescence comparables à ceux en solution sont observés (respectivement à 600 nm et 630 nm). Les maxima subissent toutefois un léger décalage d'une dizaine de nm vers des longueurs d'ondes supérieures par rapport aux valeurs obtenues en solution, causé par une possible interaction avec le support ou par l'agrégation des molécules à l'état solide.

Les propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence du colorant extrait de *Justicia spicigera* présentent des similarités avec celles de l'orseille, un colorant violet extrait des lichens et riche en molécules de la famille des phénoxazones.

Les signaux d'émission de fluorescence et Raman enregistrés pour l'extrait obtenu à partir des feuilles de *Justicia spicigera* coïncident avec ceux détectés pour les peintures brunes du *Codex Borbonicus*. Néanmoins, l'apparence des dépôts du colorant sur papier sans préparation supplémentaire ne s'apparente en rien à celle des peintures brunes du *Codex Borbonicus* : une coloration violette et très peu couvrante est obtenue.

L'analyse chromatographique de l'extrait coloré a mis en évidence la présence de plusieurs composés absorbant dans la gamme du visible et dont les maxima d'absorption, sensibles à la variation de pH de la phase mobile, correspondent à ceux de l'extrait total. Deux d'entre eux, X1 et X2, semblent contribuer de manière prépondérante à la coloration de l'extrait. L'exploitation de leurs rétentions en HPLC, leurs spectres d'absorption ou leurs données de fragmentation en spectrométrie de masse n'a pas permis d'identifier précisément leur structure. Ainsi, afin de permettre leur analyse structurale approfondie, notamment par spectroscopie RMN et spectrométrie de masse à haute résolution en infusion directe, leur purification a été envisagée. Une fois isolés, l'évaluation de la contribution de ces composés colorés à la signature spectrale caractéristique de l'extrait de *Justicia spicigera* (émission de fluorescence et Raman) sera également considérée.

L'extrait coloré s'est également révélé instable en solution. Sa coloration (et donc ses caractéristiques d'absorption) ainsi que sa composition moléculaire évoluent lors que la solution filtrée est laissée au repos. Les composés colorés X1 et X2 ne sont notamment présents en concentration significative qu'à des temps de repos assez courts (approximativement inférieurs à 24 h et variables selon les lots). La composition de l'extrait finit par se stabiliser au bout de quelques jours, avec des teneurs très faibles, voire nulles, en ces deux molécules. Si plusieurs composés absorbant dans le visible ont été détectés pour des temps de repos plus avancés, leurs faibles concentrations et la non-reproductibilité de leur présence selon les extraits analysés n'a pas permis d'envisager leur purification et leur collecte en quantité suffisante pour leur analyse structurale approfondie.

Toujours est-il que quel que soit le temps de repos de la solution, les signaux d'émission de fluorescence et Raman ayant permis l'identification de *Justicia spicigera* dans les peintures brunes du manuscrit ont été détectés. Il est également intéressant de noter qu'une fois déposé sur support papier (et non exposé à la lumière), la composition du colorant n'évolue plus. Le dépôt permet ainsi de figer un état de l'évolution de l'extrait.

Enfin, des échantillons modèles de couches picturales ont été élaborés par mélange de la poudre colorée résultant de l'évaporation jusqu'à siccité d'un extrait aqueux de *Justicia spicigera* dans un liant végétal (gomme arabique ou colle d'amidon de maïs) et par application sur du papier Whatman recouvert ou non d'une couche préparatoire de gypse. L'apparence des peintures les plus concentrées se sont révélées proches, en couleur et en termes de pouvoir couvrant, de celles des couches brunes de la partie II du *Codex Borbonicus* dans lesquelles a été identifié le colorant extrait de *Justicia spicigera*. L'émission de fluorescence centrée autour de 630 nm et la signature spectrale Raman caractéristiques ont été détectées quel que soit le mode de préparation ou l'état de vieillissement des couches picturales, dans la limite des conditions testées. La sensibilité à la lumière des peintures produites, évaluée par micro-décolorimétrie, est également comparable à celles du manuscrit.

Les signatures spectrales du colorant de *Justicia spicigera* dans les différents états testés dans ce chapitre sont résumées dans le Tableau 3.2.

Tableau 3.2 – Bilan des caractéristiques spectrales du colorant dans les différents états testés.
w = faible (*weak*, br = large (*broad*), sh = épaulement (*shoulder*), NA = non applicable

Origine	État	Absorption max. (nm)	Émission max.(nm)	Bandes Raman (cm⁻¹)
<i>Codex Borbonicus</i>	Peintures	350-630	630	577, 850 w, 1173 br, 1338, 1422, 1495, 1638
Extrait frais	Solution	555, 588	620	NA
	Dépôt sur papier	565 sh, 599	632	578, 726, 824, 1174, 1336, 1420, 1496, 1640
Extrait 48 h	Solution	565	NA	NA
	Dépôt sur papier	596	626	457, 546, 578, 726, 1174, 1203, 1420, 1446, 1496, 1640
Colorant en poudre	Solution aqueuse	555 sh, 585	NA	546, 578, 726, 824, 1174, 1203, 1336, 1420, 1446, 1496, 1640
	Peintures	400-600 (variable)	625	550, 576, 726, 1154, 1332, 1420, 1508, 1641

Chapitre 4

Purification des molécules colorées

Comme mentionné dans le Chapitre 3, deux composés sont principalement responsable de la coloration de l'extrait de *Justicia spicigera*. Les techniques de caractérisation couplées à la HPLC n'ayant pas permis leur identification, leur purification a été envisagée afin de réaliser leur élucidation structurale par spectroscopies RMN et vibrationnelles ainsi que par spectrométrie de masse à haute-résolution en infusion directe.

Ce chapitre décrit l'optimisation d'une méthode de purification de ces composés colorés d'intérêt par chromatographie liquide préparative.

Dans un premier temps, la méthode de séparation a été développée et optimisée à l'échelle analytique. Les performances de plusieurs phases stationnaires et phases mobiles (modificateur organique et conditions de pH) ont été examinées pour une séparation monodimensionnelle. Afin d'augmenter la pureté des futures fractions collectées, la mise en place d'une séparation bidimensionnelle a ensuite été envisagée. Le choix des dimensions de séparation s'est appuyé sur une évaluation couplée de l'orthogonalité et de la résolution des deux dimensions. Après avoir défini les phases stationnaires et phase mobile de chaque dimension, les gradients d'élution ont été optimisés.

La méthode bidimensionnelle ainsi développée a été transférée vers le système préparatif. La mise en œuvre de cette méthode a permis d'isoler avec succès les composés colorés X1 et X2.

N.B. Le développement et l'optimisation de la méthode de purification par chromatographie préparative détaillés dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication méthodologique dans *Journal of Separation Science* [Arberet *et al.*, 2023].

Sommaire

1	Principe et stratégie de développement	145
2	Développement et optimisation en chromatographie analytique	146
2.1	Mise en place des systèmes séparatifs	147
2.1.1	Sélection de phases stationnaires	147
2.1.2	Sélection de phases mobiles	148
2.1.3	Les systèmes de séparation associés	149
2.2	Séparation monodimensionnelle	150
2.2.1	Comparaison des phases stationnaires dans les différents systèmes d'élution	150
2.2.2	Évaluation de la résolution des systèmes 1D	151
2.3	Séparation bidimensionnelle hors-ligne	154
2.3.1	Évaluation de l'orthogonalité des systèmes 2D	155
2.3.2	Évaluation de la résolution des systèmes 2D	165
2.3.3	Évaluation couplée orthogonalité - résolution	166
2.3.4	Choix de l'ordre des dimensions	167
2.3.5	Optimisation des gradients	168
2.4	Paramètres retenus à l'échelle analytique	173
2.5	Vérification des performances de la méthode développée	173
3	Transfert vers la chromatographie préparative	175
3.1	Théorie du transfert en mode gradient	175
3.1.1	Géométrie de colonne	176
3.1.2	Détermination du volume d'injection	177
3.1.3	Débit de la phase mobile	177
3.1.4	Profil du gradient	178
3.1.5	Influence du volume de délai (<i>dwell volume</i>)	179
3.2	Paramètres retenus à l'échelle préparative	180
3.3	Purification des composés colorés d'intérêt	180
3.4	Contrôle de la pureté des composés isolés	183
4	Bilan du chapitre	184

1 Principe et stratégie de développement

Le développement d'une méthode de purification en chromatographie préparative comporte plusieurs étapes : définir les objectifs de la séparation, développer la séparation à l'échelle analytique et transférer la méthode à l'échelle préparative pour collecter les fractions désirées. Des étapes ultérieures que sont la vérification de la pureté des fractions collectées en les injectant dans le système analytique, éventuellement la combinaison de fractions entre elles et des traitements finaux (évaporation de solvant, cristallisation...) ont ensuite lieu. La finalité est l'obtention des produits purs en quantité maximale [McDonald et Bidlingmeyer, 1987].

La première étape est la définition des objectifs de la séparation. À cette étape, afin de définir des objectifs appropriés, il convient tout d'abord de s'interroger sur la nature de l'échantillon : est-ce que la composition est connue ou inconnue ? quelle est la complexité de l'échantillon en termes de nombre de composés présents ? est-ce que les différents constituants de l'échantillon ont des propriétés proches ? quelle est la concentration des composés cibles dans l'échantillon ? etc. Les considérations pratiques sont également à prendre en compte : quelle quantité est-il nécessaire de purifier ? quelle est la valeur de l'échantillon à purifier ? à quelle fréquence la méthode de purification aura l'occasion d'être mise en œuvre ? y a-t-il des risques au niveau de la sécurité à travailler avec l'échantillon ou la méthode de séparation ? Après avoir répondu à ces diverses questions, nous devons être en mesure d'établir une feuille de route fixant le degré de pureté et la quantité des composés désirés ainsi que le temps et le coût dédiés à la réalisation de la purificationⁱ.

Le développement de la séparation est d'abord réalisé à l'échelle analytique. Le système de séparation est choisi de manière à avoir la plus grande résolution entre les pics. D'après l'équation de Purnell décrite dans le Chapitre 2 (Équation 2.7), la résolution dépend de la sélectivité (α), de la rétention (k) et de l'efficacité du système (N). Le choix de la nature de phase stationnaire et de la phase mobile doit donc permettre de maximiser ces paramètres. Il faut également s'assurer de la solubilité de l'échantillon dans l'éluant choisi. Enfin, des contraintes économiques liées à la disponibilité et au coût des phases stationnaires et des solvants, ainsi que la sécurité (inflammabilité, toxicité des solvants) ne sont pas à négliger, d'autant plus quand un transfert vers l'échelle préparative est prévu.

Le changement d'échelle de l'analytique à la préparative est ensuite effectué pour la production des composés isolés. Certaines règles sont à respecter afin de garantir un

i. Dans notre cas, le Chapitre 3 nous a permis de répondre à ces différentes questions.

bon transfert. Idéalement, il ne doit pas y avoir de différence entre la nature de la phase stationnaire (silice et greffages) des colonnes analytiques et préparatives utilisées (à l'exception éventuelle de la taille des particulesⁱⁱ). Il est donc primordial de choisir, dès le début, des phases stationnaires disponibles en colonnes préparatives. De plus, la géométrie de la colonne a également son importance. Il est plus facile de réaliser une mise à l'échelle en ne changeant que le diamètre de la colonne, plutôt que la longueur. Le débit de phase mobile est sélectionné en fonction de la nouvelle géométrie. Dans le cas de séparation en mode gradient d'élution, pour tenir compte des différences de débit et de volume de délai du systèmeⁱⁱⁱ, la pente du gradient, le temps de gradient et le palier isocratique en début de gradient doivent également être adaptés.

Les fractions sont ensuite collectées pendant la séparation préparative à proprement dit. Cela nécessite souvent plusieurs répétitions de la séparation afin d'atteindre la quantité de produits isolés désirée. Différentes fractions peuvent être rassemblées ensemble selon les besoins. La phase mobile résiduelle est ensuite évaporée (évaporation sous vide, lyophilisation ...) afin d'obtenir les produits purifiés. La pureté des composés cibles est vérifiée en les injectant dans le système analytique après les avoir resolubilisés dans un solvant adapté.

2 Développement et optimisation en chromatographie analytique

Cette partie a pour but de décrire les différents choix qui ont été faits à l'échelle analytique pour arriver à la méthode finale avant sa transposition vers le système préparatif. Le choix des phases stationnaires et des phases mobiles ainsi que l'optimisation des gradients d'élution y sont décrits. Nous détaillons également les raisons qui nous ont conduit à développer une méthode bidimensionnelle.

ii. La taille des particules est souvent supérieure pour les phases de colonnes préparatives.

iii. *Dwell volume*, volume représentant le décalage entre le point où les éluants sont combinés au niveau de la pompe et la tête de colonne. Il est dépendant du chromatographe utilisé.

2.1 Mise en place des systèmes séparatifs

Tout d'abord, dans cette première partie, les paramètres de la méthode à optimiser ainsi que les options parmi lesquelles nous avons fait notre choix sont présentés.

2.1.1 Sélection de phases stationnaires

Un premier paramètre à optimiser est la phase stationnaire sur laquelle la séparation est réalisée.

Les phases stationnaires considérées pour la mise au point de la méthode de séparation ont été choisies de façon à permettre un transfert direct vers la chromatographie préparative. Le choix des phases testées a ainsi été dicté par leur disponibilité en colonne pour la chromatographie préparative.

Cinq phases stationnaires C18^{iv} (Tableau 4.1) ont été sélectionnées pour les différences dans leurs caractéristiques pouvant influencer la qualité de séparation [Boch *et al.*, 2019]. Compte tenu du fait que toutes les phases choisies comportent le même type de greffage (C18), le mécanisme global de rétention devrait être similaire et seules de petites différences de rétention et de sélectivité sont attendues.

Nous sommes conscient·es qu'il aurait été intéressant de pouvoir intégrer à notre comparaison d'autres types de greffons (aromatiques, fluorés, etc.) qui auraient peut-être pu apporter d'autres sélectivités.

Toutes les colonnes que nous avons testées possèdent la même géométrie (125 x 2,1 mm) et une phase stationnaire de même taille de particules (5 µm). Les autres caractéristiques (taille de pores, surface spécifique, taux de carbone, etc.) sont présentées dans le Tableau 4.1.

Tableau 4.1 – Spécifications des cinq phases stationnaires.
Abr. = abréviation.

Nom	Abr.	Taille de pore (Å)	Surface spécifique (m ² /g)	Taux de carbone (%)	End-capping	Gamme de pH
puriFlash® C18-AQ	AQ	100	300	14	Mixed	2,0-7,5
Uptisphere® C18-NEC	NEC	120	320	16	Non	1,5-6,5
Uptisphere® Strategy™ C18-RP	RP	100	425	16	Mixed	1,5-8,0
puriFlash® C18-XS	XS	100	300	17	Multi-step	1,0-10,0
Uptisphere® Strategy™ C18-HQ	HQ	100	425	19	Multi-step	1,0-10,0

iv. Les phases stationnaires C18 sont les phases les couramment utilisées en RPLC, et particulièrement pour l'analyse des colorants hydrosolubles (Chapitre 2, partie 1.1.3).

2.1.2 Sélection de phases mobiles

Le choix du système d'élution (modificateur organique et conditions de pH) est également examiné.

Des systèmes binaires hydro-organiques, particulièrement adaptés à l'analyse des composés hydrosolubles ont été considérés comme phase mobile. Les modificateurs organiques les plus couramment employés en chromatographie liquide à polarité de phases inversée ont été choisis : le méthanol et l'acétonitrile. Comme mentionné précédemment (Chapitre 2, partie 1.1.3), ils présentent tous deux une faible longueur d'onde de coupure UV, une faible viscosité et une force d'élution comparable [Snyder *et al.*, 1997]. De plus, des sélectivités complémentaires sont attendues en raison des interactions spécifiques avec les analytes : des liaisons hydrogènes dans le méthanol, particulièrement adapté pour les composés hydroxylés ou carboxylés et des interactions dipôles-dipôles dans l'acétonitrile dans le cas de liaisons polarisables.

Comme mentionné précédemment dans le Chapitre 3 (partie 2.3), les composés d'intérêt colorés X1 et X2 présentent un caractère ionisable : ce sont *a priori* des acides. Leur rétention dépendant donc du pH de la phase mobile, nous avons pris ce paramètre en compte pour obtenir des différences de sélectivité entre les systèmes testés. L'équilibre apparent des deux formes du colorant se trouvant aux alentours d'un pH de 6 (Figure 3.2 dans le Chapitre 3), des phases mobiles avec des phases aqueuses à pH 3^v et pH 8^{vi} ont été choisies^{vii}.

Les quatre systèmes d'élution testés sont donc les suivants : des mélanges acétonitrile/eau et des mélanges méthanol/eau dans des conditions de pH 3 (avec HCOOH 0,1 %) ou de pH 8 (avec HCOONH₄ 5 mM).

Afin de simplifier les manipulations lors de cette phase d'optimisation de la méthode, nous avons fait le choix de ne pas ajouter l'additif (HCOOH ou HCOONH₄) dans la phase organique mais uniquement dans la phase aqueuse. En effet, peu de différences ont été obtenues par rapport aux séparations réalisées avec l'additif présent dans les deux composantes de la phase mobile, aqueuse et organique (Annexe 3, Figure E.3). De cette façon, les quatre voies du mélangeur de la pompe étaient reliées aux bouteilles suivantes : pur méthanol, pur acétonitrile, solution aqueuse d'acide formique (à 0,1 %) et solution aqueuse de formiate d'ammonium (5 mM). Il était ainsi possible d'obtenir di-

v. pH 3 associé à l'utilisation de l'acide formique à 0,1 % comme phase aqueuse, dans des conditions classiques pour l'analyse des colorants [Nowik, 2013, Pauk *et al.*, 2014].

vi. Pour garantir l'ionisation totale des espèces, valeur du pH d'équilibre + 2 [Dolan, 2017].

vii. Valeurs de pH de la phase aqueuse de la phase mobile, avant son mélange avec la phase organique lors de la programmation en gradient d'élution.

rectement les quatre systèmes d'élution à l'étude sans manipulations supplémentaires de préparation de phase mobile ou de changement de bouteilles d'éluant.

Par ailleurs, dans la suite du texte, pour alléger l'écriture, les systèmes MeCN/H₂O HCOOH 0,1 % pH 3 et MeCN/H₂O HCOONH₄ 5 mM sont raccourcis en MeCN pH 3 et MeCN pH 8, respectivement. Il en est de même pour les systèmes dans le méthanol, MeOH pH 3 et MeOH pH 8.

2.1.3 Les systèmes de séparation associés

Compte tenu des gammes de stabilité de pH pour chacune des phases stationnaires (indiquées dans le Tableau 4.1) et de la séparation insatisfaisante obtenue avec la phase XS dans MeCN pH 8^{viii}, quinze systèmes de séparations^{ix} possibles, combinant les phases mobiles et stationnaires sélectionnées, ont été testés et sont indiqués dans le Tableau 4.2.

Tableau 4.2 – Les quinze combinaisons phase stationnaire - phase mobile compatibles.

	AQ	NEC	RP	XS	HQ
MeOH pH 3	✓	✓	✓	✓	✓
MeOH pH 8			✓	✓	✓
MeCN pH 3	✓	✓	✓	✓	✓
MeCN pH 8			✓		✓

L'extrait aqueux de *J. spicigera* a été analysé en duplicat (préparation de deux échantillons indépendants) dans les systèmes de séparation ainsi définis. Pour l'ensemble des analyses visant à comparer ces systèmes de séparation (parties 2.2 et 2.3), des gradients d'élution génériques (*scouting gradients*) ont été utilisés^x : de 5 à 50 % de MeCN en 30 min ou de 5 à 80 % de MeOH en 30 min, avec un débit de phase mobile de 0,15 mL/min. L'optimisation des gradients fait l'objet d'une partie ultérieure (partie 2.3.5), une fois que phase stationnaire et phase mobile ont été choisies.

Les performances des quinze systèmes vis-à-vis de la séparation des composés colorés, X1 et X2, de l'extrait de *Justicia spicigera* sont comparées dans la partie suivante.

viii. Sans pour autant que nous arrivions à y trouver une explication.

ix. Nous entendons par système de séparation l'association d'une phase stationnaire et d'un système d'élution.

x. Identiques à ceux déjà utilisés dans le Chapitre 3 et définis grâce grâce aux tests préliminaires décrit dans l'Annexe E.

2.2 Séparation monodimensionnelle

Les paramètres à optimiser étant à présent fixés, cette partie s'attache à la comparaison des performances obtenues pour les quinze systèmes de séparation à notre disposition.

2.2.1 Comparaison des phases stationnaires dans les différents systèmes d'élu-tion

L'extrait aqueux de *J. spicigera* a été injecté dans les quinze systèmes de séparation et les chromatogrammes obtenus ont été comparés.

Pour une même phase mobile, peu de différences entre les phases stationnaires ont été observées. Ceci était attendu au vu de la grande similarité de la chimie de toutes les phases stationnaires testées. Nous remarquons notamment des gammes de rétention très proches et un ordre d'élu-tion des composés repérés identique. Toutefois, la sélectivité change légèrement pour certains composés.

À titre d'exemple, les chromatogrammes obtenus pour l'ensemble des phases stationnaires dans le système d'élu-tion MeOH pH 3 sont présentés dans la Figure 4.1. Les mêmes observations (gammes de rétention similaires et même ordre d'élu-tion) sont faites pour la série de phases stationnaires testées dans les trois autres systèmes d'élu-tion : MeOH pH 8, MeCN pH 3 et MeCN pH 8 (Annexe K, Figures K.2, K.1 et K.3).

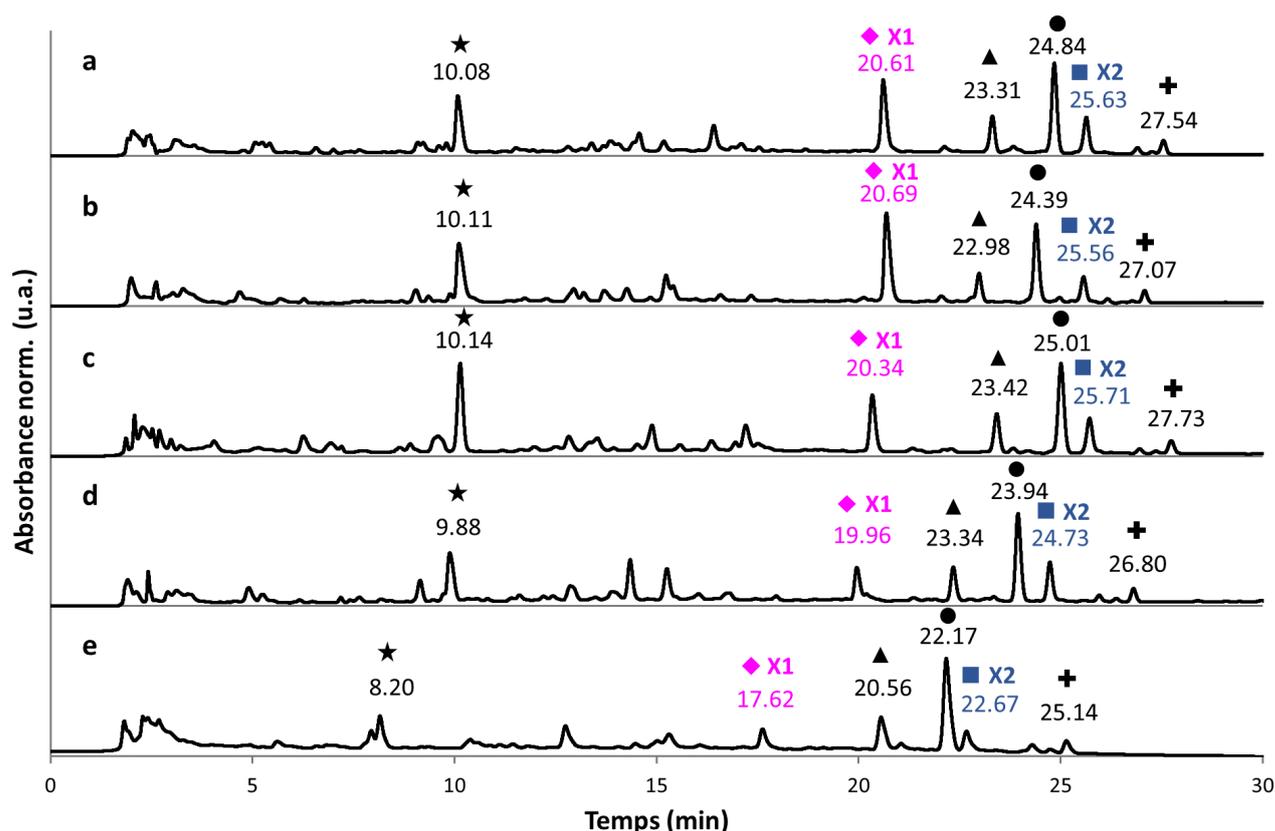


Figure 4.1 – Chromatogrammes de l'extrait aqueux de *J. spicigera* pour les cinq phases stationnaires à l'étude.

Phase stationnaire : (a) puriFlash® C18-AQ (b) Uptisphere® C18-NEC (c) Uptisphere® Strategy™ C18-RP (d) puriFlash® C18-XS et (e) Uptisphere® Strategy™ C18-HQ.

Phase mobile : HCOOH 0,1 % pH 3 / MeOH. Gradient : 5-80 % MeOH de 0 à 30 min.

Détection : DAD 200-750 nm total scan.

Composés identifiés : ★ : A1; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; ■ : X2; + : F3.

(Attributions correspondant au Tableau 3.1 du Chapitre 3)

2.2.2 Évaluation de la résolution des systèmes 1D

Afin de comparer quantitativement les quinze systèmes de séparation, nous nous sommes intéressés aux performances des dits systèmes en termes de résolution. Contrairement à une approche classique en chromatographie analytique où l'on chercherait à bien séparer la totalité des composés présents dans l'échantillon afin de les identifier et/ou de les quantifier, dans notre cas, la séparation se concentre uniquement sur deux composés cibles, dans l'objectif de leur purification. Ainsi, nous nous sommes particulièrement intéressés à la résolution entre chaque composé d'intérêt, X1 et X2, et ses impuretés avoisinantes respectives, éluant juste avant et juste après (exemple en Figure 4.2). Ces résolutions doivent être suffisamment grandes afin permettre la collecte en chromatographie préparative sans compromettre la pureté des fractions récupérées.

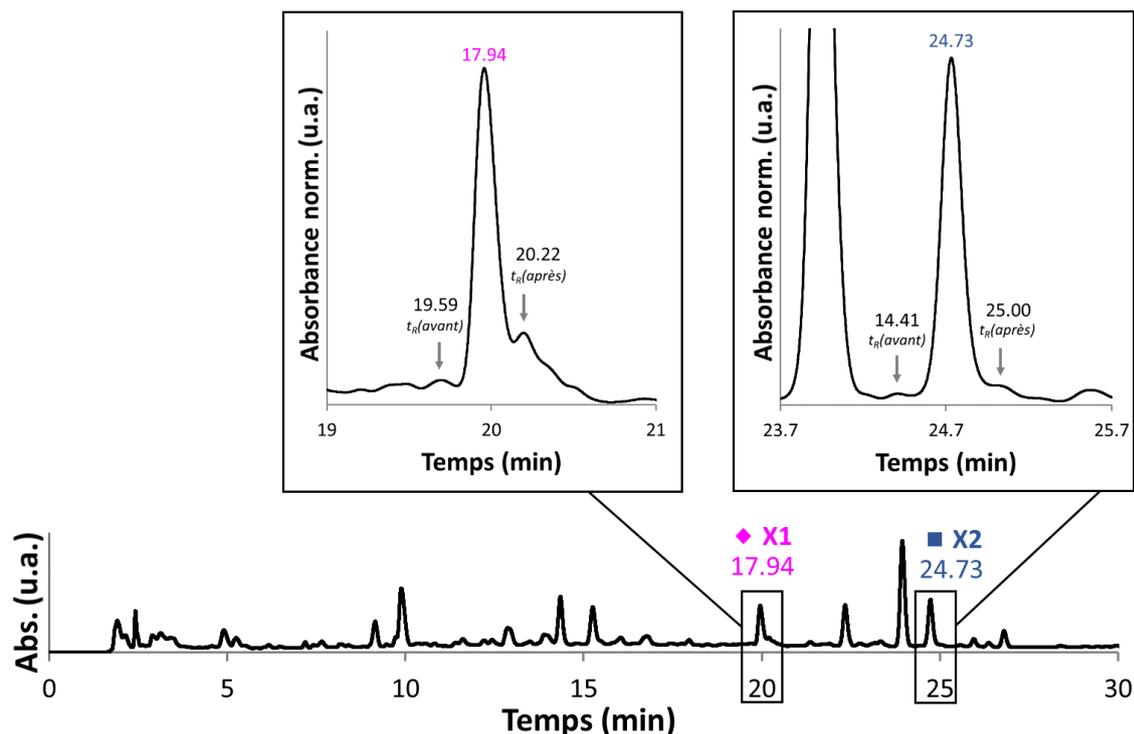


Figure 4.2 – Exemple d'identification des composés éluant juste avant et juste après les composés d'intérêt.

Chromatogrammes de l'extrait aqueux de *J. spicigera*. Phase stationnaire : puriFlash® C18-XS.
Phase mobile : HCOOH 0.1 % pH 3 / MeOH. Gradient : 5-80 % MeOH de 0 à 30 min.
Détection : DAD 200-750 nm total scan.

À partir de l'équation générique de calcul de résolution (Équation (2.3) dans le Chapitre 2), les résolutions $R_{avant}(X_i)$ et $R_{après}(X_i)$ ont été calculées selon :

$$R_{avant}(X_i) = 0,59 \cdot \frac{t_R(X_i) - t_R(avant)}{\delta_{moy.}} \quad (4.1)$$

et

$$R_{après}(X_i) = 0,59 \cdot \frac{t_R(après) - t_R(X_i)}{\delta_{moy.}} \quad (4.2)$$

avec

$t_R(X_i)$, le temps de rétention du composé d'intérêt (X1 ou X2),

$t_R(avant)$ ou $t_R(après)$, le temps de rétention du composé éluant juste avant ou juste après le composé d'intérêt

et $\delta_{moy.}$, la moyenne des largeurs à mi-hauteur des pics majoritaires du chromatogramme.

N.B. La moyenne des largeurs à mi-hauteur des pics majoritaires du chromatogramme, $\delta_{moy.}$ a été utilisée dans le calcul plutôt que la moyenne des largeurs à mi-hauteur du composé d'intérêt X_i et de ses impuretés, avant ou après, car dans la plupart

des cas, les hauteurs des pics étaient très faibles et estimer leur largeur s'avérait impossible. Sachant qu'en mode gradient, si les composés ne présentent pas d'interactions secondaires avec les phases mobile et stationnaire, la largeur des pics est identique dans tout le chromatogramme [Dolan, 2013a, Dolan, 2013b], considérer la moyenne des largeurs des pics majoritaires s'est avéré être un bon estimateur de la largeur individuelle de chaque pic.

Ainsi, pour chaque système de séparation, quatre valeurs de résolution ont été obtenues : $R_{avant}(X_1)$, $R_{après}(X_1)$, $R_{avant}(X_2)$ et $R_{après}(X_2)$.

Nous avons ensuite appliqué un principe courant en optimisation de méthodes, résumé en « le meilleur du moins bon ». Il consiste à identifier les meilleures solutions comme celles qui permettent de maximiser le paramètre critique de la méthode. Dans notre cas, pour chaque système, la moins bonne des quatre valeurs de résolution calculées va limiter les performances de séparation du dit système. Elle a donc été identifiée comme valeur de résolution limitante et a été notée R_{lim} . Chaque système monodimensionnel testé s'est donc retrouvé caractérisé par sa moins bonne résolution. Plus cette valeur critique sera grande, meilleur sera le système.

Les valeurs des résolutions limitantes R_{lim} obtenues pour chaque système sont présentées dans la Figure 4.3.

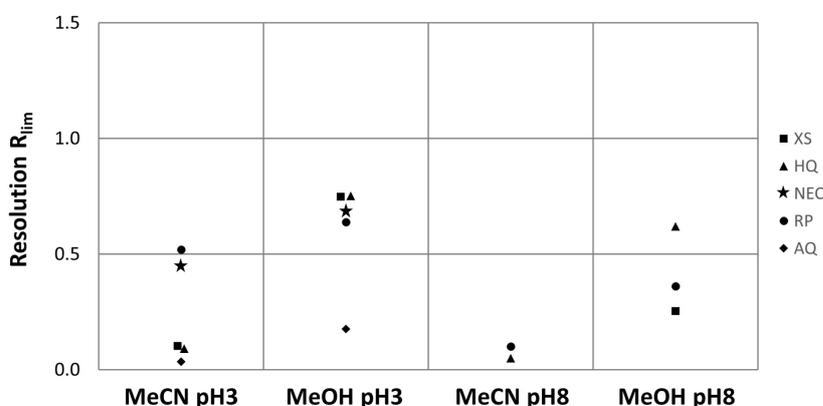


Figure 4.3 – Résolutions R_{lim} obtenues pour les différentes phases stationnaires dans chaque système d'élution.

Nous pouvons remarquer que les systèmes permettant d'obtenir les meilleures R_{lim} sont ceux dans le MeOH pH 3. Cependant, quel que soit le système d'élution, aucune phase stationnaire ne permet d'atteindre une résolution optimale de 1,5^{xi}.

Par conséquent, en mode monodimensionnel, aucune combinaison phase stationnaire - phase mobile testée dans cette étude ne permet d'obtenir une séparation satisfaisante entre les composés d'intérêt et leurs impuretés avoisinantes. Dans l'optique

xi. Résolution minimale permettant un retour à la ligne de base entre deux pics.

de la purification des composés cibles, X1 et X2, en chromatographie préparative, ceci est très problématique. Afin de ne pas compromettre la pureté des fractions collectées, une séparation bidimensionnelle a donc été envisagée.

La partie suivante détaille ainsi le raisonnement conduit pour choisir les deux dimensions de séparation.

2.3 Séparation bidimensionnelle hors-ligne

À l'échelle préparative, les modes « coupe à cœur » (*heart cutting*) simple ou multiple sont les plus répandus : seules les fractions contenant les composés à purifier sont collectées dans la ¹D puis injectées dans la ²D pour augmenter leur pureté. Ces modes d'échantillonnage sont tout à fait adaptés à des approches de séparation hors-ligne, plus simples à mettre en place et moins onéreuses que celles en ligne.

Comme décrit dans le chapitre 2 (partie 1.1.4), une séparation bidimensionnelle peut résider en un changement de phase stationnaire, un changement de phase mobile ou les deux. Les trois possibilités ont été considérées pour trouver l'option permettant d'obtenir le meilleur potentiel de purification des composés d'intérêt.

Les quinze systèmes de séparation monodimensionnels à disposition ont été associés par deux pour former 105^{xii} systèmes bidimensionnels prédictifs. Les cas avec le même système de séparation dans les deux dimensions ont été exclus^{xiii}, car ils ne produisent aucun changement de sélectivité. L'ordre des dimensions n'a pas d'importance, les performances entre deux dimensions ont été évaluées en absolu^{xiv}. La détermination de l'ordre des dimensions est traitée dans une partie ultérieure lorsque notre choix d'un système bidimensionnel sera défini (partie 2.3.4).

Notre choix du système bidimensionnel optimal s'est basé sur une approche couplée orthogonalité/résolution dans le but de garantir la séparation entre les composés d'intérêt et leurs impuretés avoisinantes.

xii. Combinaison de 2 parmi 15 = $\binom{15}{2} = 105$.

xiii. Par exemple : XS dans MeOH pH 3 dans une dimension associée à XS dans MeOH pH 3 dans une seconde dimension.

xiv. Par exemple : HQ MeOH pH 3 – HQ MeOH pH 8 équivaut à HQ MeOH pH 8 – HQ MeOH pH 3.

2.3.1 Évaluation de l'orthogonalité des systèmes 2D

En premier lieu, nous avons cherché à mettre en évidence les combinaisons de dimensions de séparation permettant de maximiser l'orthogonalité.

Descripteurs d'orthogonalité La notion d'orthogonalité se rapporte à la répartition des pics dans l'espace de séparation bidimensionnel. La surface occupée dépend grandement de la différence de sélectivité entre les deux dimensions : plus la sélectivité est différente, plus la probabilité que les composés se répartissent dans un grand espace de séparation est élevée. En théorie, l'orthogonalité est définie comme l'absence de corrélation statistique entre les données de rétention de chaque dimension [Wu *et al.*, 2012]. Dans les faits, il a été montré qu'il est impossible de trouver deux systèmes strictement orthogonaux [Guiochon *et al.*, 2008] et on parle ainsi plutôt de degré d'orthogonalité.

Il existe plusieurs méthodes pour évaluer le degré d'orthogonalité d'un système bidimensionnel. Les plus courantes sont les suivantes^{xv} :

- Des méthodes dites mathématiques s'appuyant sur des grandeurs statistiques :
 - Les régressions linéaires des données de rétention, où le degré d'orthogonalité peut être exprimé par le coefficient de corrélation, r^2 . Plus la valeur de r^2 est faible, meilleure est l'orthogonalité [Gilar *et al.*, 2005b].
 - La méthode topologique des distances entre voisins les plus proches (*Nearest Neighbour Distance* ou NND), dans laquelle sont calculées les moyennes arithmétique et harmonique des distances entre les points voisins les plus proches dans l'espace de séparation bidimensionnel. Ces moyennes mesurent respectivement la répartition et le degré de regroupements locaux des pics dans l'espace. [Nowik *et al.*, 2013a, Nowik *et al.*, 2013b].
 - Des méthodes chimiométriques, permettant de sélectionner le système le plus orthogonal parmi un large panel de systèmes possibles [Van Gysegheem *et al.*, 2003, Van Gysegheem *et al.*, 2004, Van Gysegheem *et al.*, 2005]. L'utilisation de ces méthodes nécessitent une expertise certaine en chimiométrie.
- Des méthodes géométriques consistant à évaluer l'espace occupé par des pics dans les diagrammes de rétention bidimensionnels :
 - La méthode de la similarité informationnelle^{xvi}, qui s'appuie sur la détermination de la quantité de similarité de l'information contenue dans les deux dimensions [Slonecker *et al.*, 1996].

xv. D'autres exemples sont cités dans [Bos *et al.*, 2020].

xvi. Adaptée de la théorie de l'information (ou entropie de Shannon).

- La méthode de l'angle de répartition des pics, pour laquelle un vecteur est associé à chaque jeu de données de rétention et utilisé pour calculer des matrices de corrélation correspondant aux combinaisons bidimensionnelles. Ces matrices permettent d'accéder à un angle de répartition des pics et l'orthogonalité est évaluée par l'étendue de la surface définie par cet angle [Liu *et al.*, 1995].
- La méthode des « bin box » et ses adaptations, qui sépare l'espace de séparation bidimensionnel en plusieurs cases de largeur fixe et relie l'orthogonalité aux nombres de cases contenant les pics [Gilar *et al.*, 2005a, Schure, 2011].
- La méthode de l'enveloppe convexe (*convex hull*), où l'orthogonalité est évaluée par le rapport de l'espace de séparation utilisé, mesuré par l'enveloppe convexe^{xvii} et de l'espace total de séparation. Cette enveloppe est déterminée par la méthode de triangulation de Delaunay^{xviii} [Semard *et al.*, 2010].

Chaque outil présente des avantages et des inconvénients. Il est ainsi important de choisir une méthode cohérente avec les objectifs de la séparation développée. Comme préconisé par [Marlot *et al.*, 2018], dans le contexte de purification de molécules cibles en chromatographie préparative, il est nécessaire de privilégier une méthode d'évaluation de l'orthogonalité permettant de mettre en évidence la répartition homogène des composés dans le plus grand espace de séparation possible.

Si les méthodes de régression sont faciles à mettre en œuvre, leur pertinence est contestable, car une faible corrélation n'est pas nécessairement synonyme de bonne occupation de l'espace de séparation. Il est ainsi nécessaire de coupler l'obtention de la valeur r^2 avec la visualisation des données de corrélation. Quant aux méthodes géométriques, elles permettent d'avoir accès à l'occupation de l'espace de séparation mais elles rencontrent aussi des limitations. L'évaluation de l'orthogonalité par la méthode des « bin box » par exemple est grandement dépendante du choix de la largeur des cases fixée par leur l'utilisateur. Dans l'approche de l'enveloppe convexe, il n'est pas exclu que des zones de l'espace de séparation non utilisées se retrouvent incluses dans la mesure ou, à l'inverse, que des agrégats de points soient rencontrés au sein de l'enveloppe délimitée. Par ailleurs, les méthodes géométriques nécessitent un grand nombre de composés représentatifs et leur exécution peut ne pas être simple.

Nous avons ainsi fait le choix d'adopter la méthode des distances entre les voisins les plus proches qui permet d'avoir accès à l'étendue et à l'homogénéité de la répartition des points dans l'espace de séparation par le calcul de descripteurs simples. Par

xvii. Plus petit ensemble convexe contenant tous les points.

xviii. En géométrie algorithmique, correspondant à l'unique triangulation telle qu'un cercle passant par les trois points d'un triangle ne contienne aucun autre point.

ailleurs, on retrouve l'utilisation de cette méthode pour plusieurs applications de purification par chromatographie préparative bidimensionnelle [Marlot *et al.*, 2018, Sun *et al.*, 2022].

Démarche À partir des données de rétention obtenues dans les quinze systèmes monodimensionnels, les séparations bidimensionnelles ont été simulées et leur degré d'orthogonalité évalué. Pour ce faire, six composés identiques^{xix} ont été identifiés dans les quinze systèmes de séparation. Leur temps de rétention a été relevé dans chacun des systèmes. Les jeux de données de rétention ont été associés deux par deux pour former 105 diagrammes de rétention bidimensionnels. Dans un premier temps, les distances entre les coordonnées des plus proches voisins (d_i) ont été calculées dans ces diagrammes de rétention. Pour chaque point, d_i est définie comme la distance la plus courte le connectant aux autres points^{xx}. Un exemple de diagramme bidimensionnel incluant les d_i est présenté en Figure 4.4.

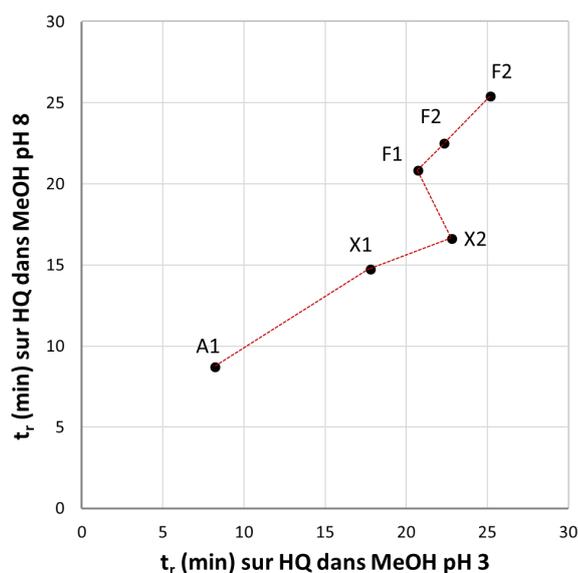


Figure 4.4 – Exemple de diagramme de rétention bidimensionnel.
Les lignes rouges correspondent aux distances des plus proches voisins, d_i .

xix. Parmi les sept précédemment repérés dans le Chapitre 3, Tableau 3.1.

xx. Ne pas confondre les plus proches voisins impliqués dans l'approche NND (Figure 4.4) avec les impuretés avoisinantes définies dans la partie 2.2.2 (Figure 4.2).

Afin de caractériser la répartition des points dans l'espace de séparation bidimensionnel, les moyennes arithmétique (A) et harmonique (H) correspondantes ont été ensuite calculées selon :

$$A = \frac{\sum_{i=1}^n d_i}{n-1} = \frac{\sum_{i=1}^5 d_i}{5} \quad (4.3)$$

et

$$H = \frac{n-1}{\sum_{i=1}^n \frac{1}{d_i}} = \frac{n-1}{\sum_{i=1}^5 \frac{1}{d_i}} \quad (4.4)$$

avec n le nombre de pics considérés dans le calcul, dans notre cas, égal à six.

Les paramètres A et H permettent de décrire, respectivement, l'étendue et l'homogénéité de la dispersion des pics dans l'espace bidimensionnel. Ainsi, plus la valeur A est grande, meilleure est l'occupation de l'espace bidimensionnel et la répartition des points. Par exemple, dans le cas de jeux de données avec une forte corrélation statistique et avec une répartition des points le long d'une droite, A sera très faible. Quant à H, plus sa valeur est élevée, moins il est probable que l'on rencontre des agglomérats de points dans une même zone de l'espace. Or, la notion d'orthogonalité pouvant être ramenée à la « distribution la plus étendue et la plus uniforme de tous les composés dans l'espace de séparation » [Nowik *et al.*, 2013a], on cherche précisément à maximiser les deux paramètres A et H.

Résultats Avant de rentrer dans une comparaison quantitative à l'aide des paramètres A et H, nous pouvons avoir un premier aperçu du degré d'orthogonalité globalement atteint dans les systèmes bidimensionnels disponibles en visualisant l'ensemble des diagrammes de rétention bidimensionnels obtenus. Quatre exemples représentatifs de l'ensemble des systèmes sont présentés dans la Figure 4.5).

Comme nous pouvons le voir, l'orthogonalité est assez limitée : dans tous les cas de figure, les composés se répartissent autour d'une droite diagonale dans l'espace bidimensionnel. Ceci est évidemment dû aux limitations qui nous sont imposées tel que le fait de coupler deux dimensions RPLC et particulièrement avec uniquement des phases stationnaires C18. Toutefois, il est déjà possible d'identifier parmi les différentes options certaines plus prometteuses que d'autres. Alors que certaines combinaisons entraînent une grande corrélation statistique des jeux de données de rétention (exemple en haut à droite dans la Figure 4.5), d'autres permettent une meilleure répartition des points dans l'espace de séparation (les 3 autres diagrammes dans la Figure 4.5). Ces différentes configurations ont été ainsi classifiées en termes d'orthogonalité en utilisant les descripteurs A et H.

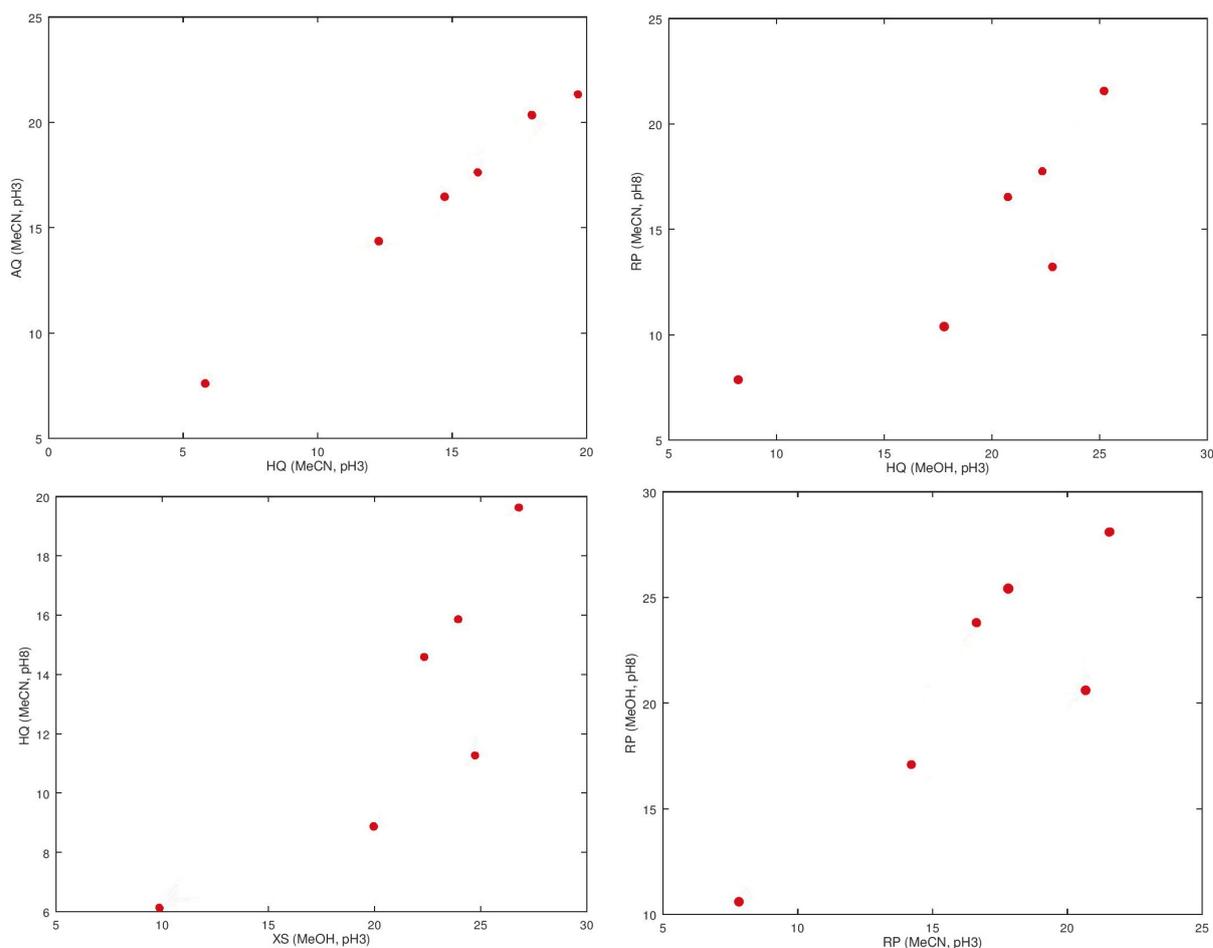


Figure 4.5 – Exemples de diagrammes de rétention bidimensionnels obtenus parmi les 105 combinaisons.

Afin de comparer les 105 combinaisons en prenant en compte les deux valeurs, moyennes arithmétique A et harmonique H, l'une est tracée en fonction de l'autre dans les Figures 4.6 à 4.9. Ces quatre figures représentent le même jeu de données, seuls le nombre de points affichés et la légende changent, nous permettant d'illustrer le cheminement de notre raisonnement, étape par étape. Ainsi, à une étape donnée, les options écartées aux étapes précédentes n'y figurent plus et la légende est adaptée afin d'ajouter de la spécificité aux options restantes.

Pour commencer, l'ensemble des 105 combinaisons est représenté dans la Figure 4.6. On y distingue les combinaisons avec une phase mobile identique et une phase mobile distincte dans les deux dimensions (points noirs), les combinaisons avec une phase mobile distincte et une phase stationnaire identique dans les deux dimensions (points gris foncé) et enfin, les combinaisons avec une phase mobile et une phase stationnaire distinctes dans les deux dimensions (points gris clair).

Les combinaisons faisant intervenir la même phase mobile dans les deux dimensions et une phase stationnaire distincte (points noirs dans Figure 4.6) présentent, en moyenne, des performances faibles en termes d'orthogonalité, car elles possèdent des faibles valeurs de A et/ou H. Un changement de phase mobile entre les deux dimensions, soit avec la même phase stationnaire (points gris foncé), soit avec une phase stationnaire différente (points gris clair) semble présenter le meilleur degré d'orthogonalité dans la plupart des cas. Les combinaisons s'appuyant uniquement sur un changement de phase stationnaire avec une même phase mobile ont donc été écartées pour les comparaisons suivantes. Il nous reste ainsi 81 combinaisons possibles.

Les combinaisons restantes, avec une phase mobile distincte dans les deux dimensions, soit avec la même phase stationnaire, soit avec une phase stationnaire distincte sont comparées dans la Figure 4.7. Chaque couleur correspond à une combinaison de phases mobiles (sans importance d'ordre); les ronds vides correspondent à des combinaisons pour lesquelles la même phase stationnaire est utilisée dans les deux dimensions et les ronds pleins correspondent à des combinaisons avec une phase stationnaire distincte dans chaque dimension.

On peut observer que des clusters de chaque couleur se dégagent : les performances d'orthogonalité sont ainsi fortement liées à la combinaison de phases mobiles impliquée dans la séparation. De plus, pour une même combinaison de phases mobiles (c'est-à-dire une même couleur sur la Figure 4.7), peu de différences sont observées dans le cas d'une même phase stationnaire dans les deux dimensions (ronds vides) ou dans le cas de deux phases stationnaires différentes (ronds pleins). En prenant en compte cette dernière remarque, ajoutée à l'aspect financier d'achat d'une seconde colonne préparative, une séparation bidimensionnelle avec la même phase stationnaire dans les deux dimensions a été envisagée. L'orthogonalité sera ainsi apportée par un **changement de phase mobile entre les deux dimensions**. À ce stade, il ne reste que 17 combinaisons possibles.

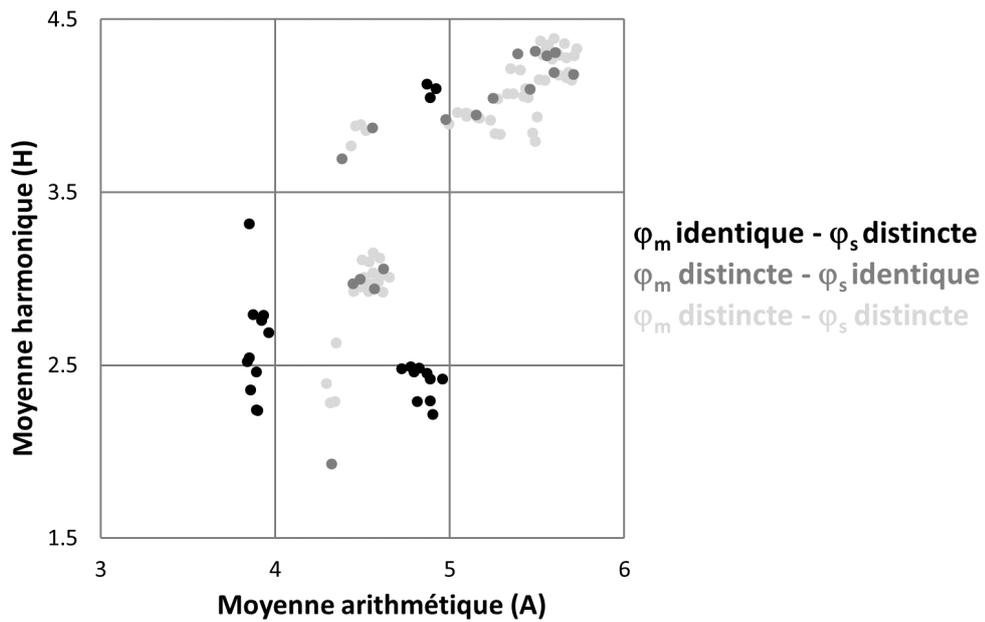


Figure 4.6 - Moyenne harmonique des d_i en fonction de leur moyenne arithmétique pour les 105 combinaisons bidimensionnelles (φ_m pour phase mobile et φ_s pour phase stationnaire).

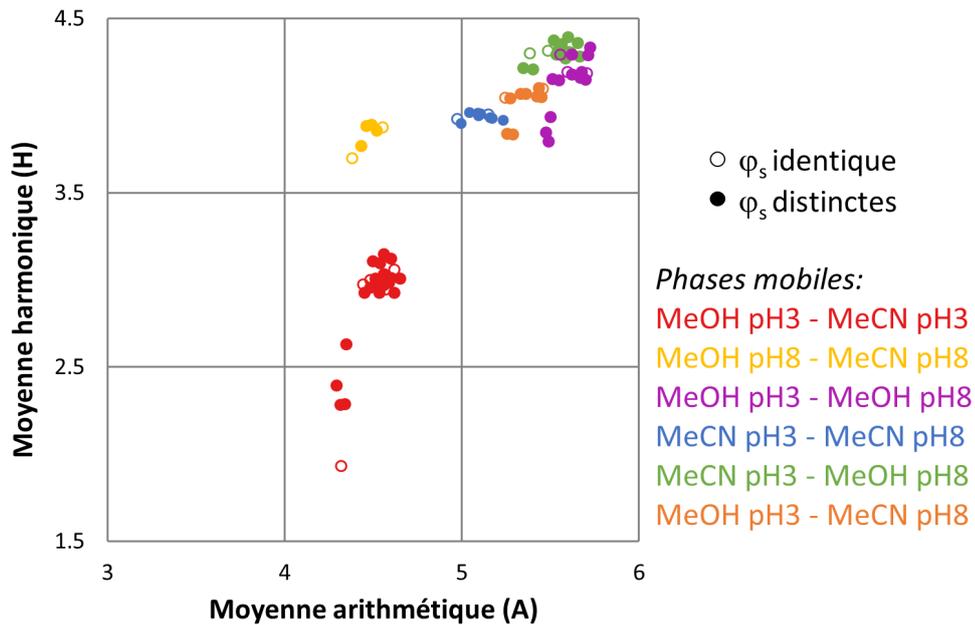


Figure 4.7 - Moyenne harmonique des d_i en fonction de leur moyenne arithmétique pour les 81 combinaisons impliquant un changement de phase mobile entre les deux dimensions (φ_m pour phase mobile et φ_s pour phase stationnaire).

Les combinaisons restantes, impliquant une même phase stationnaire et un changement de phase mobile sont représentées dans la Figure 4.8. Un symbole est associé à chaque phase stationnaire et chaque couleur correspond à une combinaison de phases mobiles (sans importance d'ordre).

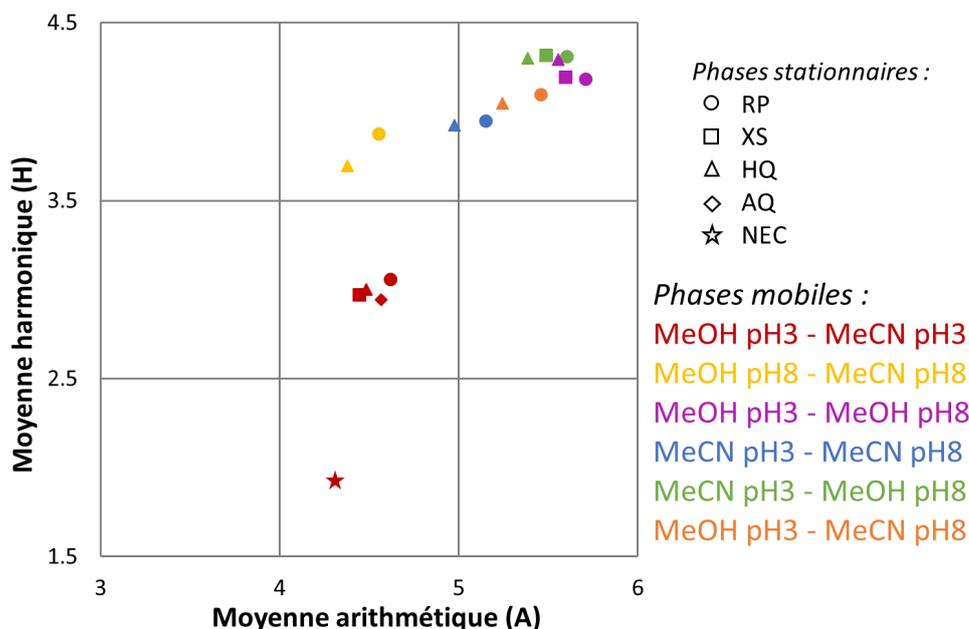


Figure 4.8 – Moyenne harmonique d_i en fonction de leur moyenne arithmétique pour les 17 combinaisons impliquant la même phase stationnaire dans les deux dimensions.

On peut noter que les combinaisons faisant intervenir des phases mobiles dont le pH est le même (MeOH pH 3 - MeCN pH 3, points rouges ou MeOH pH 8 - MeCN pH 8, points jaunes sur la Figure 4.8) conduisent aux moins bons résultats. Cela nous incite à baser notre séparation bidimensionnelle sur un **changement de conditions de pH de phase mobile entre les deux dimensions**. Par conséquent, les phases stationnaires non compatibles aux deux valeurs de pH (la NEC et la AQ) ont été exclues. Il reste ainsi 10 combinaisons possibles.

Les options restantes correspondent à trois phases stationnaires (RP, XS et HQ) dans quatre combinaisons bidimensionnelles impliquant des changements de pH entre les deux dimensions : MeOH pH 3 - MeOH pH 8, MeCN pH 3 - MeCN pH 8, MeCN pH 3 - MeOH pH 8 et MeOH pH 3 - MeCN pH 8. Elles sont comparées dans la Figure 4.9.

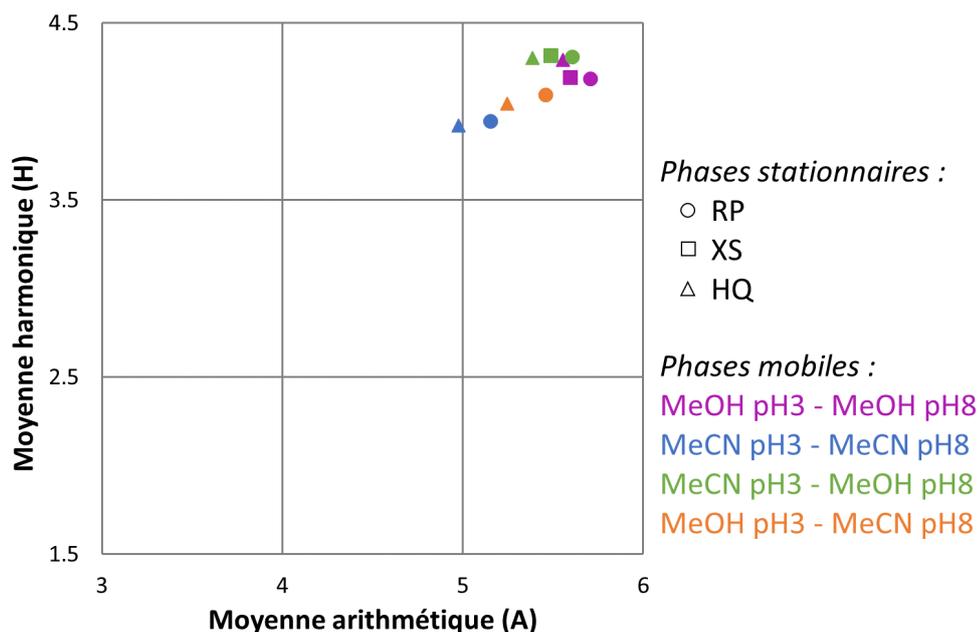


Figure 4.9 – Moyenne harmonique en fonction de moyenne arithmétique pour les 10 combinaisons impliquant la même phase stationnaire et un changement du pH de la phase mobile entre les deux dimensions.

La comparaison des valeurs de A et H met en évidence des résultats très proches en termes d'orthogonalité pour ces 10 combinaisons restantes.

Afin de ne pas se contenter d'une estimation visuelle mais d'apprécier quantitativement les différences entre chacune d'elle, un paramètre d'orthogonalité O correspondant à la distance euclidienne entre l'origine et chaque point de coordonnées (A, H) a été introduit. Il a été calculé selon $O = \sqrt{A^2 + H^2}$ avec A, la moyenne arithmétique et H, la moyenne harmonique. Plus cette valeur est grande, meilleure est l'orthogonalité puisque les deux paramètres A et H sont maximisés.

Les valeurs obtenues sont représentées dans la figure 4.10.

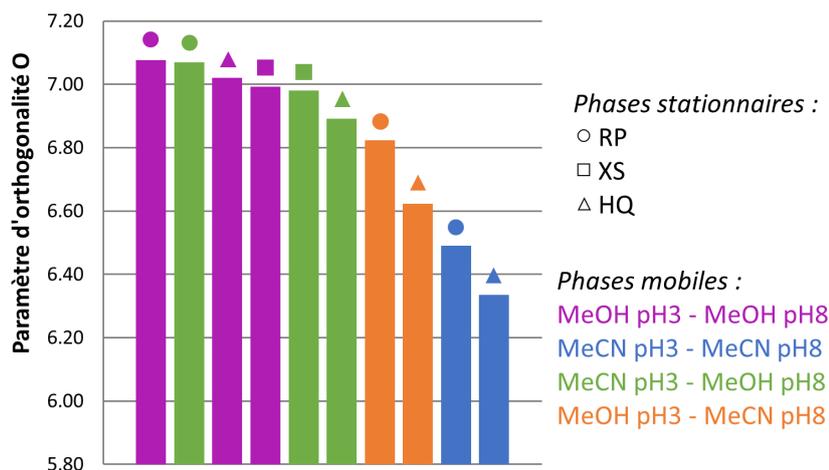


Figure 4.10 – Paramètre d'orthogonalité, O, pour les 10 combinaisons impliquant la même phase stationnaire et un changement du pH de la phase mobile entre les deux dimensions.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les systèmes MeOH pH 3 - MeOH pH 8 (violets) et MeCN pH 3 - MeOH pH 8 (verts), avec des valeurs comprises entre 6,89 et 7,08. À ce stade, il nous a semblé que la comparaison de l'orthogonalité seule ne nous permettait pas de faire ressortir facilement un meilleur système parmi les six les plus performants.

En effet, dans l'approche adoptée pour évaluer l'orthogonalité, nous avons simulé les systèmes bidimensionnels grâce à la rétention des six composés majoritaires de l'extrait. De ce fait, les impuretés avoisinant les pics d'intérêt n'ont pas été directement prises en compte dans l'évaluation^{xxi}. Il faut pourtant s'assurer de sélectionner un système bidimensionnel qui permette la séparation des composés d'intérêt et de leurs impuretés en vue de leur purification. Cependant, comme vu en Figure 4.5, même pour les meilleurs systèmes obtenus dans notre évaluation, le degré d'orthogonalité reste assez limité. Nous avons donc un risque non négligeable de nous trouver dans des cas où la différence de sélectivité entre les deux dimensions ne serait pas suffisante pour séparer dans la 2D une impureté voisine résiduelle collectée avec la fraction du composé d'intérêt dans la 1D^{xxii} (Figure 4.11, cas de figure 3). Ainsi, dans ce cas là, il apparaît essentiel de favoriser un système bidimensionnel maximisant également la résolution.

xxi. En raison des difficultés à identifier leurs temps de rétentions dans les différents systèmes de séparation testés.

xxii. C'est à dire qu'une des impuretés avoisinantes de la 1D soit aussi l'impureté avoisinante de la 2D.

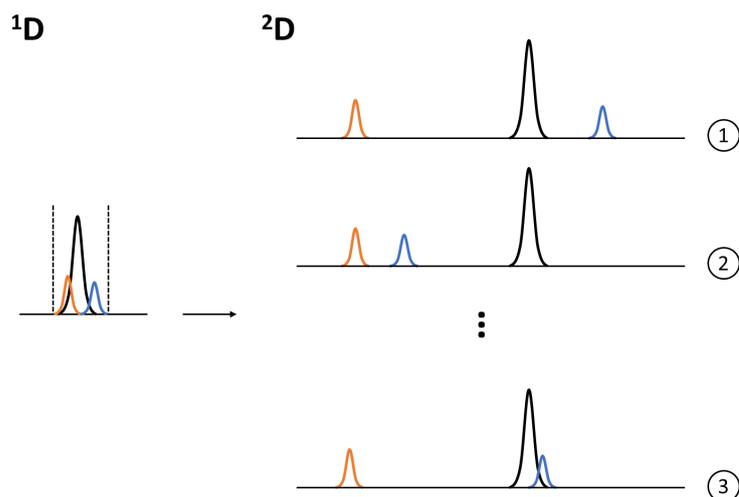


Figure 4.11 – Exemples de cas de figures que l'on peut rencontrer dans la réinjection dans la ^{2D} des fractions collectées dans la ^{1D}.

- (1) et (2) Cas de figures favorables avec une orthogonalité des deux dimensions telle que la différence de sélectivité permet de séparer les impuretés du composé d'intérêt dans la ^{1D}.**
(3) Cas défavorable.

L'évaluation de la résolution des systèmes bidimensionnels fait l'objet de la partie qui suit.

2.3.2 Évaluation de la résolution des systèmes 2D

Pour pallier à une différence de sélectivité insuffisante entre les deux dimensions, nous avons cherché un système bidimensionnel qui maximise la résolution dans chaque dimension. En effet, s'il paraît évident que maximiser la résolution de la ^{2D} permet de s'affranchir d'impuretés résiduelles collectées dans la ^{1D} avec la fraction des composés d'intérêt, garantir une résolution maximale dans la ^{1D} permet tout simplement de diminuer la probabilité de collecter des impuretés dès la ^{1D}.

Pour identifier les systèmes maximisant les résolutions des deux dimensions, à chaque combinaison bidimensionnelle est associé un couple de résolutions ($R_{lim}^{Dimension_1}$, $R_{lim}^{Dimension_2}$)^{xxiii} dont les valeurs R_{lim} ont été calculées précédemment pour chaque dimension dans la partie 2.2.2. Dans chaque couple, on peut identifier une dimension limitante pour laquelle la résolution est la plus faible et définir la résolution limitante bidimensionnelle R_{lim}^{2D} comme le minimum de ($R_{lim}^{Dimension_1}$, $R_{lim}^{Dimension_2}$). À nouveau, le principe « le meilleur du moins bon » s'applique : cette résolution limitante bidimensionnelle doit être la plus grande possible pour que le système soit considéré comme la meilleure option pour notre méthode de purification.

xxiii. Les dimensions sont volontairement notées « Dimension₁ » et « Dimension₂ » plutôt que « 1^{ère} dimension » et « 2^{ème} dimension » car la notion d'ordre n'intervient toujours pas, à ce stade.

Les résolutions limitantes bidimensionnelles des dix systèmes les plus prometteurs ^{xxiv} sont représentées en Figure 4.12.

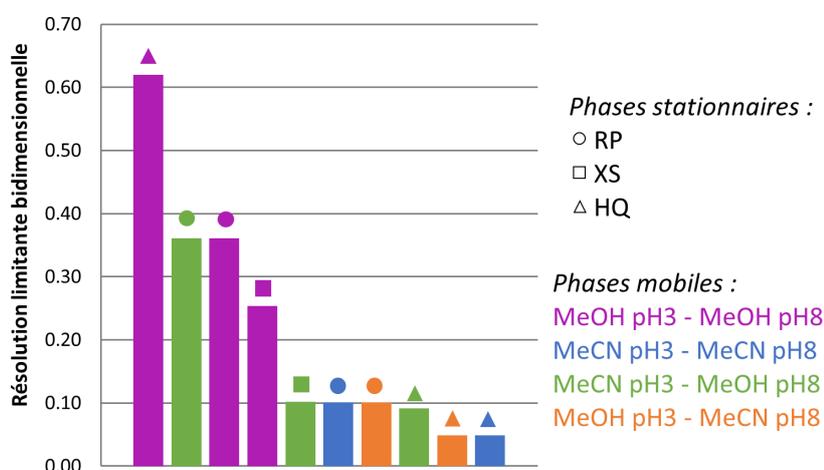


Figure 4.12 – Résolutions limitantes bidimensionnelles R_{lim}^{2D} pour les 10 combinaisons impliquant la même phase stationnaire et un changement du pH de la phase mobile entre les deux dimensions.

Il apparaît clairement que la phase HQ dans MeOH pH 3 - MeOH pH 8 (triangle violet) s'avère la meilleure option en termes de résolution.

Pour arrêter notre choix final du système bidimensionnel le plus adapté pour la purification des composés colorés ciblés, il nous reste à présent à combiner les deux approches, évaluation de l'orthogonalité et de la résolution. Ceci est traité dans la partie suivante.

2.3.3 Évaluation couplée orthogonalité - résolution

Les paramètres d'orthogonalité et les résolutions limitantes bidimensionnelles calculés précédemment (respectivement dans les parties 2.3.1 et 2.3.2) ont été normalisés et tracés l'un en fonction de l'autre dans la Figure 4.13.

Deux groupes de points se dégagent : le premier, composé de systèmes avec une grande orthogonalité et une résolution limitante variable ; le second, composé de systèmes d'orthogonalité variable et de mauvaise résolution limitante. Nous nous sommes évidemment concentrés sur le premier et avons identifié le système maximisant les deux paramètres.

xxiv. D'après l'évaluation de leur orthogonalité dans la partie 2.3.1.

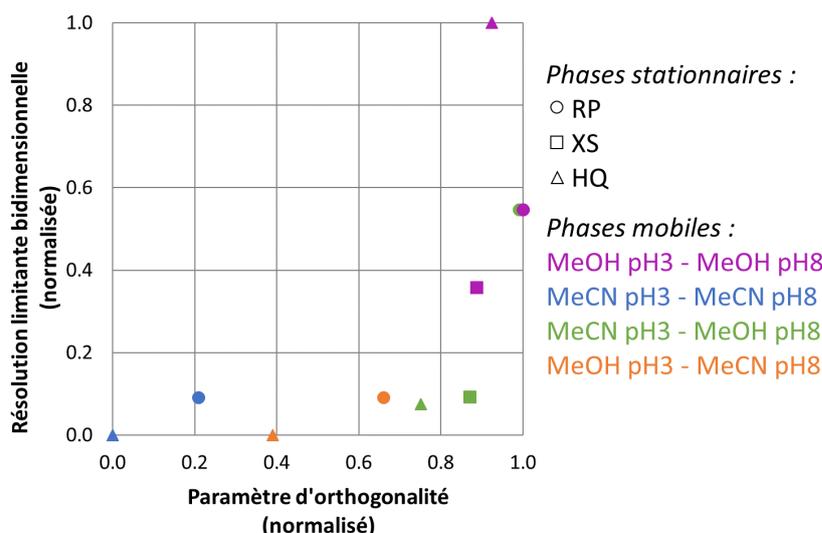


Figure 4.13 – Résolution limitante bidimensionnelle R_{lim}^{2D} en fonction du paramètre d'orthogonalité O , pour les 10 combinaisons impliquant la même phase stationnaire et un changement du pH de la phase mobile entre les deux dimensions.

La phase Uptisphere® Strategy™ C18-HQ dans le système MeOH pH 3 - MeOH pH 8 (triangle violet) s'est révélée comme l'option permettant d'obtenir les meilleures performances combinées d'orthogonalité et de résolution. L'association de cette phase stationnaire et de ce système d'élution bidimensionnel a donc été sélectionnée pour notre méthode finale.

Dans l'évaluation menée jusqu'à présent, l'ordre des dimensions de séparation dans les systèmes bidimensionnels n'a pas été considéré. Nous traitons ainsi ce point dans la partie suivante.

2.3.4 Choix de l'ordre des dimensions

Les systèmes d'élution MeOH pH 3 et MeOH pH 8 ont été choisis comme phases mobiles des deux dimensions de séparation. Mais jusqu'ici, l'ordre des dimensions n'avait pas été considéré. Notre choix s'est appuyé sur la facilité d'évaporation des additifs présents dans les phases mobiles des deux dimensions de séparation. L'acide formique, présent dans MeOH pH 3 étant plus volatile que le formiate d'ammonium dans MeOH pH 8, il est donc plus facile de l'évaporer sous vide. Ainsi, en choisissant MeOH pH 8 comme première dimension, nous comptons sur le fait que le formiate d'ammonium soit éliminé dans la seconde dimension de séparation, car non retenu. L'acide formique résiduel de la seconde dimension est, quant à lui, facilement éliminé des fractions collectées lors du séchage sous vide de ces dernières.

Pour récapituler, notre méthode de purification bidimensionnelle consiste en une séparation sur une même phase stationnaire, Uptisphere® Strategy™ C18-HQ dont l'orthogonalité de la séparation est basée sur un changement de pH de phase mobile entre les deux dimensions. La première dimension se fait dans le système d'élution MeOH pH 8 et la seconde dans MeOH pH 3.

La partie suivante est dédiée à l'optimisation des gradients d'élution de chacune des dimensions de séparation.

2.3.5 Optimisation des gradients

Dans le but de réduire le temps d'analyse et la consommation de solvants, une étape d'optimisation des gradients a été nécessaire. Les optimisations pour les deux dimensions de séparation, dans MeOH pH 8 pour la première et MeOH pH 3 pour la seconde, ont été faites à l'échelle analytique.

Démarche et principe Afin d'économiser l'échantillon, le solvant de phase mobile et le temps de manipulation, nous avons pris le parti pour la première dimension de collecter les composés X1 et X2 au cours d'une même séparation chromatographique. Ils sont ensuite injectés séparément dans la seconde dimension. Le gradient optimisé dans la première dimension doit donc permettre la collecte simultanée de X1 et X2. Par contre, pour la seconde dimension, si l'intérêt se présente, il est possible de choisir deux gradients distincts, un pour la collecte de X1 et l'autre, la collecte de X2.

En partant du gradient générique linéaire de 5 à 80 % de MeOH en 30 min, deux types de gradients ont été développés dans le but de réduire le temps total de gradient. D'une part, de nouveaux gradients linéaires avec des paramètres différents du gradient générique et d'autre part, des gradients ciblés (*focused gradients*). Leurs paramètres respectifs sont décrits en détail ci-dessous et leurs performances sont comparées dans la partie [2.3.5](#).

Gradients linéaires Tout d'abord, le gradient générique linéaire a simplement été raccourci au vu des temps de rétention obtenus. En effet, le dernier composé est élué au bout de 25 min, ce qui correspond à un pourcentage effectif en MeOH d'environ 55 %. Il n'était donc pas nécessaire de continuer le gradient jusque 80 % de MeOH. Un gradient de 5 à 55 % de MeOH en 20 min - pour conserver la pente de 2,5 %/min - est ainsi strictement équivalent au gradient générique décrit précédemment. Il permet toutefois de gagner 10 min par séparation.

Afin de réduire encore le temps total de la séparation, trois nouveaux gradients linéaires ont été créés à partir du gradient générique avec des proportions initiales de MeOH croissantes : respectivement 15, 25 et 35 %, afin de débiter avec une force éluante de plus en plus importante. La pente de 2,5 %/min et le pourcentage final en MeOH de 55 % sont conservés. Le temps de gradient est adapté dans chacun des cas.

Gradients ciblés (*focused gradients*) Les gradients ciblés ont été introduits spécifiquement pour les besoins de la chromatographie préparative [Penduff, 2013, Jablonski *et al.*, 2009]. Contrairement à la chromatographie analytique qui s'attache notamment à détecter un maximum de composés avec la meilleure résolution possible pour l'ensemble des pics, la chromatographie préparative s'emploie à collecter un ou des composés cibles avec la plus grande pureté. La résolution entre ledit pic d'intérêt et ses voisins doit donc être maximisée. La résolution entre tous les autres composés non collectés peut quant à elle être diminuée. Cela permet de ne pas trop augmenter le temps d'analyse. Ce principe est appliqué dans les gradients ciblés en diminuant la pente du gradient dans la zone d'élution du composé d'intérêt et en l'augmentant dans toute autre zone.

La première étape dans la conception d'un gradient ciblé est d'identifier le point d'élution du composé dans le gradient générique (c'est-à-dire le pourcentage effectif de solvant auquel le composé est élué). Pour ce faire, le volume de décalage^{xxv} du système est utilisé (déterminé dans notre cas dans le Chapitre 2, partie 2.3.3). Ensuite, la pente du gradient générique est remplacée par une pente plus faible centrée autour du point d'élution. Cette modification permet d'accélérer l'élution des composés moins retenus que le composé d'intérêt et de retarder celle des plus retenus.

Les gradients ciblés sont particulièrement adaptés pour la collecte d'un unique composé par séparation. En effet, dans le cas de plusieurs composés à collecter, il faudrait intégrer plusieurs segments avec des pentes faibles, ce qui rend leur application moins aisée. Pour rappel, dans notre approche, nous avons fait le choix de collecter, dans la

xxv. *Offset volume*, volume représentant le décalage entre le point où les éluants sont combinés au niveau de la pompe et le point où sont détectés les composés éluant à cette dite proportion. Il est dépendant de la colonne et du chromatographe utilisés.

première dimension, X1 et X2 dans une même séparation, afin d'économiser échantillon, phase mobile (en particulier le solvant organique) et temps de manipulation. La pertinence des gradients ciblés n'a donc été évaluée que pour la seconde dimension, dans le système MeOH pH 8.

Les points d'élution de X1 et X2 ont été identifiés respectivement autour de 40 et 50 % dans les conditions du gradient générique MeOH pH 8. Deux gradients ciblés de 35 à 45 % et de 45 à 55% avec des pentes de 0,5 %/min ont été développés pour la collecte de X1 et X2, respectivement.

Résultats

Première dimension : 1D Les chromatogrammes obtenus pour les gradients linéaires de 5 à 35 % initial de MeOH sont tracés dans la Figure 4.14.

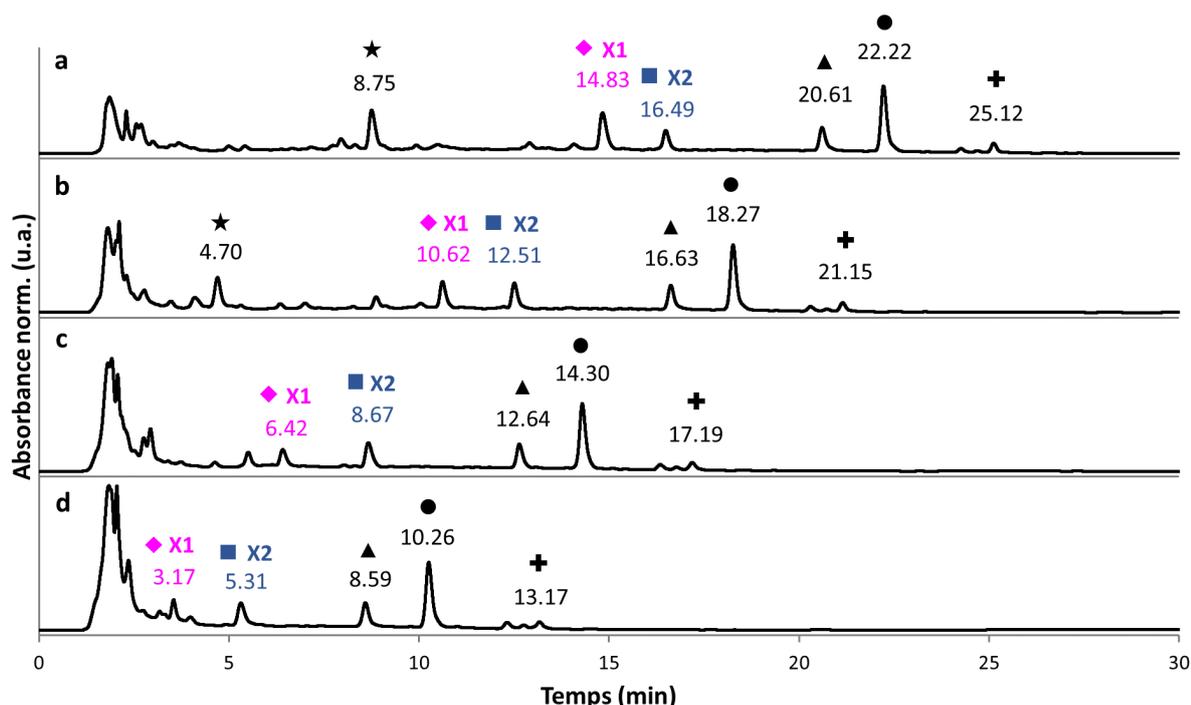


Figure 4.14 - Chromatogrammes de l'extrait aqueux obtenus avec quatre gradients linéaires de : (a) 5 % (b) 15 % (c) 25 % et (d) 35 % initial de MeOH à 55 % MeOH avec une pente de 2.5 %/min, puis un palier de 55 % jusqu'à 30 min. Phase stationnaire : Uptisphere® Strategy™ C18-HQ. Phase mobile : HCOONH₄ 5 mM pH 8 / MeOH. Détection : DAD 200-750 nm total scan. Composés identifiés : ★ : A1; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; ■ : X2; + : F3. (Attributions correspondant au Tableau 3.1 du Chapitre 3)

Sans optimisation, dans les conditions du gradient générique (Figure 4.14a), il faut attendre approximativement 17 min pour éluer les composés X1 et X2. Le but de l'optimisation est de diminuer ce temps. On peut noter qu'à cette étape, en vue du transfert vers la chromatographie préparative, on ne cherche pas à ce que l'entièreté du chromatogramme soit bien résolue, il est seulement important que la résolution entre les composés d'intérêt, X1 et X2, et leurs impuretés avoisinantes respectives soit au moins conservée.

Le gradient avec une proportion initiale de 25 % en MeOH présente le meilleur compromis entre temps et résolution : il permet l'élution de X1 et X2 en moins de 9 min dans une même séparation, sans compromettre la résolution entre les composés d'intérêt et les impuretés éluant juste avant et juste après (Figure 4.14c), contrairement au gradient avec 35 % initial de MeOH pour lequel le composé X1 se retrouve co-élué dans le groupe des premiers pics mal résolus (Figure 4.14d).

Ainsi, pour la ¹D de la méthode de purification en cours de développement, dans MeOH pH 3, le **gradient linéaire de 25 à 55 % de MeOH en 12 min** a été sélectionné.

Seconde dimension : ²D Suivant une démarche similaire à celle menée dans la partie précédente, quatre gradients linéaires de proportion initiale en MeOH croissante (5, 15, 25 et 35 %) ont été comparés. Le potentiel de gradients ciblés sur X1 et sur X2 a également été évalué. Le but était le même que dans la ¹D : choisir un gradient qui permet de réduire le temps total de séparation en vu du transfert vers la chromatographie préparative.

Lors de la purification à l'échelle préparative, ce sont les fractions individuelles collectées à l'issue de la ¹D qui seront injectées dans la ²D. Ici, dans la phase d'optimisation, pour des raisons pratiques évidentes, nous avons été contraints d'injecter l'extrait total de *J. spicigera*. On notera donc qu'à l'échelle préparative, lors de la phase de purification nettement moins de pics seront présents dans les chromatogrammes : seuls X1 et X2 seront attendus, éventuellement accompagnés de leurs impuretés avoisinantes respectives.

Dans un premier temps, les performances des gradients linéaires ont été comparées (Figure 4.15a et b).

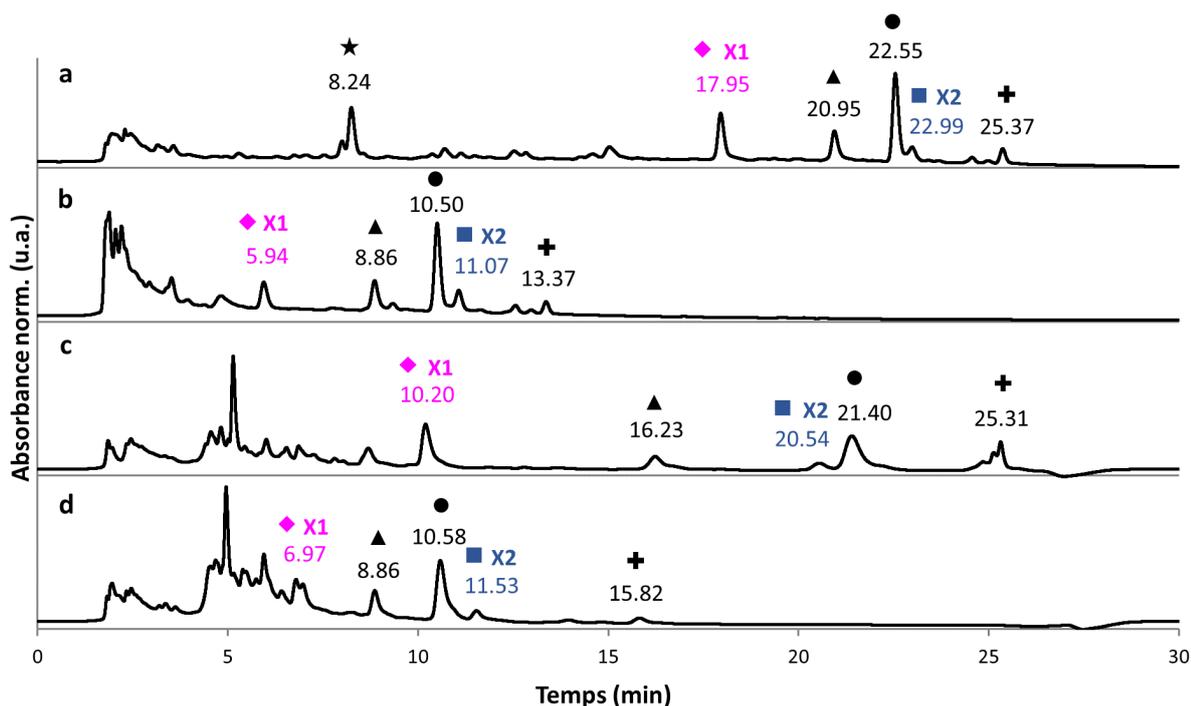


Figure 4.15 – Chromatogrammes de l'extrait aqueux obtenu avec quatre gradients distincts :
 (a) « 5 % initial » : 5-55 % B en 20 min (b) « 35 % initial » : 35-55 % B en 8 min
 (c) Ciblé X1 : 5-33,8 % B de 0 à 0,58 min, 33,8-43,8 % de 0,58 à 20,58 min et 80% de 21,30 à 22,45 min et
 (d) Ciblé X2 : 5-46,1 % B de 0 à 0,82 min, 46,1-56,1 % de 0,82 à 20,82 min, 56,1-80,0 % de 20,82 à 21,30 min et 80 % de 21,30 à 22,45 min.
 Phase stationnaire : Uptisphere® Strategy™ C18-HQ.
 Phase mobile : A - HCOOH 0,1 % pH 3 / B - MeOH. Détection : DAD 200-750 nm total scan.
 Composés identifiés : ★ : A1; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; ■ : X2; + : F3.
 (Attributions correspondant au Tableau 3.1 du Chapitre 3)

Alors que 18 et 23 min étaient nécessaires pour l'élution de X1 et X2 respectivement, dans les conditions du gradient générique (Figure 4.15a), le gradient linéaire avec une proportion initiale de MeOH de 35 % permet une élution de X1 en environ 6 min et de X2 en moins de 12 min, sans perte de résolution entre les composés d'intérêt et leurs impuretés avoisinantes (Figure 4.15b). Les gradients avec des proportions initiales de MeOH de 15 % et 25 % (non montrés) n'ont pas présenté d'intérêt particulier, les temps de rétention de X1 et X2 étant supérieurs dans ces gradients.

Pour les gradients ciblés sur X1 et X2, les chromatogrammes obtenus sont représentés sur la Figure 4.15c et d, respectivement. Leurs performances ont été comparées à la meilleure option des gradients linéaires (c'est-à-dire le gradient avec une proportion initiale de MeOH de 35 %).

Dans le cas de X1, il n'y a pas d'avantage à utiliser le gradient ciblé : l'élution de X1 se fait en environ 10 min contre en 6 min avec le gradient linéaire (4.15b) et ce, sans amélioration particulière de la résolution (4.15c). Dans le cas de X2, la différence entre

les deux gradients est peu prononcée : élution en 11,53 min avec le gradient ciblé contre 11,07 min avec le gradient linéaire et une résolution comparable (Figure 4.15b et d).

Le **gradient linéaire de 35 à 55 % de MeOH en 8 min** s'est ainsi révélé le plus adapté pour la collecte de X1 et de X2 dans la ²D, MeOH pH 3.

2.4 Paramètres retenus à l'échelle analytique

Les paramètres ainsi sélectionnés suite à l'optimisation à l'échelle analytique, avant transfert, sont résumés ci-dessous :

- Séparation hors-ligne bidimensionnelle sur la même phase stationnaire
- Phase stationnaire : Uptisphere® Strategy™ C18-HQ 5 µm (géométrie de la colonne analytique : 125 x 2,1 mm)
- Volume d'injection : 5 µL
- Débit de phase mobile : 0,15 mL/min
- Première dimension :
 - Système d'élution : MeOH/HCOONH₄ 5 mM pH 8
 - Gradient : 25 à 55 % MeOH en 12 min (pente de 2,5 %/min)
- Seconde dimension :
 - Système d'élution : MeOH/HCOOH 0,1 % pH 3
 - Gradient : 35 à 55 % MeOH en 8 min (pente de 2,5 %/min)

2.5 Vérification des performances de la méthode développée

Avant le transfert de la méthode optimisée, nous avons cherché à vérifier que, dans les conditions sélectionnées, la résolution entre chaque composé d'intérêt et ses impuretés voisines de la ¹D avait bien été considérablement augmentée dans la ²D.

Pour ce faire, la détection en spectrométrie de masse a été utilisée afin d'identifier les ions pseudo-moléculaires [M+H]⁺ de chaque pic voisin dans la ¹D. Le composé éluant avant X1 possède un ion [M+H]⁺ de m/z 536 et celui éluant après, un m/z de 490. Pour X2, un ion de m/z 451 est associé au composé éluant avant et un m/z de 358 pour celui après. Leurs temps de rétention dans la ²D ont ensuite été relevés.

Dans la Figure 4.16, les temps de rétention de X1, X2 et de leurs pics voisins dans la ²D ont été tracés en fonction de ceux dans la ¹D.

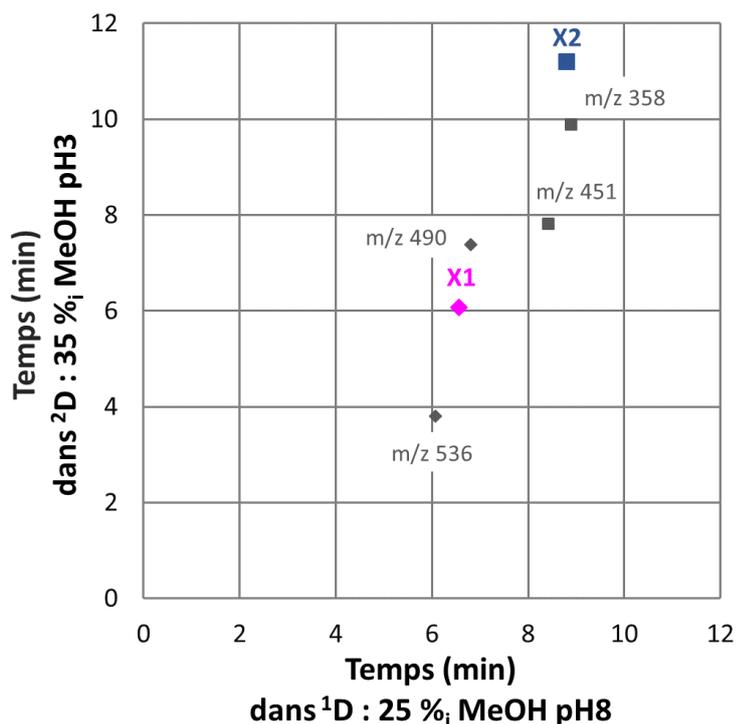


Figure 4.16 - Illustration du gain de résolution entre les composés d'intérêt et leurs impuretés avoisinantes dans la méthode bidimensionnelle mise au point. X1 (◆) et X2 (■), en couleur et leurs impuretés avoisinantes respectives, en gris.

L'amélioration de la séparation dans la ²D est nettement visible. La résolution entre X1 et le composé éluant avant est passée de 1,4 à 6,5 et celle avec le composé éluant après de 0,7 à 3,8. De même, pour X2 et ses pics voisins, une augmentation de résolution de 1,1 à 9,7 a été observée pour le composé éluant avant et de 0,3 à 3,7 avec un changement d'ordre d'éluion pour celui éluant après. Ces résultats mettent en évidence l'intérêt de la méthode bidimensionnelle développée, permettant d'assurer la pureté des fractions collectées à l'échelle préparative.

La méthode est donc transférée vers le système préparatif pour la purification des composés colorés X1 et X2 dans la partie suivante.

3 Transfert vers la chromatographie préparative

Le transfert vers le système de chromatographie préparative a été réalisé selon les règles garantissant la conservation des performances de séparation de la méthode.

3.1 Théorie du transfert en mode gradient

Lors de tout transfert de méthode, on cherche à conserver résolution et sélectivité de la méthode originale malgré le changement de géométrie de colonne et a fortiori le changement d'échelle (analytique vers préparative). Pour ce faire, des règles de transfert ont été établies afin de calculer les paramètres de la nouvelle méthode (volume d'injection, débit, profil du gradient...) [Dolan et Snyder, 1998, Guillardme *et al.*, 2007, Guillardme *et al.*, 2008]. Il faut noter que la théorie de transfert a initialement été développée pour des transferts de méthode lors de changement de colonne (dimensions, taille de particules) sur des systèmes analytiques^{xxvi} et ne prend pas en compte toutes les spécificités de l'échelle préparative (notamment les différences de porosité entre colonnes analytique et préparative).

Dans les parties qui suivent, nous détaillons les calculs des paramètres obtenus par ces règles de transfert ainsi que les libertés que nous avons prises vis-à-vis des valeurs obtenues au regard des besoins de la chromatographie préparative.

N.B. Dans la suite du texte, les indices 1 et 2 se rapportent respectivement aux méthodes originale (dans notre cas, analytique) et transférée (préparative). De plus, dans les calculs qui suivent, nous faisons l'approximation de porosités égales pour les deux colonnes.

xxvi. En particulier pour des transferts vers l'UHPLC, utilisant des phases stationnaires avec des diamètres de particules très réduits.

3.1.1 Géométrie de colonne

Intéressons-nous dans un premier temps au choix de la géométrie de la colonne (diamètre, longueur, et taille des particules) pour la méthode préparative.

Choix du diamètre Tout d'abord, nous avons choisi le diamètre de la colonne. Parmi les possibilités de géométries disponibles pour la phase Uptisphere® Strategy™ C18-HQ, nous avons fait le choix de transférer la méthode vers une colonne préparative de **diamètre interne de 21,2 mm**. Il s'agit du seul diamètre disponible pour des colonnes conventionnelles préparatives et des cartouches flash^{xxvii}. Cela laisse ainsi éventuellement la possibilité de réaliser la purification à plus bas coût en utilisant des cartouches flash.

Choix de la longueur Les longueurs possibles de colonnes préparatives pour un diamètre interne de 21,2 mm sont de 50, 100, 150 et 250 mm. Il est plus facile de réaliser un transfert en ne changeant que le diamètre interne de la colonne [McDonald et Bidlingmeyer, 1987]. Cependant, une longueur identique à la colonne analytique (125 mm) n'est pas disponible, nous choisissons la longueur supérieure s'en rapprochant le plus : **$L = 150$ mm**.

Choix du diamètre de particules Deux colonnes (de même phase stationnaire de remplissage) de même rapport L/d_p (avec L la longueur de la colonne et d_p le diamètre des particules) possèdent des efficacités comparables^{xxviii}. La colonne analytique ayant une longueur de 125 mm et un diamètre de particules de 5 μm , afin de conserver une efficacité comparable à celle de la séparation à l'échelle analytique, un remplissage de phase stationnaire avec des particules de diamètres 5 μm est donc préconisé.

Cependant, lors de premiers tests avec la phase stationnaire de d_p 5 μm , nous avons obtenu des valeurs de pression trop élevées pour travailler dans des conditions convenables sur le système préparatif mis à disposition^{xxix}. Nous avons donc dû nous tourner vers un diamètre de particules supérieur afin de diminuer la pression : un **diamètre d_p de 10 μm** a été choisi. Nous pouvons donc nous attendre à une perte d'efficacité lors du passage à l'échelle préparative avec ce remplissage.

Ainsi, une colonne préparative de 150 x 21,2 mm avec un diamètre de particules de 10 μm a été choisie pour l'échelle préparative.

xxvii. Cartouche en plastique remplie de phase stationnaire, généralement à usage unique.

xxviii. D'après l'équation (2.6) décrite dans le Chapitre 2 reliant la hauteur de plateau réduite et l'efficacité.

xxix. Valeurs de pression obtenues très proches de la pression limite de 50 bars du système.

3.1.2 Détermination du volume d'injection

Le nouveau volume d'injection a ensuite été déterminé. À l'échelle préparative, il est courant de travailler en surcharge afin d'augmenter la productivité, c'est-à-dire purifier la quantité maximale de produit en un minimum d'injections. Il est possible de faire une surcharge en masse (augmenter la concentration pour un volume injecté constant) ou une surcharge en volume (augmenter le volume injecté avec des échantillons de même concentration) [Seidel-Morgenstern, 2020].

Le ratio masse de feuilles/volume d'eau mis en œuvre à l'échelle analytique avait déjà été choisi de façon à maximiser la concentration de l'extrait obtenu, il ne nous sera donc pas possible d'augmenter cette concentration^{xxx}. Nous faisons ainsi le choix de travailler en surcharge de volume et de fixer le **volume d'injection à 5 mL** (100 fois le volume d'injection de l'échelle analytique).

3.1.3 Débit de la phase mobile

Il s'agit ensuite de définir le débit de la phase mobile dans la méthode préparative.

Pour un transfert purement géométrique, la vitesse linéaire réduite, v , doit être constante entre les deux méthodes. La vitesse linéaire réduite, v , est égale à :

$$v = \frac{u \cdot d_p}{D_m} \quad (4.5)$$

avec u la vitesse linéaire de la phase mobile, d_p le diamètre des particules et D_m le coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile. Les D_m étant constants entre les deux méthodes, il faut donc que le produit $u \cdot d_p$ soit constant. Or, vitesse linéaire et débit sont reliés par l'équation :

$$u = \frac{D}{S_{eff}} = \frac{D}{\pi \cdot \frac{d_c^2}{4} \cdot \epsilon} \quad (4.6)$$

avec D le débit de phase mobile, d_c le diamètre interne de la colonne et ϵ la porosité de la phase stationnaire. Ainsi, le nouveau débit est calculé tel que :

$$D_2 = D_1 \cdot \frac{d_{c1}^2}{d_{c2}^2} \cdot \frac{d_{p1}}{d_{p2}} \quad (4.7)$$

xxx. C'est même en réalité l'inverse : pour les fins de la chromatographie préparative, lorsque nous avons cherché à préparer des volumes de solution plus importants (en augmentant proportionnellement masse de feuilles et volume d'eau), en raison du volume occupé par les feuilles nous avons dû augmenter le volume d'eau afin qu'elles soient toutes immergées (comme décrit dans la partie 2.1.1).

avec D le débit de phase mobile, d_c le diamètre interne de la colonne et d_p le diamètre des particules.

Dans notre cas, le débit optimal calculé pour la méthode transférée est de 7,6 mL/min. Dans ces conditions, le temps d'une séparation serait multiplié par 2,6, et ce, sans compter le temps d'équilibration post-gradient à la fin de l'analyse.

Dans la mesure où nous avons été amenés à réaliser de nombreuses répétitions de cette séparation, afin d'augmenter la quantité de produits purifiés collectés en un temps donné, nous avons fait le choix de ne pas travailler au débit proposé par le transfert géométrique, mais de choisir un **débit** supérieur et égal à **15 mL/min** permettant des séparations plus rapides. Ce débit de 15 mL/min est du même ordre de grandeur que ceux rencontrés couramment pour des colonnes préparatives de diamètre 21,2 mm [Schulenberg-Schell et Tei, 2015].

3.1.4 Profil du gradient

Des paramètres dans le profil du gradient, comme la pente et le temps de gradient, doivent aussi être adaptés lors du transfert.

Pente Le produit de la pente du gradient par le temps mort de la colonne, t_0 , doit être constant entre les deux méthodes, ainsi :

$$pente_2 = pente_1 \cdot \frac{t_{0_1}}{t_{0_2}} = pente_1 \cdot \frac{D_2}{D_1} \cdot \frac{V_{0_1}}{V_{0_2}} = pente_1 \cdot \frac{D_2}{D_1} \cdot \frac{d_{c_1}^2}{d_{c_2}^2} \cdot \frac{L_1}{L_2} \quad (4.8)$$

avec D le débit de phase mobile, V_0 le volume mort de la colonne, d_c le diamètre interne de la colonne et L la longueur de la colonne.

Dans la méthode analytique développée, la pente était de 2,5 %/min. Ainsi, la nouvelle pente calculée pour les gradients préparatifs est approximativement de **2%/min**.

Temps de gradient Les compositions initiale et finale en solvant organique (% B) doivent rester constantes, seul le temps de gradient t_{grad} change. Avec la nouvelle pente, le nouveau temps de gradient est calculé selon :

$$t_{grad_2} = \frac{\%B_{final} - \%B_{initial}}{pente_2} \quad (4.9)$$

Pour la **1^D**, la variation de pourcentage de MeOH est de 25 à 55 %, le nouveau **temps de gradient** calculé est ainsi de **14,4 min**. Pour la **2^D**, la variation étant de 35 à 55 %, le nouveau **temps de gradient** est de **9,6 min**.

3.1.5 Influence du volume de délai (*dwell volume*)

Le changement d'échelle s'accompagne d'une modification du volume de délai, V_D , (*dwell volume*), propre à chaque appareil. Il est défini comme le volume entre le point de formation du gradient (c'est-à-dire le point où les éluants sont combinés dans le mélangeur de la pompe pour obtenir une proportion donnée) et la tête de la colonne. Ainsi, le temps de délai (*dwell time*), t_D , représente la durée nécessaire pour que le gradient programmé arrive à l'entrée de la colonne. Durant t_D , les analytes sont susceptibles de migrer dans les conditions isocratiques de la composition initiale du gradient. Comme le volume de délai est différent entre les deux systèmes impliqués dans le transfert, la durée pendant laquelle l'élution isocratique a lieu est différente et par conséquent, les facteurs de rétention, les résolutions et les sélectivités de la méthode transférée peuvent en être modifiés. Pour éviter ces problèmes, il est important que le rapport entre le temps de délai, t_D , et le temps de rétention nul, t_0 , soit maintenu constant lors du transfert de méthode. Si ce n'est pas le cas, il est alors nécessaire d'ajouter, dans la nouvelle méthode, un palier isocratique, t_{palier} avant le début du gradient^{xxxi} [Schellinger et Carr, 2005], tel que

$$\frac{t_{D_1}}{t_{0_1}} = \frac{t_{D_2} + t_{palier}}{t_{0_2}} \quad (4.10)$$

Les volumes de délai des systèmes analytique et préparatif ont été calculés dans le Chapitre 2 (partie 2.3.3). Dans notre cas, sans modification préalable, le rapport t_D/t_0 n'est pas constant lors du passage au système préparatif. Un **temps de palier** t_{palier} **de 2,13 min** a donc été ajouté avant le début du gradient pour compenser cette différence.

xxxi. Dans la mesure où t_D et t_0 sont non modifiables car intrinsèquement liés respectivement à l'appareil et à la colonne utilisés.

3.2 Paramètres retenus à l'échelle préparative

Ainsi, les différents paramètres de la méthode de séparation préparative définis dans les parties précédentes sont résumés ci-dessous :

- Séparation hors-ligne bidimensionnelle sur la même phase stationnaire
- Phase stationnaire : Uptisphere® Strategy™ C18-HQ, 10 µm (géométrie de la colonne préparative : 150 x 21,2 mm)
- Volume d'injection : 5 mL
- Débit : 15 mL/min
- Première dimension :
 - Système d'élution : MeOH/HCOONH₄ 5 mM pH 8
 - Gradient : 25 % MeOH du début à 2,13 min puis 25 à 55 % MeOH en 14,4 min (pente de 2 %/min)
- Seconde dimension :
 - Système d'élution : MeOH/HCOOH 0,1 % pH 3
 - Gradient : 35 % MeOH du début à 2,13 min puis 35 à 55 % MeOH en 9,6 min (pente de 2 %/min)

La méthode de séparation développée et transférée a ensuite été mise en œuvre pour la purification des composés colorés cibles X1 et X2 dans la partie qui suit.

3.3 Purification des composés colorés d'intérêt

Lors de la purification des composés cibles en chromatographie préparative, il a fallu prendre en compte la variation de composition de l'échantillon au cours du temps, comme précédemment mentionnée dans le chapitre 3 (partie 3.3). Pour un extrait préparé de 50 mL permettant environ 10 injections, les premières injections ont été essentiellement dédiées à la collecte de X1, puis au cours des injections la proportion en X2 est devenue plus importante et enfin, les dernières injections ont permis exclusivement la collecte de X2.

Pour la ¹D, les chromatogrammes obtenus avec le système préparatif sont représentés dans la Figure 4.17a. Ils sont extraits à 590 nm pour la détection spécifique de X1 et X2 (en haut) et en total scan 250-800 nm pour la détection de tous les composés (en bas). Pendant les acquisitions, cette double détection a notamment permis de choisir les fenêtres de collecte en limitant la présence de composés non désirés.

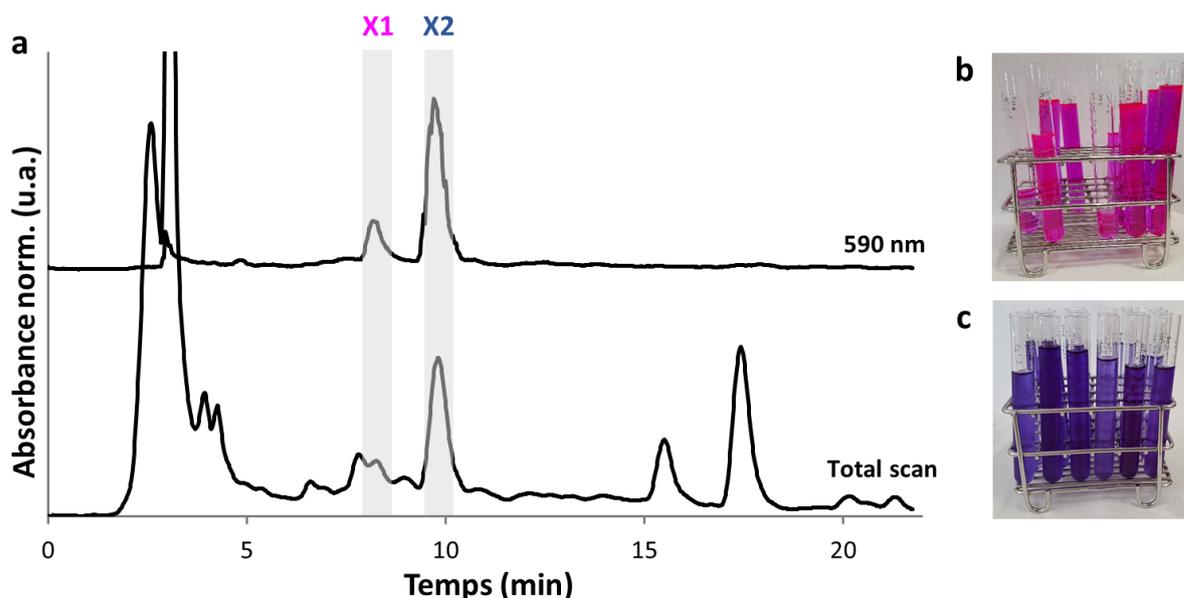


Figure 4.17 - (a) Chromatogrammes de l'extrait aqueux obtenus dans la ¹D en mode préparatif. Phase stationnaire : Uptisphere® Strategy™ C18-HQ. Phase mobile : HCOONH₄ 5 mM pH 8/MeOH. Gradient : 25 % MeOH du début à 2,13 min, 25-55 % MeOH de 2,13 à 16,53 min et 55 % de 16,53 à 28,53 min. Détection : DAD 590 nm (en haut) et total scan 200-800 nm (en bas). Photographies des fractions collectées après la ¹D : (b) X1 et (c) X2.

Malgré cette précaution, comme nous pouvons le voir sur la Figure 4.17a sur le chromatogramme en total scan, un risque non négligeable de collecter des impuretés résiduelles en même temps que X1 était présent, du fait de la proximité des pics éluant juste avant et juste après. Grâce à la méthode bidimensionnelle développée, nous avons pu les éliminer avec succès lors de l'injection ultérieure des fractions collectées dans la ²D.

Dans la ¹D, plusieurs injections consécutives ont été mises en œuvre afin de collecter les composés; cela a représenté 13 séparations lors de deux campagnes d'isolement.

Conformément à leurs spectres d'absorption (Figure 3.9 dans le Chapitre 3), isolés à pH 8, les composés X1 et X2 sont, respectivement, de couleur rose (Figure 4.17b) et bleu-violet (Figure 4.17c). La phase mobile présente dans chaque fraction collectée a été évaporée sous vide jusqu'à siccité.

Une fois séchées, les fractions collectées dans la ¹D ont été solubilisées dans de l'eau, avant leur injection dans la ²D. Plusieurs fractions de X1 d'une part, et de X2 d'autre part, ont été combinées entre elles afin de diminuer le nombre d'injections à effectuer.

À titre d'exemple, les chromatogrammes obtenus pour une fraction de X1 sont présentés en Figure 4.18a.

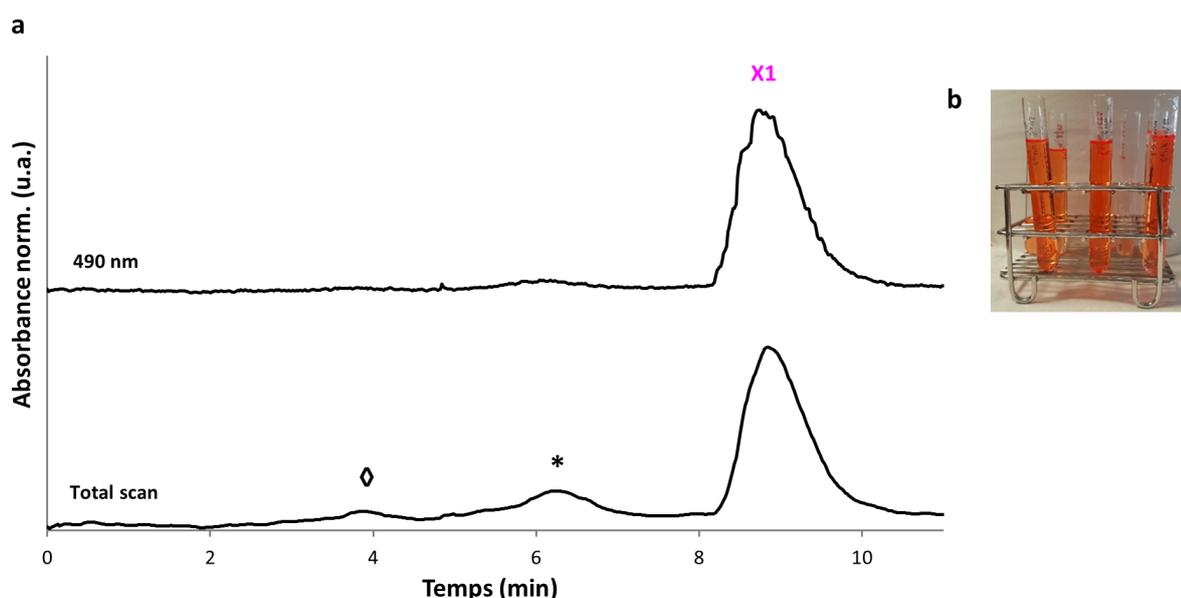


Figure 4.18 - (a) Chromatogrammes de X1 obtenus dans la ²D du mode préparatif. Phase stationnaire : Uptisphere® Strategy™ C18-HQ. Phase mobile : HCOOH 0,1 % pH 3/MeOH. Gradient : 35 % MeOH du débit à 2,13 min, 35-55 % MeOH de 2,13 à 11,73 min et 55 % de 11,73 à 23,73 min. Détection : DAD 490 nm (en haut) et total scan 200-800 nm (en bas).

Impuretés résiduelles : ◊ et *.

(b) Photographies des fractions collectées après la ²D pour X1.

Comme attendu et mentionné précédemment, nous pouvons le remarquer, dans le chromatogramme en détection total scan correspondant de la fraction de X1 collectée dans la ¹D, la présence d'impuretés résiduelles (◊ et * respectivement à environ 4 et 6 min). La différence de sélectivité entre les deux dimensions de la méthode bidimensionnelle développée a permis de les séparer aisément de X1 (t_R à environ 9 min) dans la ²D.

À pH 3, les deux composés X1 et X2 présentent une couleur orange (Figure 4.18b). À nouveau, les composés collectés ont été séchés sous vide avant leur stockage et utilisation ultérieure.

Pour conclure, nous avons cherché à évaluer la pureté des fractions de X1 et X2 ainsi collectées.

3.4 Contrôle de la pureté des composés isolés

Les composés purifiés ont été solubilisés dans de l'eau et analysés à l'échelle analytique. Une phase stationnaire distincte de celle utilisée lors de la purification a été employée, comptant sur la légère différence de sélectivité entre ces phases pour mettre en évidence d'éventuelle coélution. ^{xxxii}

La Figure 4.19 met en regard les chromatogrammes obtenus en total scan pour l'extrait aqueux brut (Figure 4.19a) et pour les composés X1 et X2 purifiés (Figure 4.19b et c, respectivement).

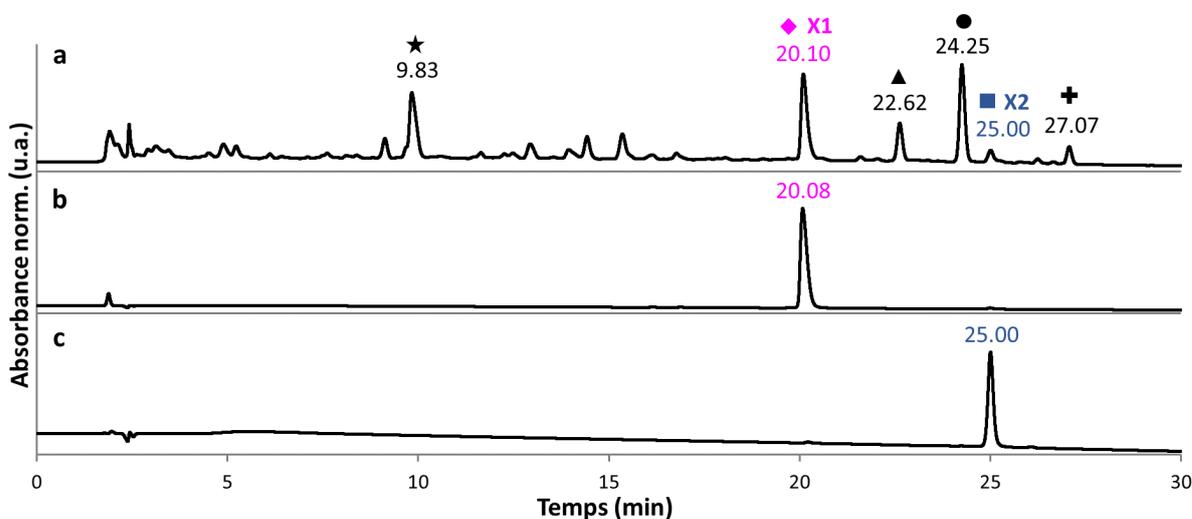


Figure 4.19 – Chromatogrammes de (a) l'extrait aqueux, (b) X1 purifié et (c) X2 purifié.
Phase stationnaire : puriFlash® C18-XS. Phase mobile : HCOOH 0.1 % pH 3 / MeOH.
Gradient : 5-80 % MeOH de 0 à 30 min. Détection : DAD 200-750 nm total scan.
Composés identifiés : ★ : A1; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; ■ : X2; + : F3.

Aucune impureté résiduelle n'a été détectée; cela valide ainsi la méthode de purification développée.

Les composés X1 et X2 purifiés ont donc pu être analysés de façon approfondie par la suite.

xxxii. Il aurait été évidemment souhaitable d'avoir accès à une phase stationnaire de chimie bien plus éloignée pour bénéficier d'une plus grande différence de sélectivité.

4 Bilan du chapitre

Afin de purifier les deux composés majoritairement responsables de la coloration de l'extrait de *Justicia spicigera*, X1 et X2, une méthode de purification par chromatographie préparative en phase liquide a été développée et optimisée.

Tout d'abord, à l'échelle analytique, les performances de plusieurs phases stationnaires C18 - disponibles pour la chromatographie préparative - et de plusieurs phases mobiles (modificateur organique et conditions de pH) ont été comparées. Aucun système de séparation n'ayant permis d'obtenir une résolution optimale entre les composés cibles et leurs impuretés avoisinantes, une séparation bidimensionnelle hors ligne a été envisagée.

Entre les deux dimensions de séparation, un changement de phase stationnaire, de phase mobile ou des deux à la fois a été considéré afin d'identifier l'option permettant de garantir le meilleur potentiel de purification des composés d'intérêt. Pour ce faire, l'orthogonalité des dimensions de séparation a été évaluée quantitativement grâce à l'approche des distances entre voisins les plus proches. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour les combinaisons de dimension faisant intervenir un changement de pH de la phase mobile, ceci découlant dû caractère ionisable des composés colorés de l'extrait. Les gradients d'élution ont ensuite été optimisés en permettant un gain de temps d'analyse sans compromettre la résolution.

Enfin, la méthode bidimensionnelle optimisée a été transférée à l'échelle préparative. Elle a été appliquée avec succès pour la purification des composés colorés X1 et X2.

Nous pouvons toutefois mentionner que, de la phase de développement de la méthode jusqu'à la mise en œuvre de la purification, nous avons été confrontés à des contraintes propres à l'échantillon et complexifiant chacune des étapes. Premièrement, les composés à purifier étant inconnus, il n'a pas été possible d'utiliser des standards et à chaque étape de l'optimisation, l'extrait coloré total de *Justicia spicigera* a dû être injecté. Par ailleurs, la composition de l'extrait étant variable dans le temps, à chaque modification d'un paramètre dans la méthode, il a fallu préparer un nouvel extrait frais afin que la comparaison des chromatogrammes dans les différentes conditions se fassent à composition comparable. L'évolution de l'extrait a également impacté la phase de purification des composés d'intérêt. Il s'est révélé impossible de préparer un grand volume d'extrait à purifier et d'enchaîner simplement les différentes injections sur le système préparatif; préparation d'échantillon et cycle de purification ont néces-

sité une synchronisation en fonction de l'évolution de la composition de l'extrait pour l'obtention successive des composés X1 et X2.

Les composés X1 et X2 ainsi purifiés ont pu être analysés de façon approfondie dans le Chapitre 5 par les techniques spectroscopiques (résonance magnétique nucléaire, absorption et émission de fluorescence UV-Vis, absorption IR et diffusion Raman) ainsi que par la spectrométrie de masse à haute-résolution en infusion directe pour d'une part, en proposer une structure moléculaire et d'autre part, évaluer leur contribution à la signature spectrale caractéristique ayant permis l'identification de *Justicia spicigera* dans le *Codex Borbonicus*.

Chapitre 5

Caractérisation des molécules purifiées

Ce chapitre décrit la caractérisation approfondie des composés colorés purifiés, X1 et X2.

Dans un premier temps, les techniques de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et de spectrométrie de masse à haute-résolution en infusion directe ont été mises en œuvre afin de proposer une structure moléculaire pour les deux composés.

Ensuite, les structures pressenties ont été confrontées aux résultats des spectroscopies électroniques et vibrationnelles afin de vérifier leur cohérence.

Pour conclure, la contribution de ces composés à la signature spectrale caractéristique de l'extrait de *Justicia spicigera* ayant permis son identification dans les peintures du *Codex Borbonicus* a été évaluée.

La comparaison des signatures spectrales des composés X1 et X2 purifiés avec celles de l'extrait total (partie 4) et des peintures du *Codex Borbonicus* a fait l'objet d'une publication dans *The Analyst* [Arberet et al., 2021].

Sommaire

1	Démarche	189
2	Élucidation structurale	190
2.1	Composé X2	190
2.1.1	Spectrométrie de masse	190
2.1.2	RMN	194
2.2	Composé X1	199
2.2.1	Spectrométrie de masse	199
2.2.2	RMN	201
2.3	Bilan intermédiaire : structure des molécules isolées	205
3	Synthèse des caractéristiques spectrales des composés X1 et X2 purifiés	206
3.1	Absorption et émission de fluorescence UV-Vis	206
3.1.1	Absorption UV-Vis	207
3.1.2	Fluorescence	212
3.2	Diffusion Raman	218
3.3	Absorption infrarouge	221
4	Comparaison avec les signaux de l'extrait total	227
4.1	Absorption et émission de fluorescence UV-Vis	227
4.2	Diffusion Raman	230
5	Bilan du chapitre	233

1 Démarche

Pour élucider la structure de composés organiques, les techniques de spectrométrie de masse, particulièrement à haute-résolution et de spectroscopie RMN du proton ^1H et du carbone ^{13}C sont les techniques de choix. Les autres techniques spectroscopiques électroniques et vibrationnelles ne permettent généralement pas seules de résoudre une structure moléculaire mais s'avèrent très utiles pour confirmer ou infirmer les propositions de structures en fonction de la cohérence entre les caractéristiques attendues et obtenues. L'approche multi-techniques suivante est généralement menée.

Tout d'abord, la spectrométrie de masse à haute-résolution (HR-MS) permet d'identifier l'ion pseudo-moléculaire du composé $[\text{M}]^+$ ou $[\text{M}+\text{H}]^+$ (respectivement $[\text{M}]^-$ ou $[\text{M}-\text{H}]^-$) et sa masse exacte. L'exploitation de sa masse exacte, la plus précise possible et l'application de règles heuristiques comme des restrictions sur le nombre d'éléments, des modèles isotopiques, des rapports élémentaires hydrogène/carbone, la règle de l'azote, etc. permettent de réduire le nombre de propositions de formules brutes associées [Kind et Fiehn, 2007]. L'idéal étant de n'en avoir plus qu'une seule, une fois ces règles appliquées. Les spectromètres de masse à résonance cyclotronique ionique (FT-ICR) permettent d'avoir la meilleure résolution, avec une précision de masse inférieure à 2 ppm [Johnson et Carlson, 2015]. En s'appuyant sur la masse exacte et la formule brute identifiée, des recherches dans des bases de données comme SciFinderⁿ, Dictionary of Natural Products, PubChem, Lotus, etc. sont alors menées afin d'identifier des structures moléculaires candidates [Sorokina et Steinbeck, 2020].

Dans le cas où des molécules connues correspondant à la formule brute recherchée sont identifiées, les données caractéristiques du composé étudié, comme les ions de fragmentation obtenus en spectrométrie de masse simple ou en tandem, les déplacements chimiques et les couplages en spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C ainsi que les bandes des spectres électroniques et vibrationnels sont exploitées afin d'évaluer si une des propositions peut être cohérente avec les données expérimentales enregistrées.

Si aucune molécule n'est décrite pour la formule brute recherchée, identifier des ions fragments ou des pertes de fragments communes à d'autres molécules de l'extrait, notamment via l'utilisation de réseaux moléculairesⁱ, peut permettre de suggérer la présence de certains groupements fonctionnels, voire l'appartenance du composé à une famille de molécules donnée.

i. Les réseaux moléculaires comparent un à un les spectres MS/MS de composés analysés et les groupent en clusters selon la similarité de leur fragmentation [Aron *et al.*, 2020, Messaili *et al.*, 2020, Buche *et al.*, 2021].

La spectroscopie RMN est ensuite exploitée afin de tenter de relier les fragments entre eux pour proposer une structure. Enfin, lorsque des incertitudes sur la position de groupements ou sur la stéréochimie subsistent, la mise en œuvre de la diffraction des rayons X sur mono-cristal (SC-DRX, *Single-crystal X-ray diffraction*) permet d'obtenir la répartition des atomes dans l'espace sans ambiguïté [Gurzhiy, 2019, Perles, 2020]. Cependant, son application se révèle limitée par la nécessité d'obtenir une cristallisation du composé, ce qui est un défi pour beaucoup de composés organiques [Cardenal et Ramadhar, 2021].

Idéalement, pouvoir se procurer un standard de la molécule pressentie, réaliser l'ensemble des analyses avec cette référence et comparer les données obtenues pour les deux composés, inconnu et référence, atteste de la validité de l'identification moléculaire réalisée.

2 Élucidation structurale

La démarche décrite ci-dessus a été mise en application pour l'élucidation structurale des composés X1 et X2. Cette première partie est centrée autour des données extraites des analyses en spectrométrie de masse à haute résolution et en spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C mono et bidimensionnelle.

Nous commençons par traiter le cas du composé X2, présentant une masse inférieure à celle de X1. Ayant précédemment observé une évolution de la composition moléculaire de l'extrait de *Justicia spicigera* au cours du temps, et particulièrement la diminution de la concentration du composé X1 au profit du composé X2 (Chapitre 3, partie 3.3), nous avons fait l'hypothèse que les composés X1 et X2 puissent être de structures proches. Ainsi, résoudre en premier lieu la structure du plus léger peut nous donner des éléments sur la structure du plus lourd.

2.1 Composé X2

2.1.1 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse à haute résolution (HR-MS) a permis d'obtenir la masse exacte de l'ion pseudo-moléculaire de X2.

En ionisation positive, l'ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ a été détecté à m/z 259,072 correspondant à une formule brute $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_4^+$ (erreur de 1,7 ppm)ⁱⁱ. En ionisation négative, l'ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ a

ii. Seule proposition avec un nombre d'électrons pairs et dont la tolérance est inférieure à 5 ppm.

été détecté à m/z 257,056 correspondant à une formule brute $C_{13}H_9N_2O_4^-$ (erreur de 3,7 ppm)ⁱⁱⁱ. La formule brute suggérée pour le composé X2 est ainsi **$C_{13}H_{10}N_2O_4$** .

La fragmentation MS-MS à haute-résolution de l'ion pseudo-moléculaire de X2 a permis d'obtenir la masse exacte et les formules brutes de ses ions fragments^{iv}. En ionisation positive, les fragments ont été détectés à m/z 244,048 pour $C_{12}H_8N_2O_4^{+•}$ (erreur 1,7 ppm), 216,053 pour $C_{11}H_8N_2O_3^{+•}$ (erreur 2,1 ppm) et 188,058 pour $C_{10}H_8N_2O_2^{+•}$ (erreur 1,8 ppm) (Figure 5.1). En ionisation négative, un seul fragment a été observé à m/z 242,032 pour $C_{12}H_6N_2O_4^{+•}$ (erreur 4,0 ppm).

Les ions de fragmentation de X2 mettent ainsi en évidence la perte d'un radical $CH_3^•$ ^v suivie de pertes successives de deux CO.

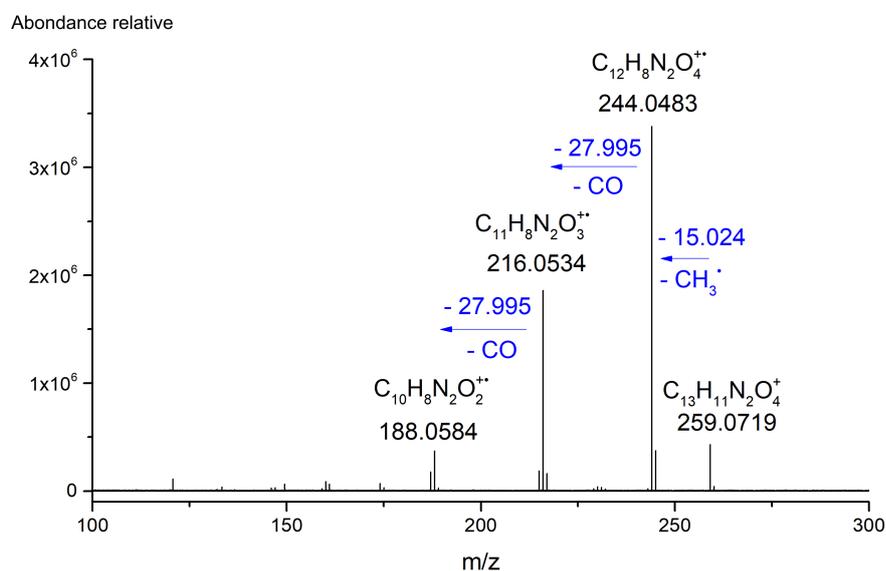


Figure 5.1 – Spectre HR-MS-MS-ESI⁺ du composé X2. CID 15V.

Une recherche dans les bases de données a ensuite été effectuée afin de voir si la formule brute $C_{13}H_{10}N_2O_4$ suggérée pour le composé X2 correspondait à des molécules dont les structures étaient déjà décrites.

Cette recherche a été limitée aux produits naturels. Certaines bases de données sont dédiées à ces produits (comme Dictionary of Natural Products, DNP), d'autres proposent des filtres pour sélectionner les résultats appartenant aux produits naturels (filtre « Natural Product Occurrence » sur SciFinderⁿ).

iii. Idem.

iv. Seules propositions dont la tolérance était inférieure à 5 ppm.

v. D'après la *even-electron rule*, la perte de radical n'est généralement pas observée à partir d'un ion non radicalaire pour des ionisations douces comme l'ESI. On note certains rares cas de violation de cette règle pour des polyphénols comme des flavonoïdes, des anthraquinones et des terpénoïdes pour lesquels des pertes de radical méthyle ont été reportées [Demarque *et al.*, 2016].

La recherche de la formule brute $C_{13}H_{10}N_2O_4$ parmi les produits naturels sur les bases de données DNP et SciFinderⁿ ont donné six propositions de composés, dont les structures sont présentées dans la Figure 5.2.

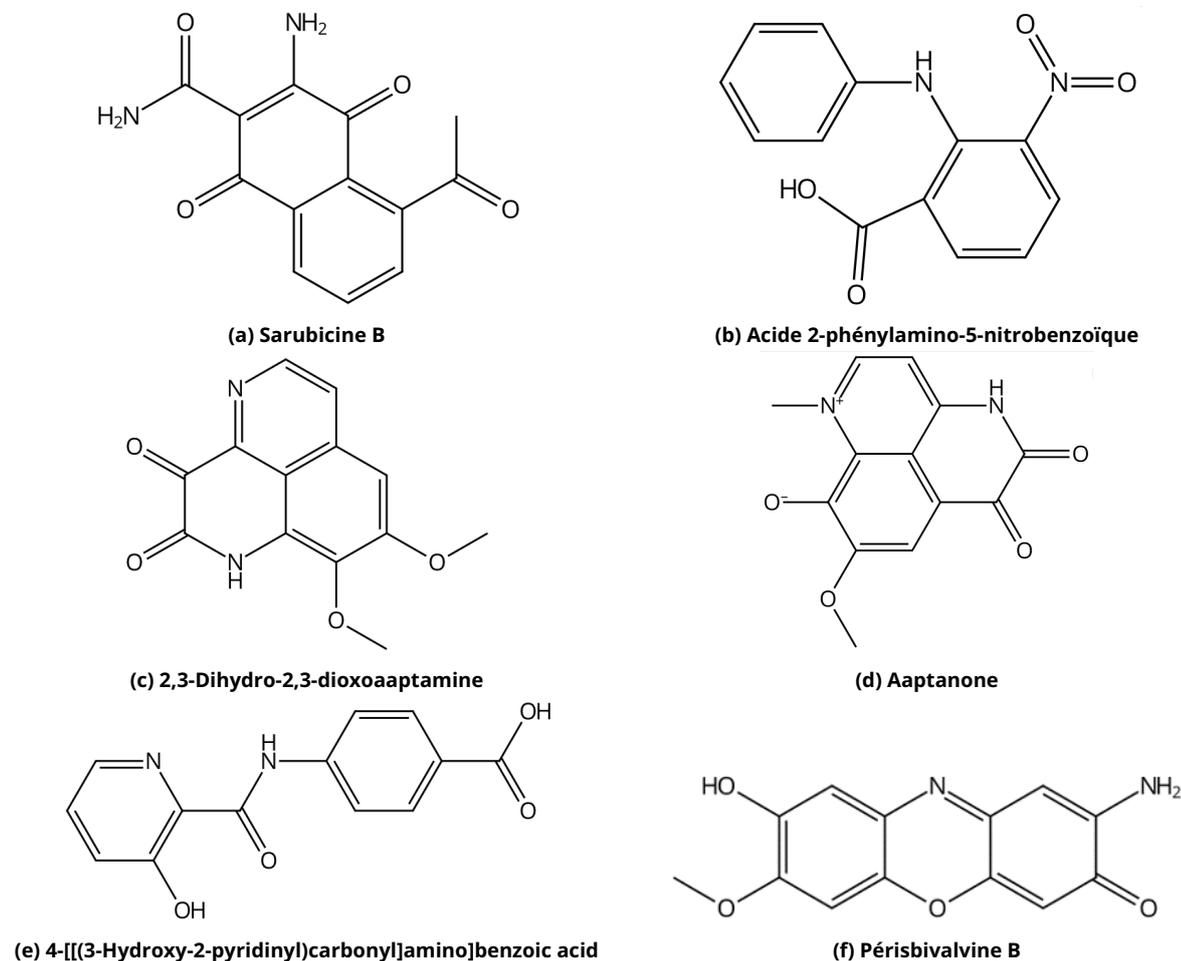


Figure 5.2 - Produits naturels de formule brute $C_{13}H_{10}N_2O_4$ issus des recherches dans les bases de données.

Le rapide passage en revue des propriétés de ces molécules permet de mettre en évidence que seule l'une d'entre elles peut être responsable d'une coloration violette comme l'extrait de *Justicia spicigera*^{vi}. Les autres formules proposées n'ont donc pas été exploitées^{vii}.

Il s'agit de la périssivalvine B (Figure 5.2f), une molécule de la famille des phénoxazones extraite d'une plante de la famille des Acanthacées, *Peristrophe bivalvis*^{viii}, utilisée

vi. La sarubicine B (Figure 5.2a) et la 2,3-dihydro-2,3-dioxoaptamine (Figure 5.2c) présentent par exemple des colorations jaunes [Eckardt *et al.*, 1982, Shubina *et al.*, 2010].

vii. Par ailleurs, les données en RMN attendues pour ces formules n'étaient pas en adéquation avec celles obtenus expérimentalement et qui sont détaillées dans la partie suivante.

viii. ou *Lá Cam*, pour l'appellation vernaculaire en vietnamien). Synonymes botaniques dans l'Annexe L, Tableau L.1, on notera particulièrement l'existence de plusieurs d'entre eux intégrant *Justicia*.

au Vietnam^{ix} pour la coloration alimentaire de plats traditionnels en rouge-violet [Thuy *et al.*, 2012c].

Cette structure est d'autant plus intéressante que nous avons précédemment fait au Chapitre 3 (partie 2.1) le rapprochement entre les propriétés en absorption et fluorescence UV-Vis du colorant de *Justicia spicigera* et de l'orseille, dont la composition est un mélange de molécules de la famille des phénoxazones (hydroxy-orcéines et amino-orcéines notamment).

Les fragments observés en spectrométrie de masse pour le composé X2 sont en adéquation avec la fragmentation observée pour d'autres phénoxazones. En effet, dans le spectre ESI⁺-MS² de la 3H-phénoxazin-3-one [M+H]⁺ m/z 198 (Figure 5.3a), [Sutherland *et al.*, 2001] ont identifié les ions fragments 170 (198-28) et 142 (170-28) correspondant à la perte de deux CO. D'autres auteurs, [Qin *et al.*, 1999] et [Thuy *et al.*, 2012a], ont reporté également une perte successive de deux CO à la suite d'une perte de CH₃ dans la fragmentation de la péristrophine dans des spectres EI-MS (Figure 5.3b).

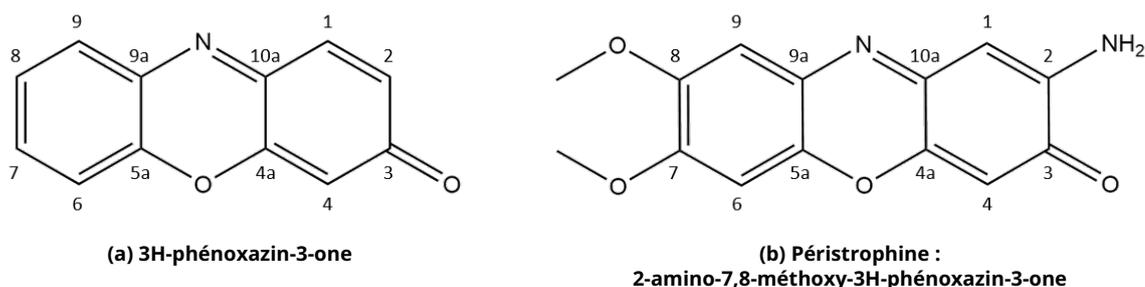


Figure 5.3 – Structures de phénoxazones, accompagnées de la numérotation courante des atomes pour cette famille.

Afin d'évaluer cette piste de la périssivalvine B, un extrait de *Peristrophe bivalvis* a été analysé par HPLC-DAD-MS et -MS-MS. Son analyse a mis en évidence que le composé X2 présentait la même rétention, le même spectre d'absorption et le même spectre de MS et MS-MS que le composé identifié comme la périssivalvine B par [Thuy *et al.*, 2012c] (Annexe L, Figures L.2 et L.4)^x.

Des analyses en RMN ont ensuite été menées pour valider l'hypothèse de la formule de la périssivalvine B comme structure du composé X2.

ix. Distribution géographique dans la Figure L.1

x. Par ailleurs, le composé X1 y a également été détecté alors qu'il n'avait été jusqu'à présent jamais reporté dans cette espèce

2.1.2 RMN

Les expériences de RMN ont été menées dans deux solvants permettant l'obtention de données complémentaires : CD_3OD et le DMSO-d_6 .

Les spectres RMN 1D ^1H et 2D de corrélations ^1H - ^1H (COSY et NOESY) et corrélations ^1H - ^{13}C (HSQC et HMBC) ont été exploités.

Les spectres RMN ^1H permettent d'identifier dans le CD_3OD les signaux de 7 protons (Annexe M, Figure M.1) et dans le DMSO-d_6 , ceux de 9 protons (Annexe M, Figure M.5). Cela est cohérent avec la structure de la périssbivalvine B (Figure 5.4) où les 3 protons labiles des groupements hydroxyle OH et amine NH_2 ne seraient pas détectés dans le CD_3OD et où seuls les protons de l'amine seraient visibles dans le DMSO-d_6 . L'absence du signal associé au groupement OH peut s'expliquer par la déprotonation de la molécule dans les conditions d'analyse.

Parmi ces protons, 4 sont détectés dans la zone des protons aromatiques (δ_{H} à 6,00, 6,02, 6,40 et 6,66 ppm dans DMSO-d_6); leurs signaux sont des singulets. L'absence de couplage entre ces protons est cohérente avec une structure de type phénoxazone avec des substituants en C-2/C-3 et C-7/C-8. Les protons aromatiques se retrouvant alors en position para, aucun couplage n'est observé. Trois protons équivalents sont détectés pour un δ_{H} de 3,69 ppm correspondant au groupement méthoxy. Deux protons équivalents à δ_{H} 5,21 ppm visibles uniquement sur les spectres dans le DMSO-d_6 sont attribués aux deux hydrogènes du groupement amine. Ils donnent un pic large, témoignant de leur labilité (Annexe M, Figure M.5).

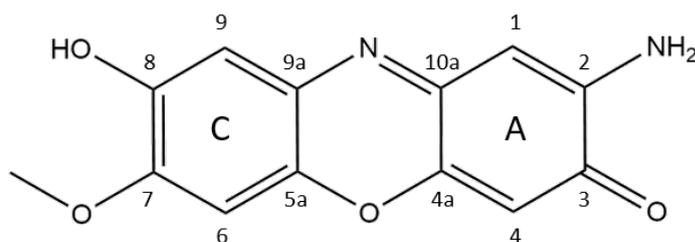


Figure 5.4 - Structure de la périssbivalvine B (2-amino-8-hydroxy-7-méthoxy-3H-phénoxazin-3-one)

Les déplacements chimiques des carbones sont obtenus grâce à l'exploitation des spectres 2D ^1H - ^{13}C HSQC (Annexe M, Figures M.2 dans le CD_3OD et M.6 dans le DMSO-d_6) et HMBC (Annexe M, Figures M.3 dans le CD_3OD et M.7 dans le DMSO-d_6). 13 signaux sont observés correspondant au 13 carbones de la molécule. Dix ont des déplacements chimiques compris entre environ 100 et 150 ppm, correspondant à la zone des carbones aromatiques, deux signaux sont identifiés aux alentours de 170 ppm et un signal à 55,0 ppm, correspondant à un méthyle déblindé, le méthoxy.

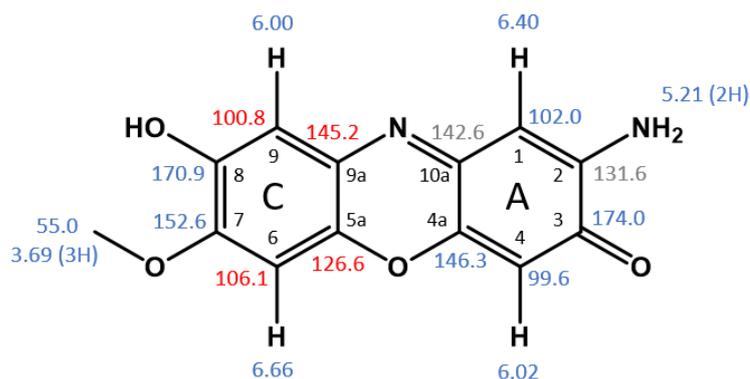


Figure 5.5 – Attribution des déplacements chimiques ^1H et ^{13}C enregistrés dans le DMSO-d_6 pour le composé X2 sur la structure de la périssivalvine B.

Tableau 5.1 – Données RMN ^1H et ^{13}C enregistrées pour le composé X2 et attribuées à la formule de la périssivalvine B.
* pour des corrélations de faible intensité.

	$\delta^1\text{H DMSO-d}_6$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C DMSO-d}_6$ (ppm)	$\delta^1\text{H CD}_3\text{OD}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C CD}_3\text{OD}$ (ppm)	HMBC $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ (8 Hz)	COSY $^1\text{H-}^1\text{H}$
1	6,40 s	102,0	6,63 s	102,8	C-3, C-4a, C-10a*	NH_2
2	-	131,6	-	138,8		
3	-	174,0	-	178,0		
4	6,02 s	99,6	6,41 s	102,5	C-2, C-4a*, C-10a	
4a	-	146,3	-	149,7		
5a	-	126,6	-	129,2		
6	6,66 s	106,1	6,99 s	107,1	C-5a*, C-7*, C-8, C9-a	7-OCH ₃
7	-	152,6	-	153,0		
8	-	170,9	-	166,2		
9	6,00 s	100,8	6,62 s	103,0	C-5a, C-7, C-9a*	
9a	-	145,2	-	144,5		
10a	-	142,6	-	145,9		
7-OCH ₃	3,69 (3H)	55,0	3,91 (3H)	56,3	C-7	H-6
2-NH ₂	5,21 (2H)	-			C-1, C-3	H-1

Les corrélations $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ à courte portée (HSQC) permettent d'attribuer les déplacements chimiques des carbones portant des hydrogènes : le carbone du méthoxy et les carbones portant les 4 protons aromatiques (respectivement 3,69-55,0; 6,00-100,8; 6,02-99,6; 6,40-102,0 et 6,66-106,1 ppm) (Annexe M, Figure M.6).

Les corrélations $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ à longue portée (HMBC) permettent d'identifier les déplacements chimiques des carbones se trouvant dans le même cycle aromatique. Les carbones avec les déplacements δ_c de 99,6 102,0 131,6 142,6 146,3 et 174,0 ppm sont dans le même cycle, dit cycle A; ceux avec des δ_c de 100,8 106,1 126,6 145,2 152,6 et 170,9 ppm sont dans l'autre cycle aromatique, dit cycle C (Annexe M, Figure M.7).

La corrélation HMBC entre les protons du méthoxy et le carbone aromatique de δ_C 152,6 ppm montre la présence du méthoxy dans le cycle C et permet d'identifier le déplacement chimique du carbone le portant. Les corrélations HMBC entre les protons du groupe amine et les carbones à δ_C 102,0 et 174,0 ppm indiquent sa présence dans le cycle A (Figure 5.6a).

Les corrélations ^1H - ^1H (NOESY, dans l'espace et COSY, via les liaisons) entre les protons du méthoxy et le proton à δ_H 6,66 ppm permettent d'identifier leurs positions relatives dans le cycle C. De même, les corrélations NOESY entre les protons de l'amine et le proton à δ_H 6,40 ppm démontrent leur position relative dans le cycle A (Figure 5.6b).

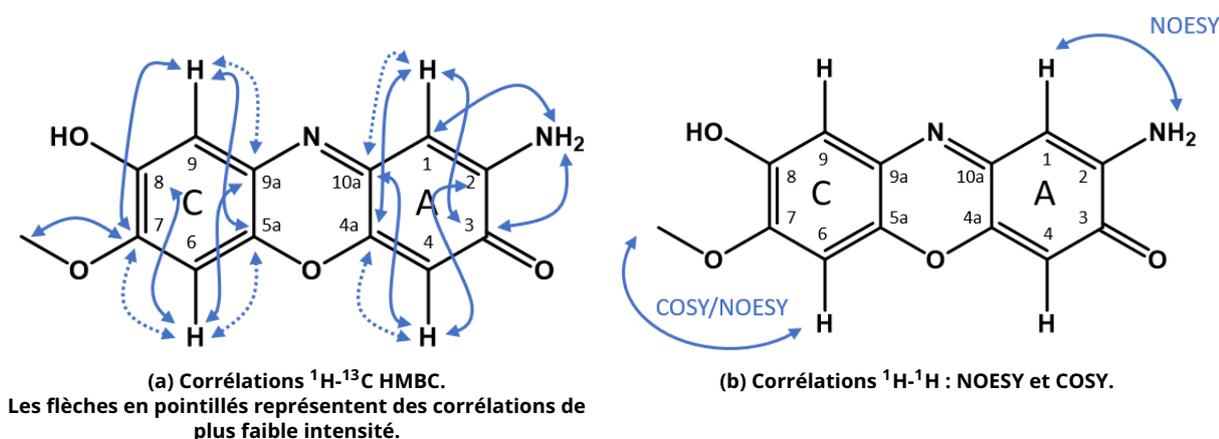


Figure 5.6 – Représentations des corrélations enregistrées pour le composé X2 dans le DMSO- d_6 sur la structure de la péricisbivalvine B.

Certaines tâches de corrélations HMBC ont des intensités plus faibles que d'autres (Figure 5.6a). Dans les aromatiques, les corrélations ^3J sont favorisées par rapport aux ^2J [Plesner *et al.*, 2015]. Les interactions les plus faibles sont donc attribuées à des corrélations ^2J et il est ainsi possible d'attribuer les déplacements chimiques des différents carbones dans les deux cycles aromatiques.

L'attribution finale des signaux enregistrés sur la structure de la péricisbivalvine B est présentée en Figure 5.5 et dans le Tableau 5.1. En ne s'appuyant que sur des corrélations expérimentales, nous ne pouvons pas trancher pour l'attribution des déplacements chimiques des carbones C-2 et C-10a (en gris, sur la Figure 5.5). La proposition faite ici s'appuie sur des propositions faites dans la littérature pour des spectres RMN obtenus sur d'autres phénoxazin-3-ones. Une interversion de l'attribution de ces deux carbones serait également cohérente avec les corrélations expérimentales obtenues.

Dans cette proposition d'attribution des déplacements chimiques enregistrés pour le composé X2 sur la structure de la péricisbivalvine B, les déplacements chimiques δ_C

des carbones C-5a et C-9a sont respectivement à 126,6 et 145,2 ppm et ceux des carbones C-6 et C-9 à 106,1 et 100,8 ppm (en rouge, sur la Figure 5.5). Cela semble aller à l'encontre de plusieurs attributions publiées pour divers dérivés de phénoxazin-3-ones dans le DMSO- d_6 .

En effet, pour la 2-amino-phénoxazin-3-one [Maskey *et al.*, 2003, Dey et Mukherjee, 2015, Umetsu *et al.*, 2019], la péristrophine [Thuy *et al.*, 2012a], la vénézuéline E [Ren *et al.*, 2013], la chandrananimycine D [Bezerra-Gomes *et al.*, 2010] ou la maroxazinone [Abdelfattah, 2013] un déplacement chimique supérieur est attendu pour le carbone C-5a, voisin de l'oxygène par rapport au carbone C-9a, voisin de l'azote. Dans ces exemples, le déplacement chimique du carbone C-9 est supérieur à celui du C-6 et ce, quels que soient les substituants du cycle C en positions C-7 et C-8.

D'après les corrélations expérimentales que nous avons enregistrées dans le cycle C, nous sommes pourtant assez confiants des attributions faites. En revanche, nous émettons un doute sur la validité de la structure proposée par [Thuy *et al.*, 2012c] et [Pérez-Vásquez *et al.*, 2022] pour la périsbivalvine B^{xi}, qui pourrait être à l'origine de l'incohérence soulevée quant aux attributions des carbones C-5a, C-6, C-9 et C-9a.

En effet, en inversant simplement la position des groupements méthoxy et hydroxyle sur le cycle C (correspondant à un isomère de constitution de la périsbivalvine B, la 2-amino-7-hydroxy-8-méthoxy-3H-phénoxazin-3-one), nous retrouvons des déplacements chimiques pour les carbones C-5a, C-6, C-9 et C-9a cohérents avec ceux de la littérature (Tableau 5.2 et Figure 5.7).

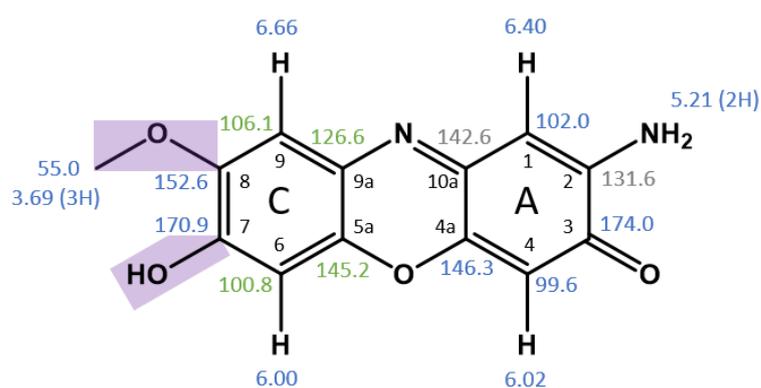


Figure 5.7 – Attribution des déplacements chimiques ^1H et ^{13}C enregistrés dans le DMSO- d_6 pour le composé X2 sur la structure de la 2-amino-7-hydroxy-8-méthoxy-3H-phénoxazin-3-one.

xi. Détails en Annexe N.

Tableau 5.2 – Données RMN ^1H et ^{13}C enregistrées pour le composé X2 et attribuées à la formule de la 2-amino-7-hydroxy-8-méthoxy-3H-phénoxazin-3-one.
* pour des corrélations de faible intensité.

	$\delta^1\text{H}$ DMSO- d_6 (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ DMSO- d_6 (ppm)	$\delta^1\text{H}$ CD_3OD (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ CD_3OD (ppm)	HMBC ^1H - ^{13}C (8 Hz)	COSY ^1H - ^1H
1	6,40 s	102,0	6,63 s	102,8	C-3, C-4a, C-10a*	NH_2
2	-	131,6	-	138,8		
3	-	174,0	-	178,0		
4	6,02 s	99,6	6,41 s	102,5	C-2, C-4a*, C-10a	
4a	-	146,3	-	149,7		
5a	-	145,2	-	144,5		
6	6,00 s	100,8	6,62 s	103,0	C-5a*, C-8, C9-a	
7	-	170,9	-	166,2		
8	-	152,6	-	153,0		
9	6,66 s	106,1	6,99 s	107,1	C-5a, C-7, C-8*, C-9a*	8-OCH ₃
9a	-	126,6	-	129,2		
10a	-	142,6	-	145,9		
8-OCH ₃	3,69 (3H)	55,0	3,91 (3H)	56,3	C-8	H-9
2-NH ₂	5,21 (2H)	-	-	-	C-1, C-3	H-1

L'ensemble des corrélations (HMBC, COSY et NOESY) obtenues expérimentalement sont cohérentes également avec cette proposition de structure (Figures 5.8a et 5.8b).

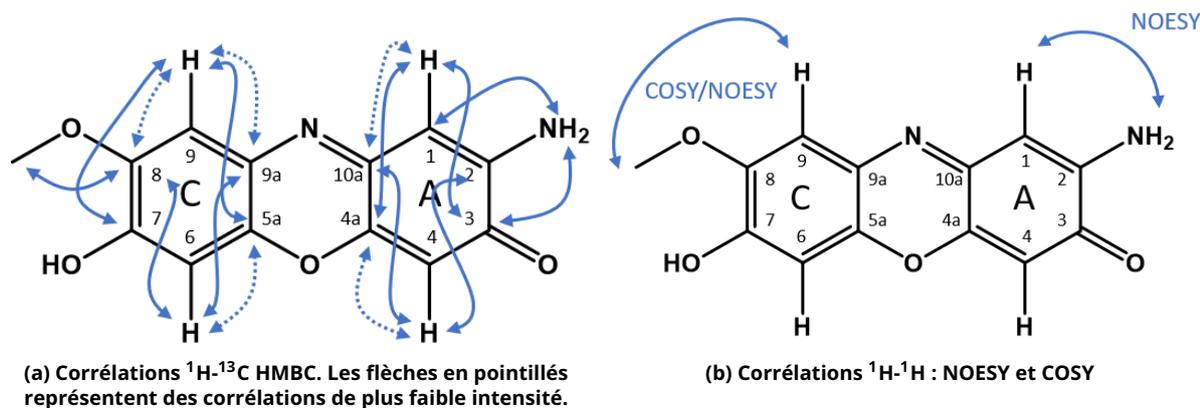


Figure 5.8 – Représentations des corrélations enregistrées pour le composé X2 dans le DMSO- d_6 sur la structure de la 2-amino-7-hydroxy-8-méthoxy-3H-phénoxazin-3-one.

Afin de confirmer la position relative des groupements méthoxy et hydroxyle, et valider la structure de la 2-amino-7-hydroxy-8-méthoxy-3H-phénoxazin-3-one pour le composé X2, il serait nécessaire de cristalliser le produit afin de réaliser de la diffraction des rayons X sur mono-cristal (SC-DRX). La répartition des atomes dans l'espace pourrait être obtenue, permettant de résoudre sans ambiguïté la structure du composé X2.

Les difficultés rencontrées pour cristalliser le produit ne nous ont cependant malheureusement pas permis de réaliser ces expériences, à ce jour.

Après avoir élucidé la structure du composé X2, la partie suivante est dédiée à l'élucidation structurale du composé X1.

2.2 Composé X1

2.2.1 Spectrométrie de masse

Comme pour le composé X2, la HR-MS a permis l'obtention de la masse exacte de l'ion pseudo-moléculaire et sa formule brute. En ionisation positive, l'ion $[M+H]^+$ a été détecté à m/z 404,109 correspondant à une formule brute $C_{18}H_{18}N_3O_8^+$ (erreur 1,2 ppm)^{xii}. En ionisation négative, l'ion $[M-H]^-$ a été détecté à m/z 402,093 correspondant à une formule brute $C_{18}H_{16}N_3O_8^-$ (erreur 2,6 ppm)^{xiii}. La formule brute proposée pour le composé X1 est donc **$C_{18}H_{17}N_3O_8$** .

Cette formule brute n'est pas reportée parmi les produits naturels dans les bases de données.

La fragmentation MS-MS à haute-résolution de l'ion pseudo-moléculaire de X1 a permis d'obtenir la masse exacte et la formule brute de ses fragments^{xiv}. En ionisation positive, les ions fragments ont été détectés à m/z 386,099 pour $C_{18}H_{16}N_3O_7^+$ et 259,072 pour $C_{13}H_{11}N_2O_4^+$ (Figure 5.9). En ionisation négative, les fragments m/z ont été détectés à m/z 384,082 pour $C_{18}H_{14}N_3O_7^-$ (erreur 3,2 ppm), m/z 340,093 pour $C_{17}H_{14}N_3O_5^-$ (erreur 3,9 ppm) et m/z 257,056 pour $C_{13}H_9N_2O_4^-$ (erreur 3,5 ppm) (spectre non présenté).

Les fragments observés correspondent ainsi à des pertes successives d' H_2O , de CO_2 ^{xv} puis d'un fragment C_4H_5NO . Suite à ces pertes, le fragment obtenu a la même formule brute que l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ du composé X2 : $C_{13}H_{11}N_2O_4^+$. Cela suggère que le composé X1 correspond à un dérivé du composé X2, avec la présence d'un ou plusieurs groupements additionnels.

xii. Seule proposition avec un nombre d'électrons pairs et dont la tolérance est inférieure à 5 ppm.

xiii. Idem.

xiv. Seules propositions dont la tolérance était inférieure à 5 ppm.

xv. Uniquement en ionisation négative.

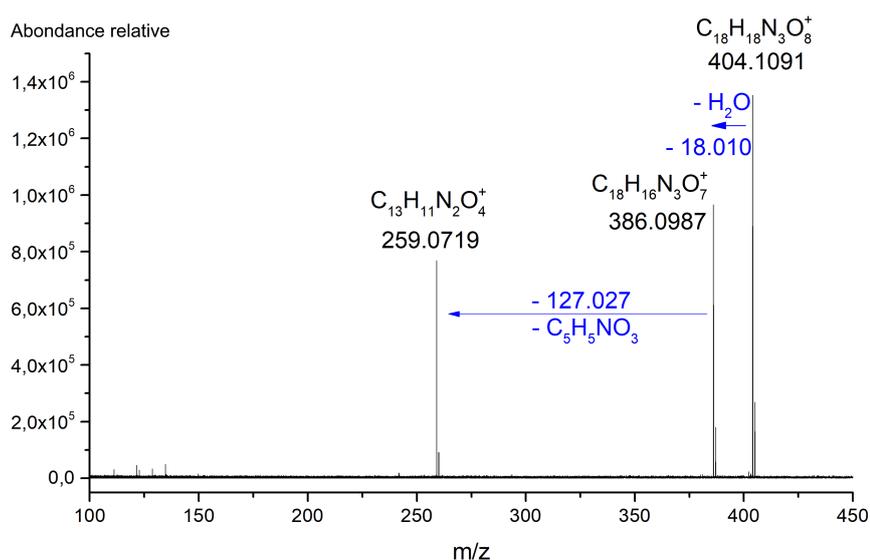


Figure 5.9 – Spectre HR-MS-MS-ESI⁺ de X1. CID 2V.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons cherché à refragmenter l'ion fragment de m/z 259 pour voir si les fragments correspondent à ceux de X2. Le spectre de fragmentation obtenu est comparé à celui de X2 dans la Figure 5.10.

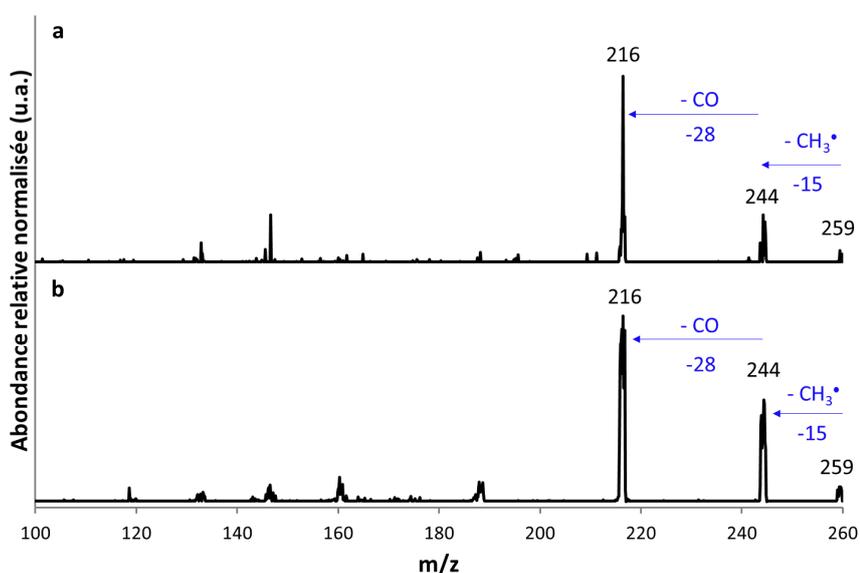


Figure 5.10 – Spectres LR-MS-MS-ESI⁺ suite à la fragmentation de l'ion m/z 259 des composés X1 (a) et de X2 (b).
Infusion directe. Énergie de collision (CE) 30 eV.

Les fragments obtenus correspondent également à la perte de CH_3^\bullet , suivie de la perte d'un CO, comme ce qui est observé pour X2. On peut donc raisonnablement supposer que le composé X1 possède le même cœur phénoxazin-3-one que le composé X2. La parenté de ces deux composés est ainsi confirmée.

2.2.2 RMN

Comme pour le composé X2, les expériences de RMN ont été menées dans deux solvants permettant l'obtention de données complémentaires : CD₃OD et le DMSO-d₆.

Les spectres RMN 1D ¹H et 2D de corrélations ¹H-¹H (COSY et ROESY) et de corrélations ¹H-¹³C (HSQC et HMBC) ont été exploités.

Le spectre RMN ¹H du composé X1 a permis d'identifier les signaux de 12 protons dans le DMSO-d₆ (Annexe M, Figure M.10). Comme dans X2, 4 singulets ont été détectés dans la zone des protons aromatiques (δ_H à 6,17; 6,22; 6,76 et 8,29 ppm) et un signal à δ_H 3,75 ppm intégrant pour 3 protons, correspondant au méthoxy. Un signal à 9,95 ppm est détecté uniquement dans le DMSO-d₆. Les signaux de 4 protons supplémentaires dans la zone des protons aliphatiques ont été détectés (δ_H 1,78; 2,24; 3,52 et 4,19 ppm).

Le nombre identique de protons aromatiques entre X2 et X1 indique que le ou les groupements supplémentaires ne correspondent pas à des substitutions des cycles aromatiques du cœur phénoxazin-3-one mais à des accrochages par le groupement hydroxyle et/ou amine. Le signal de proton labile de l'amine détecté à δ_H 9,95 ppm n'intégrant plus que pour un proton et son déplacement chimique de 9,95 ppm contre δ_H 5,21 ppm pour le NH₂ dans X2 suggèrent l'accrochage du groupement supplémentaire par la formation d'un amide via l'azote porté par le C-2.

Les signaux de 18 carbones ont été détectés; dix d'entre eux ont des déplacements chimiques dans la zone des carbones aromatiques entre 100-150 ppm, quatre ont des déplacements autour de 170 ppm et quatre sont détectés dans la zone des carbones aliphatiques (Annexe M, Figure M.11).

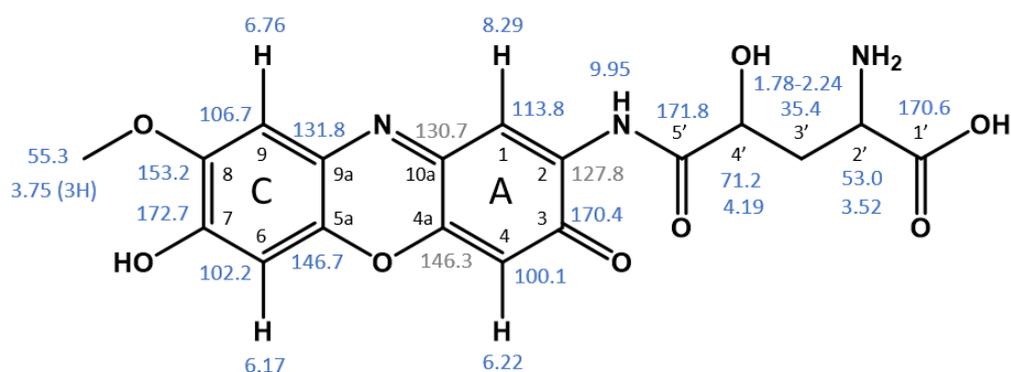


Figure 5.11 – Attribution des déplacements chimiques ¹H et ¹³C enregistrés dans le DMSO-d₆ pour le composé X1.

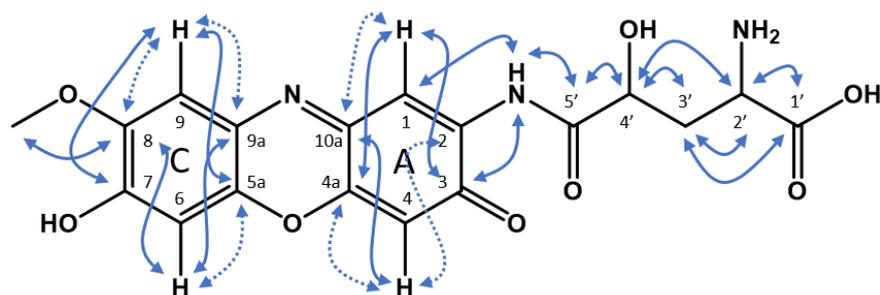
**Tableau 5.3 – Données RMN ^1H et ^{13}C enregistrées pour le composé X1.
* pour des corrélations de faible intensité.**

	$\delta^1\text{H}$ DMSO- d_6 (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ DMSO- d_6 (ppm)	HMBC ^1H - ^{13}C (8 Hz)	COSY ^1H - ^1H	ROESY ^1H - ^1H
1	8,29 s	113,8	C-3, C-4a, C-10a*		H-9, 2-NH, H-4', H-3'
2	-	127,8			
3	-	170,4			
4	6,22 s	100,1	C-2*, C-4a*, C-10a	2-NH	
4a	-	146,3			
5a	-	146,7			
6	6,17 s	102,2	C-5a*, C8, C-9a		
7	-	172,7			
8	-	153,2			
9	6,76 s	106,7	C-5a, C-7, C-8*, C-9a*	8-OCH ₃	H-1, 8-OCH ₃
9a	-	131,8			
10a	-	130,7			
2-NH	9,95	-	C-1, C-3, C-5'	H-1, H-4, H-4', H-3'	
8-OCH ₃	3,75 (3H)	55,3	C-8	H-9	
5'	-	171,8			
4'	4,19	71,2	C-5', C-3', C-2'	H-3'a, H-3'b	H-1, 2-NH, H-3'a, H-3'b
3'	1,78a 2,24b	- 35,4	C-4', C-2', C-1'	H-4', H-2'	H-1, 2-NH, H-4', H-2'
2'	3,52	53,0	C-4', C-3', C-1'	H-3'a, H-3'b	H-4', H-3'a, H-3'b
1'	-	170,6			

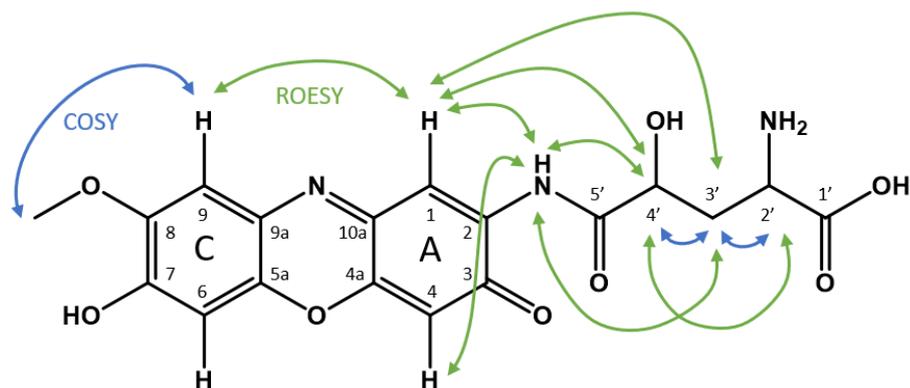
Les corrélations ^1H - ^{13}C à courte portée (HSQC) permettent d'associer les déplacements chimiques des hydrogènes et des carbones les portant (pour les protons aromatiques : 6,17-102,2; 6,22-100,1; 6,76-106,7 et 8,29-113,8 ppm; pour les protons aliphatiques : CH₂ 1,78 et 2,24-35,4; CH 3,52-53,0; CH₃ 3,75-55,3 et CH 4,19-71,2 ppm) (Annexe M, Figure M.12).

Les corrélations ^1H - ^{13}C à longue portée (HMBC) permettent d'identifier les déplacements chimiques des carbones aromatiques se trouvant dans les mêmes cycles. Les carbones avec les déplacements δ_c 102,2 106,7 131,8 146,7 153,2 et 172,7 ppm sont dans le même cycle aromatique, dit cycle C; ceux avec des δ_c de 100,1 113,8 127,8 130,7 146,3 et 170,4 ppm sont dans l'autre cycle aromatique, dit A (Annexe M, Figures M.13 et M.14).

La corrélation HMBC entre les protons du méthoxy et le carbone aromatique de δ_c 153,2 ppm montre la présence du méthoxy sur le cycle C et permet d'identifier le carbone portant ce groupement (Figure 5.12a).

(a) Corrélations ^1H - ^{13}C HMBC.

Les flèches en pointillés représentent des corrélations de plus faible intensité.

(b) Corrélations ^1H - ^1H : ROESY et COSY.

Les corrélations observées en COSY le sont aussi en ROESY, mais sont omises sur cette représentation pour ne pas la surcharger le schéma.

Figure 5.12 – Représentations des corrélations enregistrées pour le composé X1 dans le DMSO- d_6 .

Les corrélations HMBC entre le proton du groupe amine et les carbones à δ_c 113,8 et 170,4 ppm indiquent sa présence sur le cycle A et la corrélation supplémentaire avec le carbone à δ_c 171,8 ppm confirme la présence d'une fonction amide pour relier la chaîne supplémentaire au cœur phénoxazin-3-one (Figure 5.12a). Le fragment ajouté de formule brute $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_4$ pourrait ainsi correspondre à un dérivé acylé dont l'acide carboxylique a réagi avec l'amine primaire de X2 pour donner un amide. Les différents isomères d'acide hydroxyglutamique (Figure 5.13) ont notamment une formule brute qui coïncide avec celle du fragment ainsi que des éléments cohérents avec les signaux RMN détectés (2 CH et 1 CH_2 dans la zone des carbones aliphatiques et 2 carbonyles).

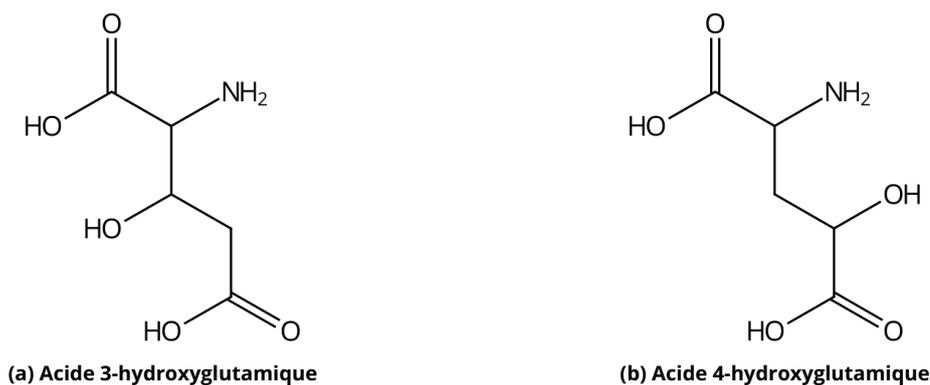


Figure 5.13 - Acides hydroxyglutamiques

Les corrélations HMBC et COSY permettent d'identifier l'enchaînement des carbones sur la chaîne carbonée. La corrélation HMBC H-4'/C-5' montre que le carbone C-4' est voisin du carbonyle C-5'; les corrélations COSY entre les protons H-4'/H-3' et H-3'/H-2' justifient l'enchaînement des carbones C-4', C-3' et C-2'. Enfin, la corrélation HMBC H-2'/C-1' permet d'identifier la terminaison de la chaîne avec le groupement COOH. Compte tenu des déplacements chimiques élevés (δ_c 71,2 et 53,0 ppm) pour les carbones C-4' et C-2' respectivement, le groupement hydroxyle est substitué sur le carbone le plus déblindé C-4' et l'amine primaire NH₂ sur le carbone C-2'. C'est ainsi un dérivé acylé de l'acide 4-hydroxyglutamique (Figure 5.13b) qui est substitué sur le cœur 2-amino-phénoxazin-3-one.

La corrélation ROESY entre les protons à δ_H 8,29 ppm (H-1) et 6,76 ppm (du cycle C) permet de justifier la position C-9 de ce dernier proton. La corrélation COSY entre le proton H-9 et les protons du méthoxy permet de démontrer la position du méthoxy en C-8 (Figure 5.12b).

Comme pour le composé X2, les corrélations HMBC correspondant aux tâches les plus faibles sont attribuées à des corrélations ²J. Elles permettent d'attribuer les déplacements chimiques des différents carbones dans les deux cycles aromatiques (Figures 5.12a).

La structure ainsi décrite correspond à la 2-N-(4-hydroxy- γ -glutamyl)-7-hydroxy-8-méthoxy-3H-phénoxazin-3-one^{xvi}. L'attribution des signaux enregistrés est présentée dans la Figure 5.11 et le Tableau 5.3. Les corrélations expérimentales ne permettent pas de résoudre l'attribution des carbones aux déplacements δ_c 127,8 130,7 et 146,3 ppm dans le cycle A (en gris sur la Figure 5.11).

xvi. Le groupement γ -glutamyl correspond au dérivé acylé en position 5 de l'acide glutamique.

Comme dans le cas du composé X2, la cristallisation du composé X1 pourrait permettre de réaliser de la SC-DRX pour confirmer la structure proposée et également de résoudre la stéréochimie des carbones C-2' et C-4'. Cependant, nous n'avons pas pu réaliser ces expériences à ce jour, car nous n'avons pas trouvé les conditions permettant de cristalliser le composé.

2.3 Bilan intermédiaire : structure des molécules isolées

Ainsi, les structures que nous proposons pour les composés X1 et X2 sont présentées dans la Figure 5.14.

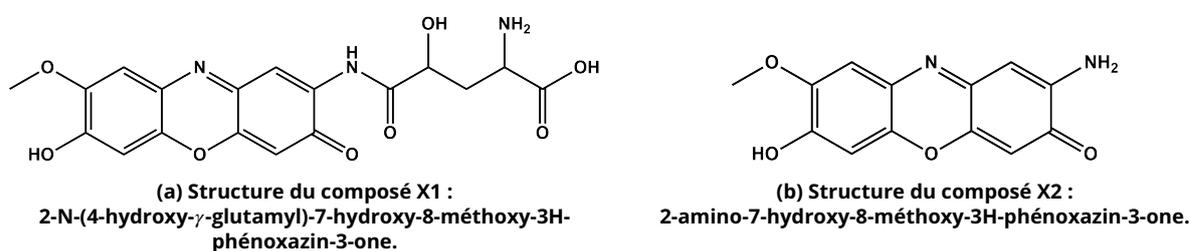


Figure 5.14 – Structures des composés X1 et X2 purifiés

À l'issue des analyses en spectrométrie de masse et RMN, un doute persiste toutefois quant à la position relative des groupements OH et OCH₃ sur le cœur phénoxazin-3-one pour le composé X2^{xvii}. Seule la DRX pourrait permettre de trancher sans ambiguïté.

Compte tenu de l'évolution de la composition de l'extrait de *Justicia spicigera* mentionnée précédemment dans le Chapitre 3 (partie 3) où l'on a pu constater que l'augmentation de la quantité de X2 était liée à la diminution de celle de X1, nous avons fait l'hypothèse de la proximité structurale de ces deux composés. Ainsi, il nous a paru plus probable que la position relative des substituants OH et OCH₃ sur le cycle C du cœur phénoxazin-3-one soit identique pour ces deux composés.

Dans le cas des formules proposées, la disparition du composé X1 dans la composition de l'extrait de *Justicia spicigera* au profit du composé X2 s'expliquerait par une hydrolyse de la liaison amide, probablement catalysée par des enzymes pouvant être présentes dans l'extrait.

xvii. Contrairement au composé X1 pour lequel des corrélations supplémentaires avec les atomes du groupement γ -glutamyl observées en ROESY, nous ont permis de proposer une structure moléculaire avec des substitutions en C-7 et C-8 respectivement pour l'hydroxy et le méthoxy, sans trop de doutes possibles.

Dans la partie suivante, nous allons évaluer la cohérence des formules structurales proposées pour les composés X1 et X2 grâce à l'analyse des données obtenues pour les deux composés par les techniques de spectroscopies électroniques et vibrationnelles. Les données recueillies permettront par ailleurs de constituer l'« identité spectrale » de ces composés, utile à des fins d'identifications ultérieures par la communauté.

3 Synthèse des caractéristiques spectrales des composés X1 et X2 purifiés

Les caractéristiques obtenues pour les composés X1 et X2 par les spectroscopies électroniques et vibrationnelles sont détaillées dans cette partie.

3.1 Absorption et émission de fluorescence UV-Vis

Nous avons pu mettre en évidence précédemment la variation des spectres d'absorption des composés X1 et X2 sous l'influence du pH (Chapitre 3, Figure 3.9). Les spectres ayant été obtenus lors des expériences en HPLC-DAD, nous étions limités aux valeurs de pH des phases mobiles testées. Ainsi, des gammes de pH ont été réalisées afin d'obtenir leurs spectres électroniques sur une large plage de valeurs.

Les gammes obtenues pour les composés X1 et X2 sont montrées dans la Figure 5.15.

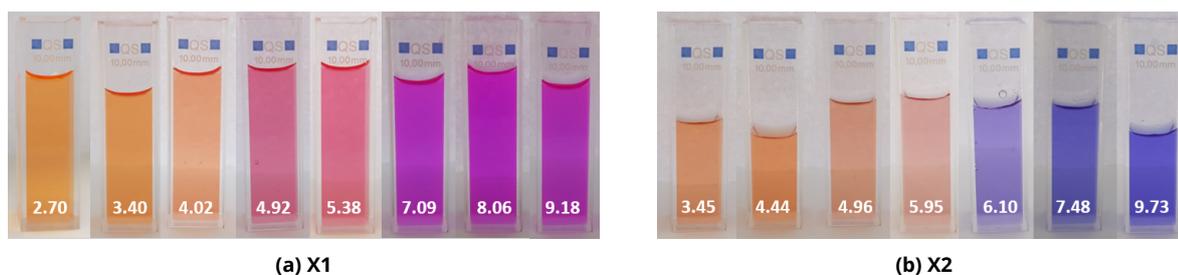
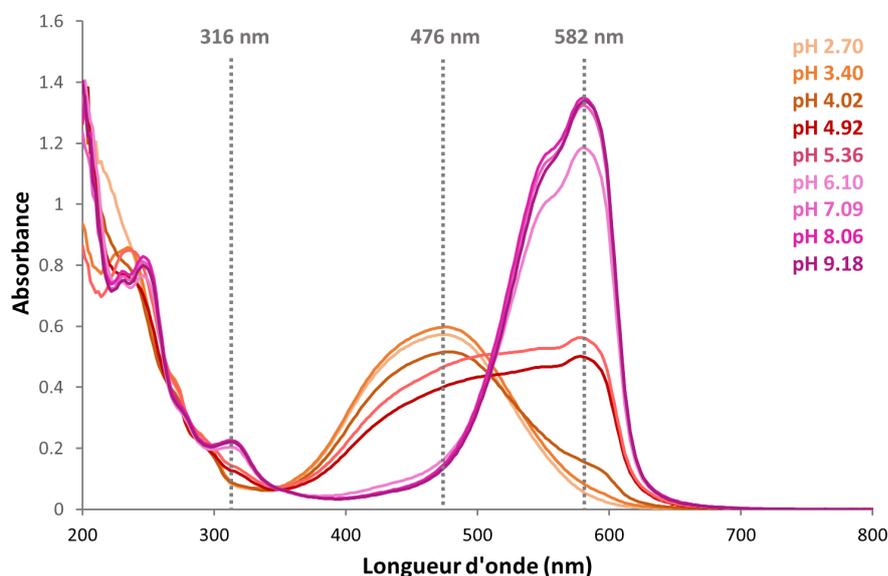


Figure 5.15 – Gamme de pH pour les composés X1 et X2.

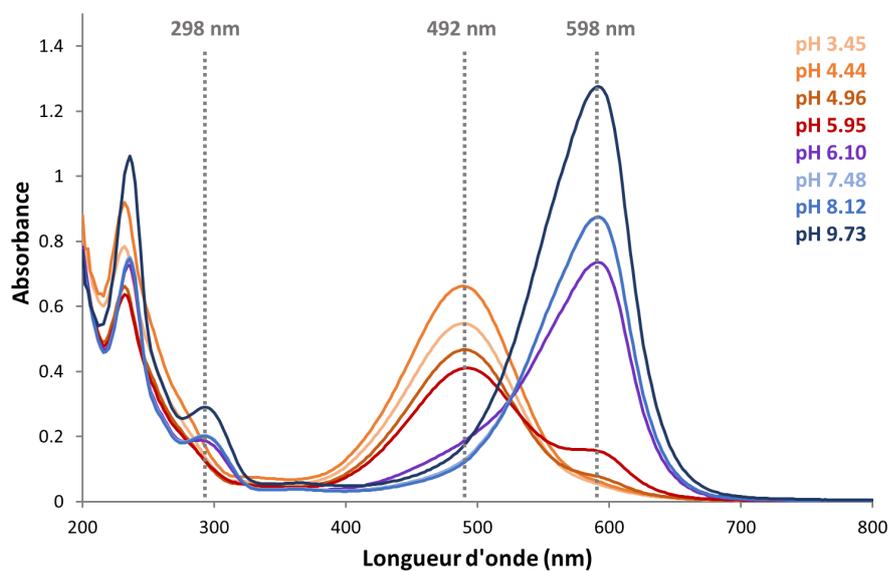
Les deux composés présentent une couleur orangée dans des conditions acides. Le composé X1 vire au rouge pour des pH aux alentours de 5 puis au rose vif pour des pH supérieurs à 7. Le composé X2 a quant à lui une coloration bleue pour des pH supérieurs à 6.

3.1.1 Absorption UV-Vis

Les spectres d'absorption des composés X1 et X2 ont été enregistrés pour les différentes valeurs de pH de ces gammes (Figures 5.16a et 5.16b).



(a) Composé X1



(b) Composé X2

Figure 5.16 – Spectres d'absorption UV-Vis des composés X1 et X2 à différentes valeurs de pH.

Dans des conditions acides, les composés X1 et X2 présentent des maxima d'absorption dans le visible, centrés respectivement à 476 nm et 492 nm. Pour les deux composés, un déplacement bathochrome est observé lors de l'augmentation du pH, avec des maxima à 582 nm (avec un épaulement vers 550 nm) pour X1 et 598 nm pour X2, pour des pH supérieurs à 7. Cela suggère l'existence d'au moins deux états

d'ionisation de ces composés. Pour le composé X1, la forme des spectres obtenu à des pH aux alentours de 5 laisse présager l'existence d'une troisième forme.

Les valeurs de pH de virage ont été estimées en traçant les valeurs d'absorbance aux maxima d'absorption des formes déprotonées ^{xviii} de X1 et X2, respectivement à 582 nm et 598 nm, en fonction du pH (Figure 5.17).

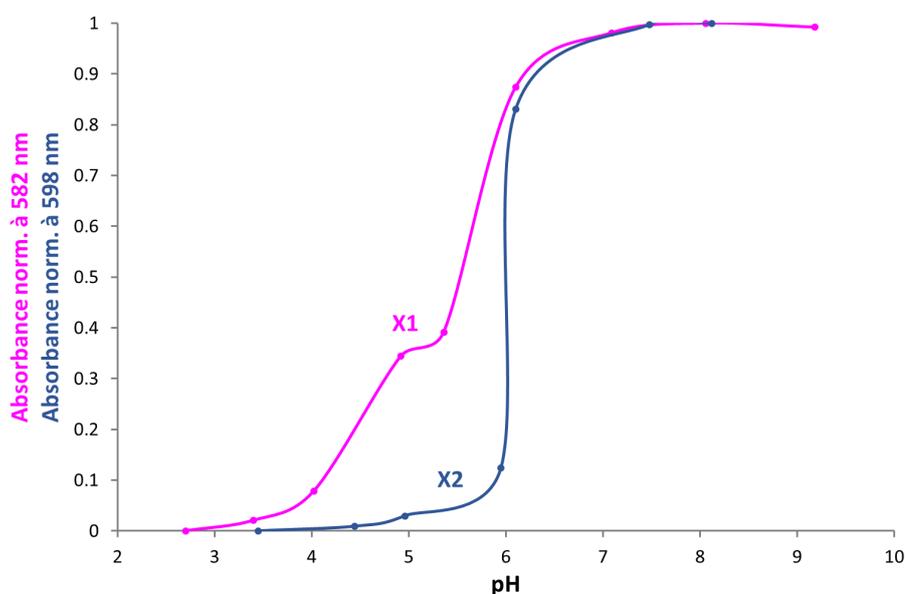


Figure 5.17 – Absorbance normalisée à λ_{max} des composés X1 et X2 en fonction de la valeur du pH.

Un point de virage pour une valeur de pH vers 6 peut être identifié pour X2. Pour le composé X1, deux points de virage semblent être présents : un premier vers une valeur de pH de 4,4 et un second vers 5,6. Ces valeurs pourraient être estimées plus précisément en augmentant le nombre de points dans les gammes de pH.

À partir des structures des composés X1 et X2, nous avons cherché à proposer les formes prédominantes dans les différentes zones de pH identifiées.

Pour le composé X2, deux sites acido-basiques sont identifiés : les groupement hydroxyle OH, acide et le groupement amino NH_2 , basique. En découle l'équilibre acido-basique du composé X2 présenté dans la Figure 5.18. La forme protonée cationique (1) subit une première déprotonation via la perte d'un proton du groupe amino chargé pour donner le composé neutre (2). Une seconde déprotonation donne la forme déprotonée anionique (3) avec la fonction phénolate.

^{xviii}. D'après le comportement de rétention des composés en HPLC aux différentes valeurs de pH de la phase mobile (observé dans les Chapitres 3 et 4), nous nous attendons à des composés acides, déprotonés pour les pH les plus élevés.

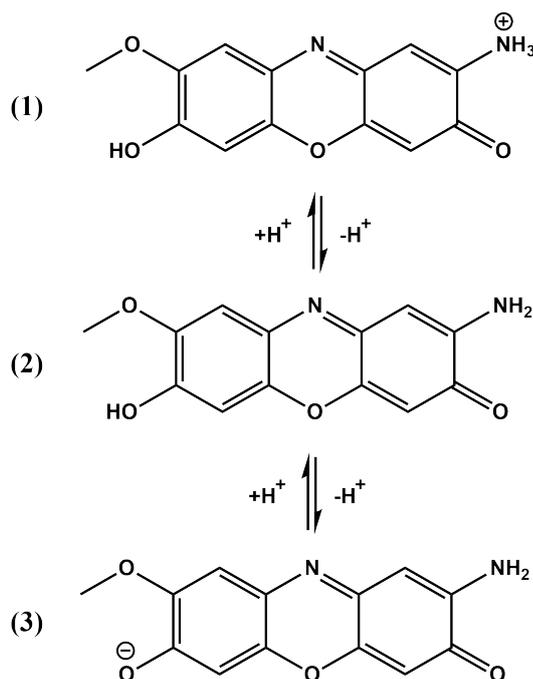


Figure 5.18 – Équilibre acido-basique pour le composé X2.

Pour le composé X1, nous identifions les mêmes sites acido-basiques que pour X2 liés au cœur amino-hydroxy-phénoxazin-3-one (à savoir, les groupements hydroxyle OH et amino NH) ainsi que des sites liés à la chaîne dérivée d'acide aminé (un groupement hydroxyle, un groupement amino NH_2 et un acide carboxylique COOH). Les alcools aliphatiques sont très peu acides, nous avons fait ici l'hypothèse que le groupement hydroxyle n'était pas impliqué dans l'équilibre acido-basique dans la gamme de pH étudiée. Les acides aminés sont caractérisés par la présence des deux groupements ionisables COOH et NH_2 . Pour l'acide glutamique, les valeurs de leurs pK sont respectivement de 2,2 et 9,7. En considérant des valeurs semblables pour le dérivé γ -glutamyl, pour des pH acides, la forme prédominante serait donc assimilée à $\text{NH}_3^+\text{-CHR-COOH}$; pour des pH entre 2,2 et 9,7 on trouverait une forme $\text{NH}_3^+\text{-CHR-COO}^-$ et enfin dans des conditions basiques, il s'agirait de $\text{NH}_2\text{-CHR-COO}^-$. En s'inspirant de la valeur de déprotonation du groupement phénol pour le composé X2 aux alentours de 6, nous envisageons qu'elle ait lieu pour le composé X1 avant la déprotonation du groupement amino de la chaîne dérivée d'acide aminé. Les différents équilibres suggérés pour le composé X1 sont présentés dans la Figure 5.19.

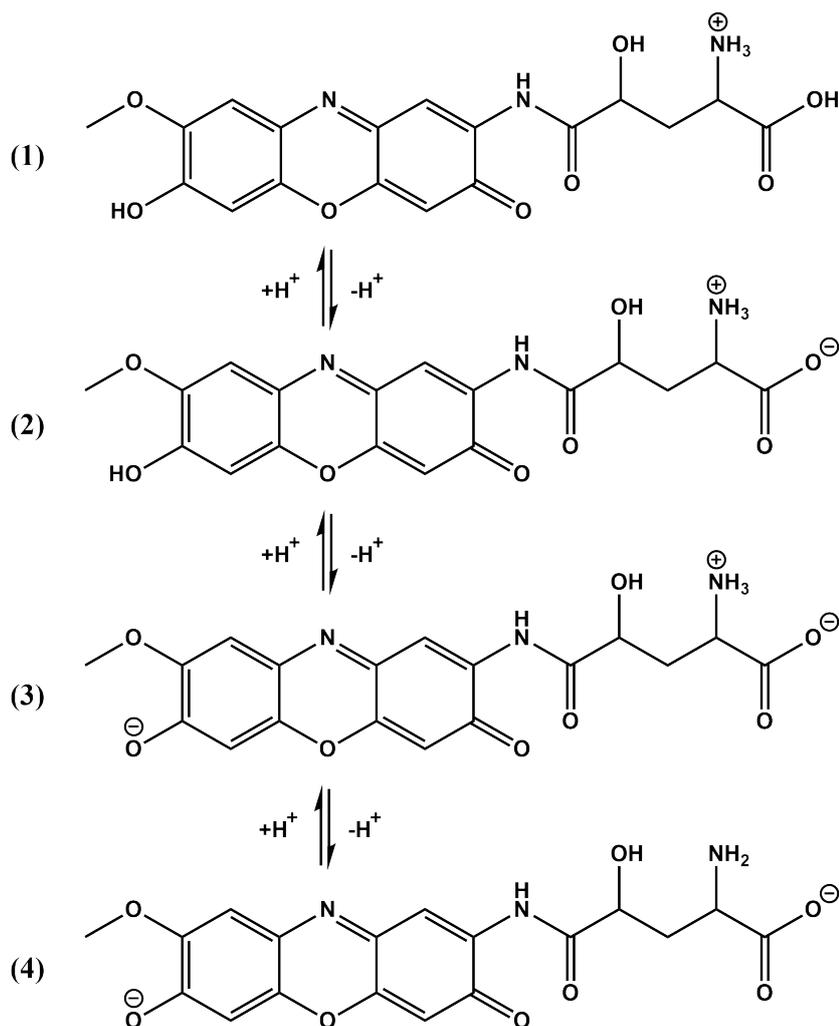


Figure 5.19 – Équilibre acido-basique pour le composé X1.

Dans les analyses menées en chromatographie en phase liquide, nous avons pu constater que la rétention des composés X1 et X2 diminuait lorsque l'on augmentait le pH de 3 à 8. Or, en RPLC, les formes chargées sont moins retenues, car plus polaires que les formes neutres [Dolan, 2017].

Nous pouvons ainsi en déduire que nous étions en présence des formes anioniques, forme (4) du composé X1 et forme (3) du composé X2 en HPLC à pH 8 et en présence des formes neutres, formes (2) de X1 et de X2 à pH 3. La forme (3) du composé X1 est probablement responsable de la coloration rouge observée en solution aux alentours de pH 5 (Figure 5.15a). N'ayant pas testé de pH intermédiaires de phase mobile entre pH 3 et pH 8, nous ne l'avons pas observé en HPLC. *A priori* dans les diverses expériences menées, nous n'avons pas été amenés à rencontrer les formes protonées cationiques (1) de X1 et de X2.

3. Synthèse des caractéristiques spectrales des composés X1 et X2 purifiés

Nous avons ensuite cherché à comparer les propriétés d'absorption obtenues pour les composés X1 et X2 à celles d'autres composés de la famille des phénoxazin-3-ones.

Musso et ses collaborateurs ont notamment analysé de façon approfondie les dérivés de phénoxazin-3-one dans le cadre de l'élucidation structurale des molécules colorantes de l'orseille [Musso et Matthies, 1957, Musso et Beecken, 1961, Musso et Döpp, 1966, Musso *et al.*, 1967]. Nous nous sommes appuyés sur certains résultats liés à l'absorption UV-Vis de ces composés pour les comparer avec les composés X1 et X2.

Dans le méthanol, la phénoxazin-3-one, non substituée, présente un maximum d'absorption dans le visible autour de 445 nm, quelles que soient les conditions du milieu (en présence de HCl ou KOH) (Tableau 5.4).

Tableau 5.4 – Bandes d'absorption dans le visible de plusieurs dérivés de phénoxazin-3-one d'après [Musso et Matthies, 1957, Musso et Beecken, 1961, Musso et Döpp, 1966].

Composé	C-2	C-7	C-8	λ_{\max} (nm)		
				MeOH	0,2 n HCl	0,2 n KOH
Phénoxazin-3-one	H	H	H	442-447	-	-
2-amino-phénoxazin-3-one	NH ₂	H	H	430-434	460-465	430
2-hydroxy-phénoxazin-3-one	OH	H	H	403-404	398-400	434
7-hydroxy-phénoxazin-3-one	H	OH	H	476-480	507-508	574
8-hydroxy-phénoxazin-3-one	H	H	OH	512	-	610

Lorsqu'elle est substituée par des groupements auxochromes acido-basiques, hydroxyle ou amino, des variations de longueur d'onde du maximum d'absorption en fonction des conditions du milieu sont observées. Cela est dû à l'existence de formes protonée ou déprotonée.

La position de ces substituants auxochromes a une grande influence sur la longueur d'onde des maxima d'absorption obtenus. On note que dans le cas où ces substituants sont positionnés en C-2 (2-hydroxy-phénoxazin-3-one par exemple), les maxima d'absorption restent dans une gamme proche de celle observée pour la phénoxazin-3-one non substituée. *A contrario*, si le groupement hydroxyle est substitué en position C-7 (7-hydroxy-phénoxazin-3-one), le maximum d'absorption subit un décalage vers des longueurs d'onde supérieures par rapport à celles observées pour la 2-hydroxy-phénoxazin-3-one, quelles que soient les conditions du milieu.

Ainsi, la forme neutre de la 7-hydroxy-phénoxazin-3-one présente une coloration rouge-orange (λ_{max} 480 nm). En conditions alcalines, pour la forme anionique déprotonée, violette, il existe deux structures ioniques avec une résonance de charge complète à travers le cœur phénoxazin-3-one (Figure 5.20a), expliquant le décalage bathochromique important (λ_{max} 575 nm). Lors de l'ajout d'acide dilué, la protonation de l'azote induisant un léger décalage bathochromique, la forme est rouge (λ_{max} 510 nm) [Musso et Matthies, 1957].

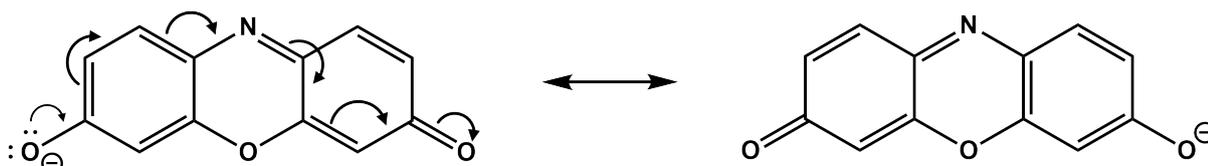


Figure 5.20 - Structures de résonance de la 7-hydroxy-phénoxazin-3-one dans sa forme déprotonée anionique.

Dans le cas où le groupement OH est substitué en position C-8 (8-hydroxy-phénoxazin-3-one), les longueurs d'onde des maxima sont encore supérieures avec une bande d'absorption à 510 nm dans des conditions neutres et une bande d'absorption à 610 nm dans des conditions basiques [Musso et Döpp, 1966].

Ainsi, les couleurs et les propriétés d'absorption observées pour les composés X1 et X2 sont cohérentes avec celles attendues pour des phénoxazones substituées par un groupement hydroxyle en position C-7 ou C-8.

L'exploitation de ces propriétés ne permet toutefois pas de favoriser une option plutôt qu'une autre quant à la position relation des groupements hydroxy et méthoxy en C-7 et C-8 dans la structure des composés X1 et X2.

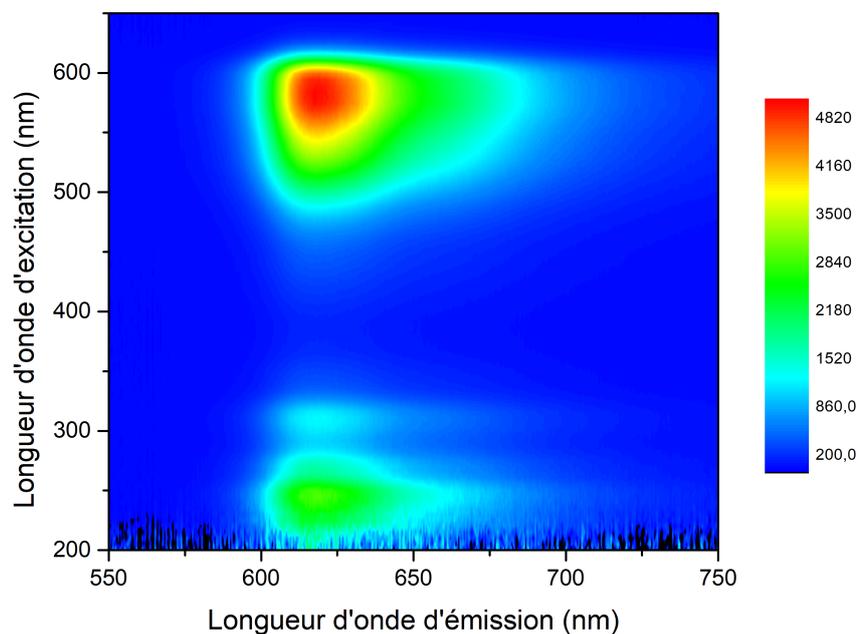
3.1.2 Fluorescence

Les spectres de fluorescence 3D (matrices d'excitation/émission) ont été enregistrés pour les solutions de X1 et X2 aux alentours de pH 7 (Figure 5.21).

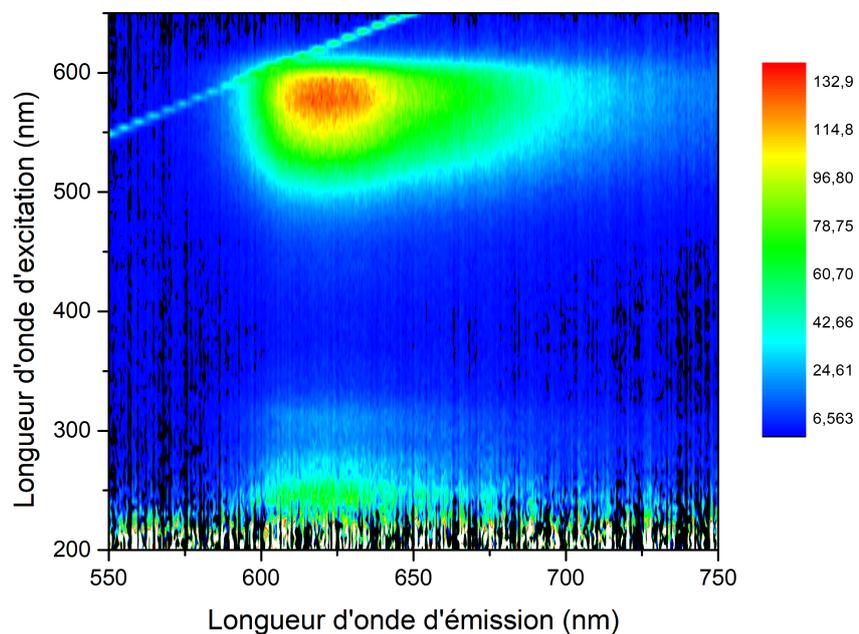
Nous pouvons noter une grande différence dans l'intensité de fluorescence des deux composés : l'intensité de fluorescence est environ 40 fois plus importante pour le composé X1 que pour le composé X2 ^{xix}.

Pour les deux composés, le maximum d'émission est centré autour de 620 nm. On distingue deux maxima d'excitation : le premier dans le visible vers 575 nm, à l'origine de l'émission la plus intense et le second vers 250 nm.

xix. Résultant en un spectre de fluorescence 3D bien plus bruité pour le composé X2 (Figure 5.21b).



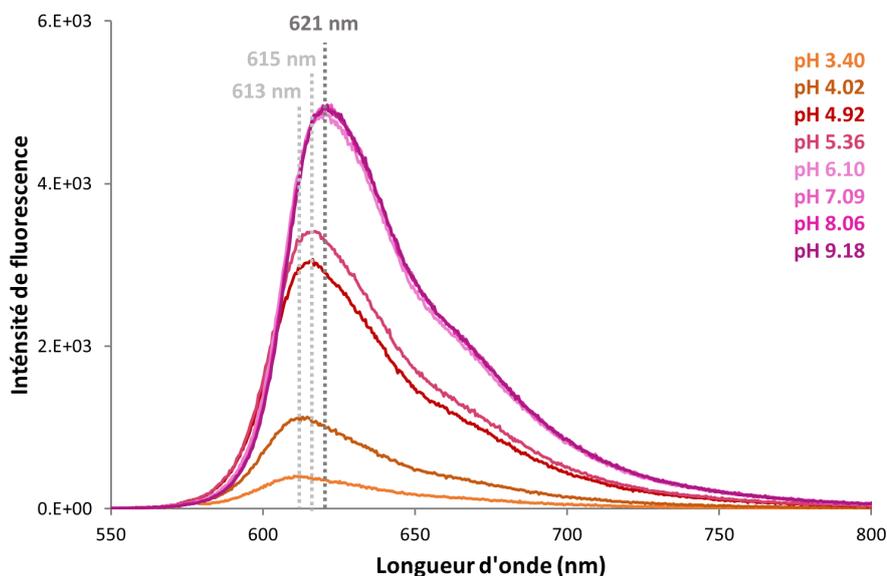
(a) Composé X1



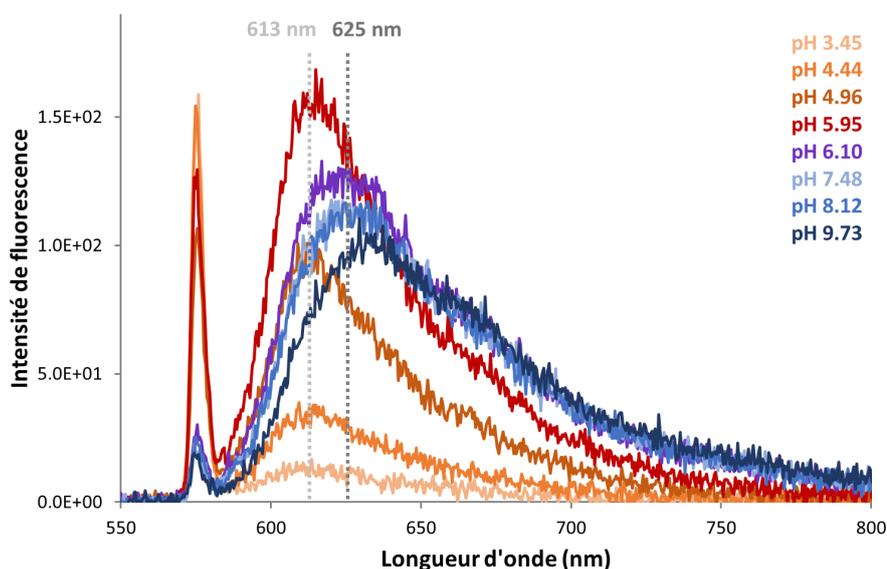
(b) Composé X2

Figure 5.21 – Spectres de fluorescence 3D (matrices d'excitation/émission) des solutions à pH 7.

Les spectres d'émission de fluorescence de X1 et X2 ont ensuite été enregistrés en solution pour les mêmes gammes de pH que pour les spectres d'absorption (partie précédente 3.1.1) pour une longueur d'onde d'excitation de 575 nm, correspondant au maximum d'excitation. Ils sont présentés dans les Figures 5.22a et 5.22b respectivement pour X1 et X2.



(a) Composé X1



(b) Composé X2

Figure 5.22 – Spectre d'émission de fluorescence UV-Vis selon le pH. Longueur d'onde excitatrice 575 nm.

Pour le composé X1, l'émission de fluorescence est sensible à la variation de pH. Pour des valeurs de pH supérieures à 6, la fluorescence est la plus intense et est centrée autour de 620 nm. Pour des pH intermédiaires autour de 5, l'intensité de fluorescence

est plus faible et centrée autour de 615 nm et enfin dans des conditions acides, l'intensité de la fluorescence est la plus faible.

Pour le composé X2, seules de faibles variations de l'intensité de la fluorescence sont notées pour les différentes conditions de pH. Comme pour X1, le maximum d'émission est centré autour de 625 nm pour les pH supérieurs à 6 et autour de 613 nm pour les pH inférieurs.

Le décalage du maximum d'émission selon le pH peut s'expliquer par un phénomène d'auto-absorption (ou effet de filtre interne). Il a lieu lorsque la longueur d'onde d'excitation est très proche de la longueur d'onde du maximum d'absorption de la solution et résulte en une atténuation de l'intensité de fluorescence ainsi qu'un possible décalage en longueur d'onde [Kumar Panigrahi et Kumar Mishra, 2019]. Ainsi, dans notre cas, pour des pH supérieurs à 6 (correspondant à des λ_{max} d'absorption autour de 590 nm), les intensités de fluorescence sont sous-estimées et décalés d'une dizaine de nm vers les longueurs d'onde supérieures. Une correction de l'effet de filtre interne a mis en évidence un maximum d'émission réel centré autour de 613 nm pour les composés X1 et X2 quelles que soient les valeurs de pH (exemple pour X1 dans l'Annexe O, Figure O.1).

Les composés de la famille des phénoxazin-3-ones, comme les dérivés 7-hydroxylés, sont connus pour leur intense émission de fluorescence et sont d'ailleurs utilisés pour le développement de sondes fluorescentes en biologie [Tian *et al.*, 2021].

La plus courante, la *réSORufine* (7-hydroxy-phénoxazin-3-one) présente dans sa forme anionique un maximum d'émission centrée à 585 nm (rendement quantique de 0,74) pour une excitation à 570 nm. Aucune fluorescence n'est détectée pour ce composé pour des pH acides [Bueno *et al.*, 2002].

L'orseille, mélange colorant composé de dérivés de 7-hydroxy et 7-amino-phénoxazin-3-ones, présente en solution une émission de fluorescence centrée à 595 nm (pour une λ_{ex} à 520 nm), indépendante du pH (pour des valeurs allant de pH 2 à pH 13) [Clementi *et al.*, 2006].

L'intense émission de fluorescence pour les formes déprotonées anioniques des 7-hydroxy (ou 7-amino)-phénoxazin-3-ones, s'explique par une délocalisation électronique à travers tout le cœur phénoxazin-3-one (Figure 5.23a). En effet, pour ces formes déprotonées anioniques, les formes de résonances sont symétriques; elles ont donc toutes les deux une contribution équivalente dans l'hybride de résonance. La délocalisation électronique est ainsi favorisée.

A contrario, pour les formes neutres, la structure non chargée (à gauche dans la Figure 5.23b) est privilégiée, car plus stable et est donc majoritaire par rapport à la

forme avec une séparation de charges (à droite dans la Figure 5.23b). En raison de la non-symétrie des formes de résonances limites, la délocalisation électronique est moindre et la fluorescence en est atténuée.

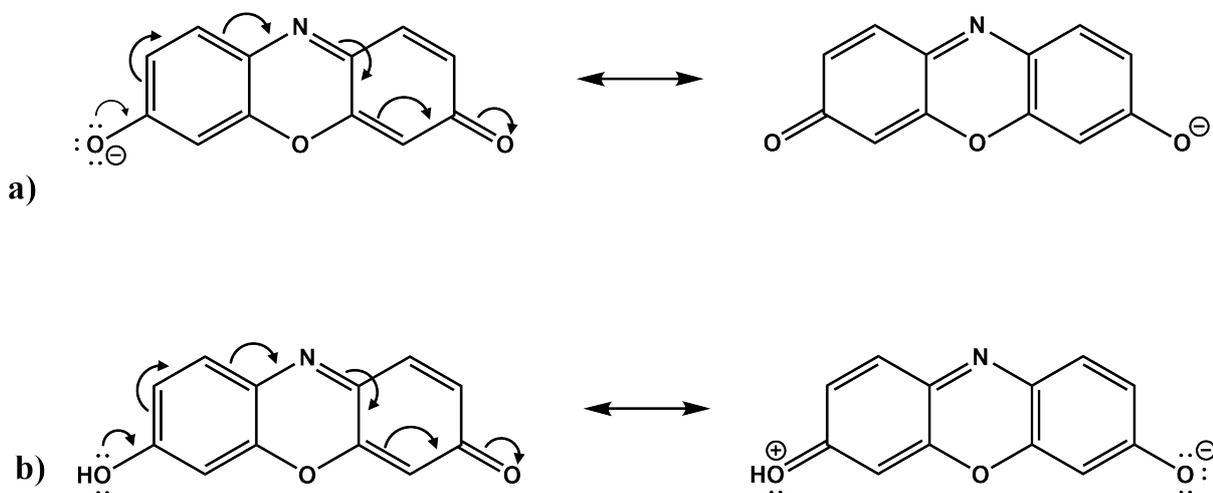


Figure 5.23 - Résonances de la forme (a) déprotonée anionique et (b) neutre de la 7-hydroxy-3H-phénoxazin-3-one

Nous retrouvons bien ici le comportement observé pour le composé X1 pour lequel la forme déprotonée pour les pH les plus élevés présente une fluorescence plus importante que la forme neutre à bas pH.

En revanche, nous n'avons pas d'explication à la différence d'intensité de fluorescence entre les composés X1 et X2. Au regard de leurs structures moléculaires, nous nous attendrions à ce qu'il présente une fluorescence d'intensité similaire.

Par ailleurs, [Musso et Döpp, 1966] remarquent que contrairement aux 7-hydroxy-phénoxazin-3-ones, les dérivés de 8-hydroxy-phénoxazin-3-ones ne fluorescent pas, en solution (MeOH) ou sur plaque CCM.

Cela peut à nouveau s'expliquer par une délocalisation non totale à travers le cœur phénoxazin-3-one. La forme de résonance à gauche étant majoritaire par rapport à l'autre, car plus stable avec la charge négative sur l'atome le plus électro-négatif (Figure 5.24).

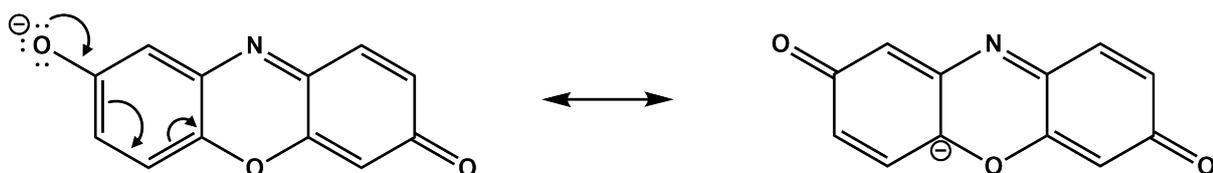


Figure 5.24 - Formes de résonance de la forme anionique de la 8-hydroxy-phénoxazin-3-one

La faible fluorescence enregistrée pour le composé X2 pourrait ainsi s'expliquer par la présence du groupement hydroxyle en position en C-8 plutôt qu'en C-7, contrairement à ce que nous avons proposé à l'issue de la partie 2.

Néanmoins, à notre connaissance, il s'agit de la seule étude menée sur des dérivés de 8-hydroxy-phénoxazin-3-one. Aucun détail sur les conditions dans lesquelles la fluorescence a été observée ni aucun spectre n'ont été communiqués dans cette publication. Il serait souhaitable d'avoir plus de données concernant ce type de composés pour considérer l'explication de la faible fluorescence de X2 par la position de l'hydroxyle en C-8 comme satisfaisante. Par ailleurs, aucun standard de 8-hydroxy-phénoxazin-3-one n'est disponible pour réaliser des comparaisons directes.

On peut également citer l'approche adoptée pour le développement de sondes de fluorescence à partir de la *réSORufine* (7-hydroxy-phénoxazin-3-one) consistant à substituer l'hydrogène du groupement 7-hydroxy par un groupement protecteur R pour obtenir un composé non fluorescent. Les réactions spécifiques permettant la déprotection du groupement sont ensuite détectées par l'apparition de la fluorescence caractéristique de la *réSORufine* [Tian *et al.*, 2021].

Ainsi la présence du groupement méthoxy en position C-7 et non en C-8 dans le composé X2, à l'inverse de notre proposition, pourrait également expliquer la différence de fluorescence entre les composés X1 et X2.

Bilan intermédiaire Les spectres d'absorption et de fluorescence UV-Vis obtenus pour les composés X1 et X2 sont cohérents avec des structures de dérivés hydroxylés de phénoxazin-3-one.

La présence de l'hydroxyle en position C-7 permet l'existence de formes mésomères symétriques pour les formes anioniques déprotonées (Figure 5.25) expliquant le décalage bathochromique du maximum d'absorption dans le visible par rapport aux formes neutres (de 475-490 nm à 580-590 nm). La délocalisation électronique ainsi permise pour les valeurs de pH supérieures à 6 est également à l'origine de l'intense émission de fluorescence enregistrée pour le composé X1.

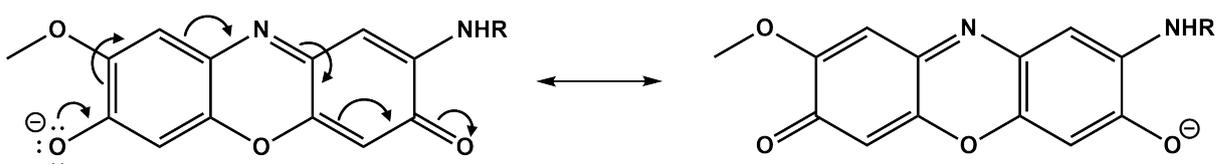


Figure 5.25 – Résonances des formes déprotonées anioniques de la 2-amino-7-hydroxy-8-méthoxy-3H-phénoxazin-3-one (R = H) et de la 2-N-(4-hydroxy- γ -glutamyl)-7-hydroxy-8-méthoxy-3H-phénoxazin-3-one (R = 4-hydroxy- γ -glutamyl).

La différence de fluorescence entre X1 et X2 pourrait s'expliquer par une inversion des substituants hydroxyle et méthoxy des positions C-7 et C-8 entre les deux composés. Les groupements méthoxy et hydroxyle respectivement en position C-8 et C-7 ne permettent pas une délocalisation électronique à travers les cycles et expliqueraient l'atténuation de la fluorescence observée pour le composé X2. Cette hypothèse va cependant à l'encontre des résultats obtenus en RMN. À ce stade, nous ne sommes pas en mesure de départager les deux options possibles.

La simulation de spectres d'absorption et de fluorescence UV-Vis serait un outil pertinent pour confronter les résultats attendus pour les structures moléculaires suggérées pour les composés X1 et X2 et les résultats expérimentaux. Envisager le calcul avec les deux positions possibles pour les groupements hydroxyle et méthoxy pour le composé X2 pourrait permettre d'évaluer si l'une des possibilités est plus cohérente avec les données spectrales acquises expérimentalement. Ces expériences ont été entreprises, mais les résultats ne sont pas encore exploitables.

3.2 Diffusion Raman

Les spectres Raman des composés purifiés X1 et X2 sous forme de poudre ont été enregistrés (Figure 5.26).

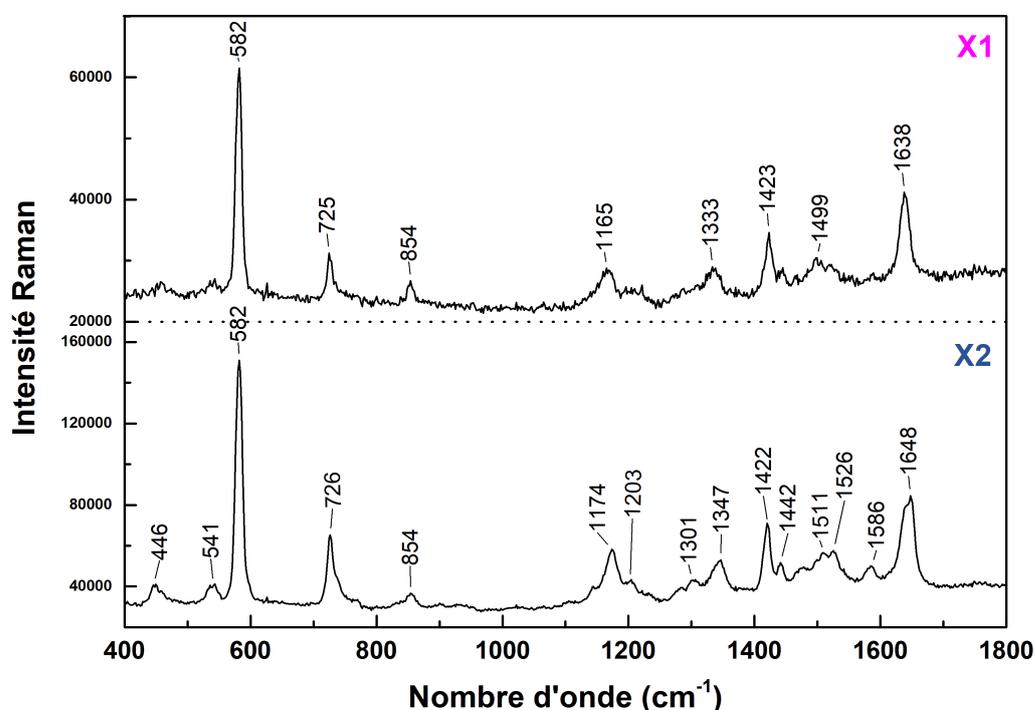


Figure 5.26 – Spectres Raman des composés X1 (en haut) et X2 (en bas) purifiés. Laser 532 nm. Soustraction de la ligne de base.

3. Synthèse des caractéristiques spectrales des composés X1 et X2 purifiés

L'intensité Raman est plus importante pour le composé X2 que pour le composé X1, mais les deux composés présentent des spectres Raman très similaires avec des bandes principales à 582, 725, 854, 1422 et environ 1640 cm^{-1} . Cela montre que le substituant 4-hydroxy- γ -glutamyl présent dans le composé X1 a peu d'influence sur le signal Raman enregistré. Il est ainsi *a priori* dominé par la signature du cœur phénoxazin-3-one commun aux deux composés.

Pour vérifier cette hypothèse et tenter d'attribuer les différentes bandes présentes dans le spectre, nous avons fait l'acquisition de trois standards de molécules appartenant à la famille des phénoxazin-3-ones et présentant des substitutions communes aux composés X1 et X2 : la résorufine (7-hydroxy-3H-phénoxazin-3-one, Figure 5.27a), l'éther méthylique de résorufine (7-méthoxy-3H-phénoxazin-3-one, Figure 5.27b) et la questiomycine A (2-amino-3H-phénoxazin-3-one, Figure 5.27c).

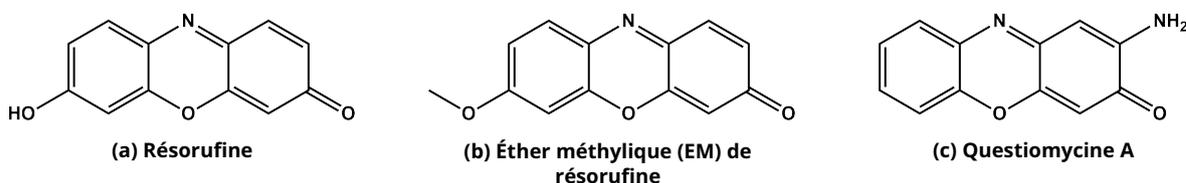


Figure 5.27 – Standards commerciaux de la famille des phénoxazin-3-ones.

Les spectres Raman obtenus de ces références sous forme de poudre sont présentés en Figure 5.28).

Contrairement à ce que nous attendions, les spectres Raman obtenus pour les trois dérivés de phénoxazin-3-ones sont loin d'être semblables. Si l'on retrouve des bandes en commun, les bandes les plus intenses varient entre les composés. Les intensités relatives des autres bandes sont très variables.

On peut ainsi faire l'hypothèse que pour les phénoxazin-3-ones, le type et la position des substituants directement liés aux cycles aromatique ou quinoïde ont une grande influence sur les bandes observées en Raman. En revanche, la substitution de l'amine primaire de X2 en amine secondaire pour X1 ne semble pas affecter le spectre.

On retrouve tout de même pour les trois phénoxazin-3-ones de référence et les composés X1 et X2 une bande commune vers 1650-1640 cm^{-1} , attribuable à la liaison C=O.

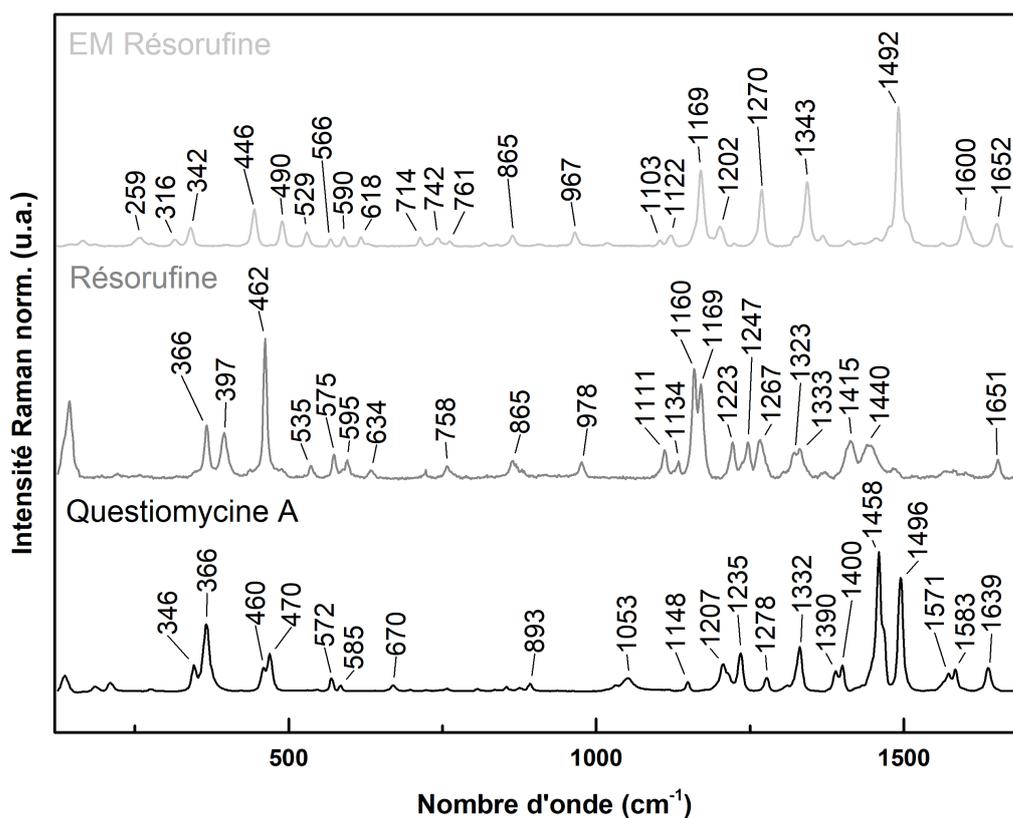


Figure 5.28 – Spectres Raman de standards de la famille des phénoxazin-3-ones. Laser 785 nm. Soustraction de la ligne de base.

Par ailleurs, entre 1000 et 1700 cm⁻¹, on note une certaine proximité entre les spectres Raman des composés X1 et X2 et les spectres de l'orseille^{xx} [Doherty *et al.*, 2014, Calà *et al.*, 2019]. Les bandes communes sont attribuées dans le Tableau 5.5 selon la proposition faite par [Doherty *et al.*, 2014]. Elles correspondent pour la plupart aux liaisons impliquées dans le cœur phénoxazin-3-one.

Les spectres Raman obtenus pour les composés X1 et X2 sont donc apparus comme assez difficiles à exploiter : l'attribution des bandes enregistrées au regard de la structure des composés n'est pas évidente, et ce malgré l'utilisation de standards de composés avec des structures similaires.

Il serait pertinent de pouvoir réaliser des simulations de spectres Raman pour les structures proposées pour les composés X1 et X2 et les comparer aux spectres expérimentaux. Ceci permettrait de valider les formules proposées. Il n'a cependant pas été possible de mettre en place ces expériences au cours de ce travail de thèse.

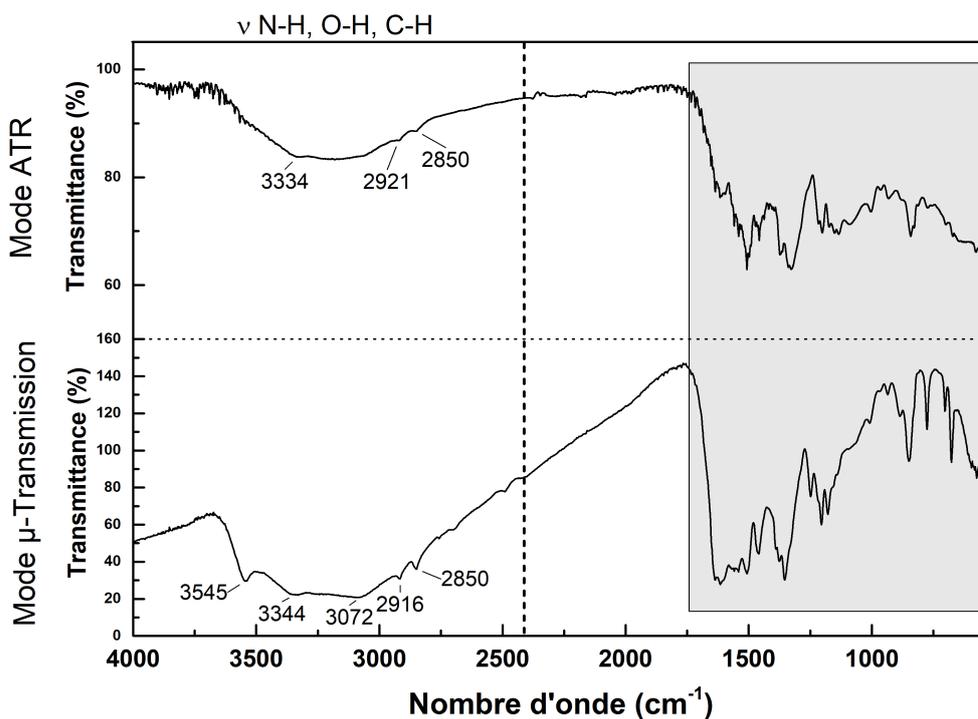
xx. Pour rappel, l'orseille est un mélange de plusieurs molécules de la famille des phénoxazones et non un standard pur d'un unique composé.

Tableau 5.5 – Principales bandes Raman (en cm^{-1}) obtenues pour les composés X1 et X2 et leurs attributions grâce à la comparaison avec un spectre d'orseille [Doherty *et al.*, 2014].
Intensité des bandes : w = faible (*weak*), m = moyenne (*medium*), s = forte (*strong*), vs = très forte (*very strong*). Forme des bandes : br = large (*broad*), d = doublet.
 ν = élongation (*stretching*), δ = déformation de pliage (*bending*), arom. = aromatique.

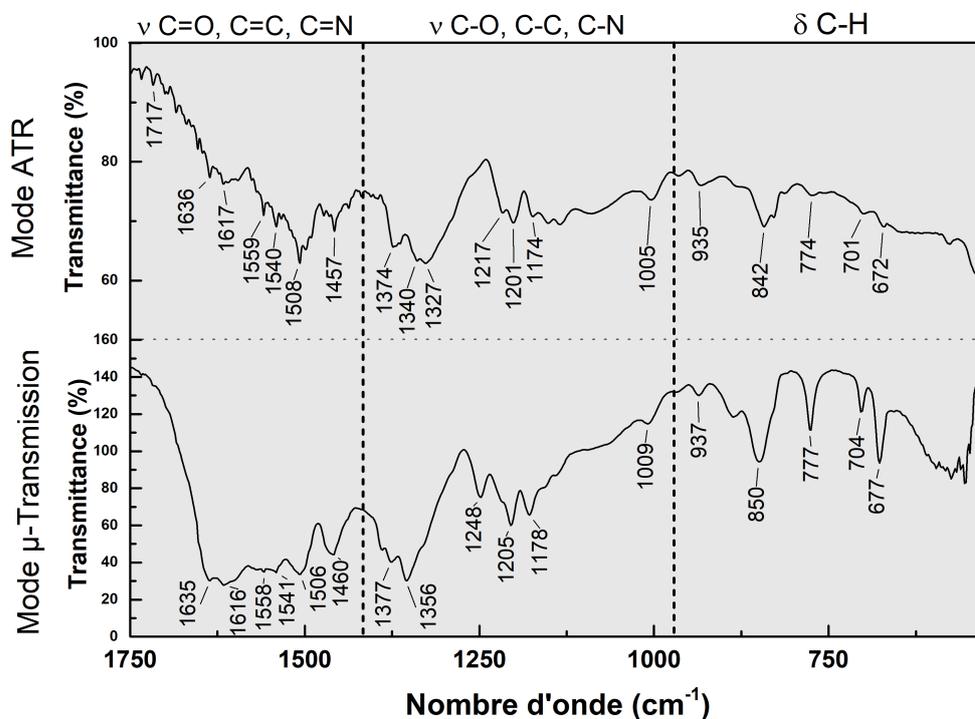
X2	X1	Orseille (SERS)	Attributions
450 w	w		
543 w	w		
582 vs	582 vs		
726 br, s	725		
854 w	854 w	879 w	$\nu(\text{C-C})$
1174 m	1165	1187 s	$\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C-N})$
1205	br		
1305		1300 w	Élongation des cycles
1347	1338	1373 d, w	Élongation des cycles
1422	1423	1409 s	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$
1442	w		
1478		1488 m	$\delta(\text{OH})$, $\nu(\text{C=C})$
1511, 1526	1520	1512 w	$\nu(\text{C=C})$ arom.
1586	w	1558 m	$\nu(\text{C=C})$ arom.
1641 sh, 1648	1638 s	1637 vs	$\nu(\text{C=O})$, $\delta(\text{OH})$

3.3 Absorption infrarouge

Les spectres d'absorption infrarouge des composés X1 et X2 ont été enregistrés en mode réflexion totale atténuée (ATR) et en transmission (μT) (Figures 5.29 pour X1 et 5.30 pour X2).



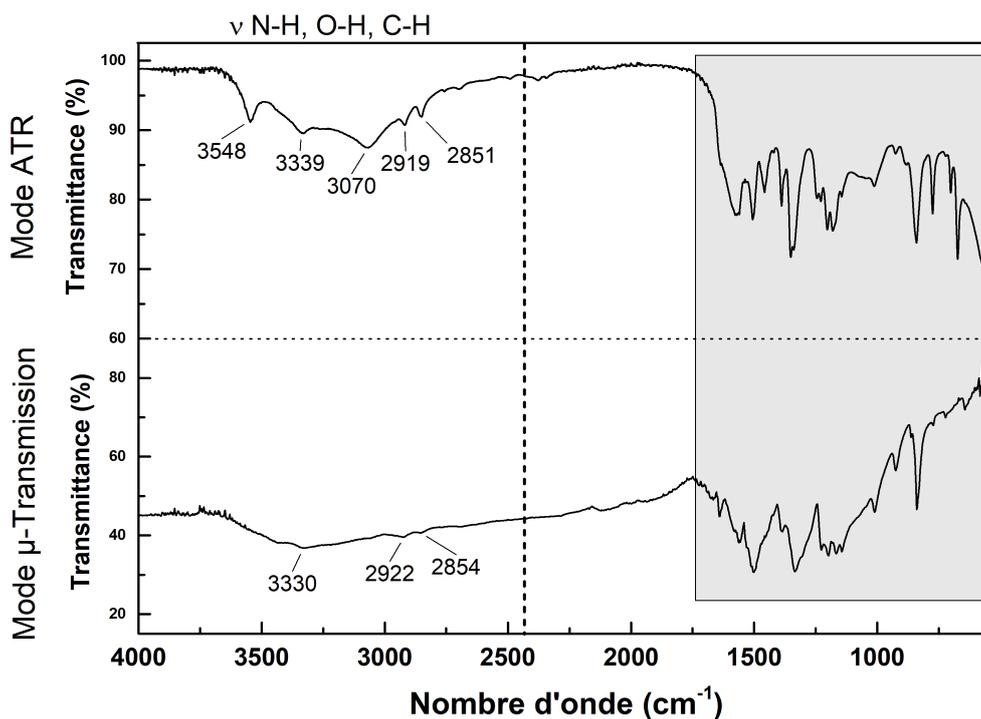
(a) Spectres d'absorption infrarouge en mode ATR (en haut) et micro-transmission (en bas) du composé X1.



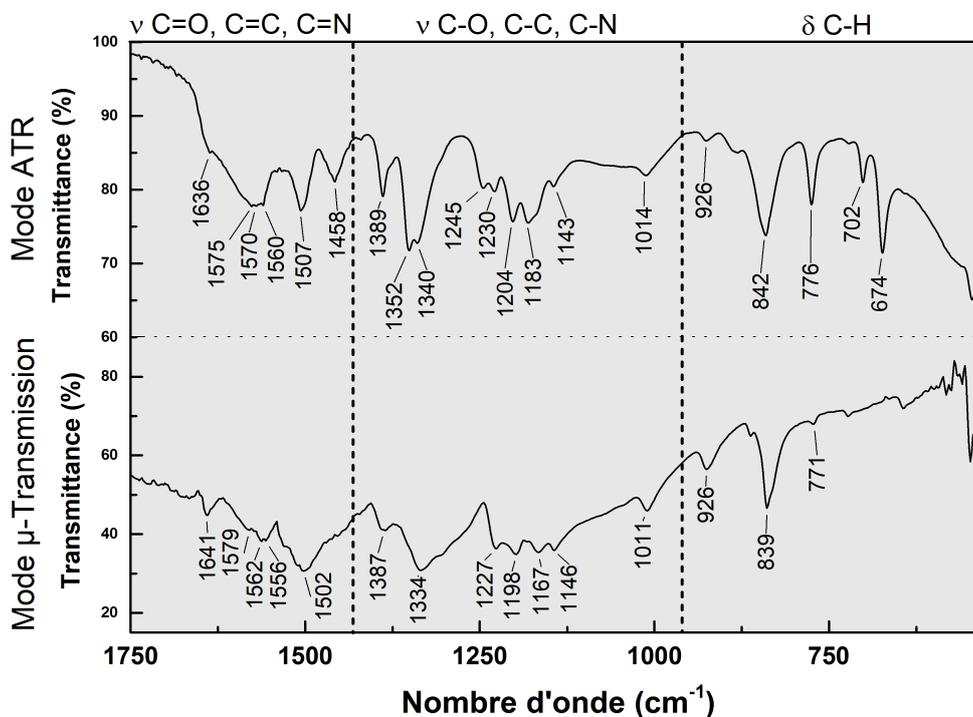
(b) Spectres d'absorption infrarouge en mode ATR (en haut) et micro-transmission (en bas) du composé X1. Zoom entre 525 et 1750 cm^{-1}

Figure 5.29 – Spectres IR du composé X1.

3. Synthèse des caractéristiques spectrales des composés X1 et X2 purifiés



(a) Spectres d'absorption infrarouge en mode ATR (en haut) et micro-transmission (en bas) du composé X2.



(b) Spectres d'absorption infrarouge en mode ATR (en haut) et micro-transmission (en bas) du composé X2. Zoom entre 525 et 1750 cm^{-1}

Figure 5.30 - Spectres IR du composé X2.

Quel que soit le mode utilisé, nous avons rencontré des difficultés à obtenir des spectres de bonne qualité : l'absorption est faible (surtout en mode ATR), les bandes sont larges et il n'y a pas de retour à la ligne de base. Nous arrivons cependant à identifier des bandes caractéristiques des structures des phénoxazones.

Les principales vibrations caractéristiques du cœur phénoxazin-3-one sont attendues dans la zone 1500-1660 cm^{-1} , correspondant aux liaisons doubles conjuguées C=C, C=O et C=N [Musso et Döpp, 1966, Musso *et al.*, 1967, Afanas'eva *et al.*, 1971]. Elles ont été désignées dans ces travaux comme bandes 1 à 5 et sont rassemblées en annexe dans le Tableau P.1. À cause de l'effet de la conjugaison des multiples liaisons doubles, il est difficile d'isoler les vibrations liées à une liaison spécifique et l'attribution de ces bandes est ainsi assez hasardeuse [Afanas'eva *et al.*, 1971]. Peu de références récentes à ce sujet sont disponibles; seuls les travaux précédemment cités datant des années 1960 s'y sont intéressés précisément.

Sans chercher à attribuer précisément les bandes obtenues, nous avons retrouvé dans les spectres IR des composés X1 et X2 les diverses bandes 1 à 5 des liaisons doubles conjuguées caractéristiques du cœur phénoxazin-3-one.

La première bande a été détectée à 1640 cm^{-1} pour X2 et à 1635 cm^{-1} pour X1. La seconde bande n'a été détectée que pour le composé X1, à 1616 cm^{-1} . Dans la zone 1545-1595 cm^{-1} plusieurs bandes ont été enregistrées : à 1575, 1570 et 1560 cm^{-1} pour X2 et à 1559 et 1540 cm^{-1} pour X1. Enfin, une bande centrée à 1507 cm^{-1} pour X2 et 1508 cm^{-1} pour X1 a été détectée (Figures 5.30b et 5.29b, Tableau 5.6).

Pour les nombres d'onde inférieurs à 1450 cm^{-1} , on retrouve ensuite plusieurs zones où des bandes sont attendues et attribuées aux vibrations des liaisons C-C, C-N et C-O des cycles (bandes 6 à 10, Tableau P.1). En particulier, dans la zone entre 1150 et 1215 cm^{-1} , une ou deux bandes intenses (bandes 10) sont attribuées à l'étirement asymétrique C-O-C du cycle oxazine [Corbett, 1965, Stučka *et al.*, 1967].

Plusieurs bandes ont été détectées dans cette région pour les composés X1 et X2 : autour de 1380 cm^{-1} pour la bande 6, 1350 cm^{-1} , 1340 cm^{-1} et 1330 cm^{-1} pour les bandes 7, 1245 cm^{-1} pour la bande 8 et 1230 cm^{-1} pour la bande 9 (Figures 5.30b et 5.29b, Tableau 5.6). Pour l'élongation des liaisons C-O (bandes 10), deux bandes ont été détectées vers 1170 et 1200 cm^{-1} pour les deux composés (Figures 5.30b et 5.29b, Tableau 5.6).

Dans la région 900-650 cm^{-1} , les principales bandes sont associées aux déformations C-H hors du plan. La fréquence de vibrations dépend notamment du nombre

d'hydrogènes adjacents dans les cycles aromatique et quinoïde. Dans le cas d'hydrogènes isolés, les bandes sont attendues dans la zone 900-835 cm^{-1} [Corbett, 1965].

Pour les composés X1 et X2, les principales bandes ont été détectées à environ 930 cm^{-1} , 840 cm^{-1} , 775 cm^{-1} , 700 cm^{-1} et 675 cm^{-1} (Figures 5.30b et 5.29b, Tableau 5.6).

La bande d'élongation des C-H aromatiques est enregistrée entre 3020 et 3100 cm^{-1} [Corbett, 1965]. On l'a rencontrée à environ 3070 cm^{-1} pour X1 et X2. Pour les phénoxazin-3-ones substituées par des groupements méthyles, les bandes d'élongations (1 à 2 bandes faibles) des C-H aliphatiques sont rencontrées dans les zones 2955-2910 cm^{-1} et 2885-2850 cm^{-1} . Elles ont été détectées à 2920 et 2850 cm^{-1} pour X1 et X2, attribuées à la présence du groupement méthoxy (Figures 5.30a et 5.29a, Tableau 5.6).

Dans le cas des dérivés substitués par des groupements amine ou amide, les bandes d'élongation des liaisons N-H sont attendues dans la zone 3300-3450 cm^{-1} : deux bandes pour le NH_2 vers 3400 cm^{-1} et 3300 cm^{-1} et une bande pour le NH vers 3290 cm^{-1} [Corbett, 1965, Musso et Döpp, 1966]. Les dérivés hydroxylés présentent une bande d'élongation des liaisons O-H dans la région 3200-3300 cm^{-1} [Musso et Matthies, 1957, Corbett, 1965, Musso *et al.*, 1967].

Pour les composés X1 et X2, la bande observée à 3400 cm^{-1} peut donc être attribuée à l'élongation des liaisons N-H ou O-H (Figures 5.30a et 5.29a, Tableau 5.6).

La bande détectée vers 3550 cm^{-1} pour les deux composés X1 et X2 pourrait être attribuée aux liaisons O-H inter ou intramoléculaires^{xxi} [Socrates, 2010].

Dans le cas de la 2-acéto-phénoxazin-3-one, une bande supplémentaire dans la zone des élongations des liaisons doubles est attendue pour la liaison carbonyle de l'amide et elle est détectée aux alentours de 1700 cm^{-1} [Corbett, 1965, Musso et Döpp, 1966].

Pour le composé X1, on retrouve cette bande, malgré sa faible intensité, à 1717 cm^{-1} (Figure 5.29b).

xxi. Dans le cas général, pas spécifiquement pour des phénoxazones.

Tableau 5.6 – Principales bandes (en cm^{-1}) obtenues dans les spectres infrarouge des composés X1 et X2.

w = faible (*weak*), sh = épaulement (*shoulder*), br = large (*broad*), arom. = aromatique, al. = aliphatique.

Les bandes 1 à 10 font références aux bandes caractéristiques des phénoxazones définies par [Musso et Matthies, 1957, Corbett, 1965, Musso et al., 1967] (Détails en annexe Tableau P.1).

X2		X1		Attribution
ATR	μT	ATR	μT	
Déformations C-H				
674	-	671	677	
702	-	701	704	
776	771 w	774	777	
842	839	842	850 br	
926	926	935	937	
1014	1011	1005	1009	
1145	1144	-	-	
Élongations C-C, C-N, C-O				
1167, 1181 sh	1174	1178	1169	10
1204	1198	1201	1205	10
1230	1227	-	-	9
1245	-	-	1248	8
-	-	1327	1328 sh	7
1340	1334 br	1340	-	7
1352	1354 sh	-	1356 br	7
1389	1387	1374	1377	6
Élongations C=C, C=O, C=N				
1458	-	1457	1460 br	5
1507	1502 br	1508	1506 br	4
1560	1556	1559	1558	3
1570	1562	1569 sh	1569	3
1575	1579	-	-	3
-	-	1617	1616	2
1636 sh, w	1641	1636	1635	1
Élongations C-H, O-H, N-H				
2851	2854	2850	2850	ν C-H al.
2919	2922	2921	2916	ν C-H al.
3070	-	-	3072	ν C-H arom.
3339	3330	3334 w	3344	N-H ou O-H
3548	-	-	3546	O-H inter ou intramol.

Malgré la qualité contestable des spectres infrarouges obtenus pour les composés X1 et X2, il a été possible d'identifier les principales bandes caractéristiques du cœur phénoxazin-3-one ainsi que des substituants spécifiques à X1 et X2. Obtenir des spectres de meilleure qualité serait toutefois souhaitable pour avoir une empreinte spectrale plus fine, et permettre notamment une meilleure comparaison des composés X1 et X2.

Maintenant que nous avons une idée plus précise des réponses spectrales individuelles des composés X1 et X2, elles ont été comparées à celle de l'extrait de *Justicia spicigera* dans la partie qui suit.

4 Comparaison avec les signaux de l'extrait total

Les signaux obtenus par spectroscopie d'absorption et d'émission de fluorescence UV-Vis et de diffusion Raman pour les composés X1 et X2 ont été comparés avec ceux de l'extrait de *Justicia spicigera* précédemment détaillés dans le Chapitre 3.

4.1 Absorption et émission de fluorescence UV-Vis

Les spectres d'absorption UV-Vis en solution aqueuse des composés X1 et X2 (environ pH 7) ainsi que d'un extrait frais^{xxii} (pH 8) sont présentés dans la Figure 5.31.

Les maxima d'absorption des composés X1 et X2 détectés respectivement à 582 nm et 598 nm expliquent le maximum d'absorption détecté à 590 nm pour l'extrait de *Justicia spicigera*. L'épaulement vers 550 nm dans le spectre du composé X1 correspond à celui détecté pour l'extrait dans cette même gamme spectrale.

xxii. Pour rappel, par solution fraîche nous faisons référence à des solutions ayant subi des temps de repos courts, de quelques minutes à quelques heures, à l'échelle du temps des manipulations, en opposition à des solutions qui ont reposé une à plusieurs journées.

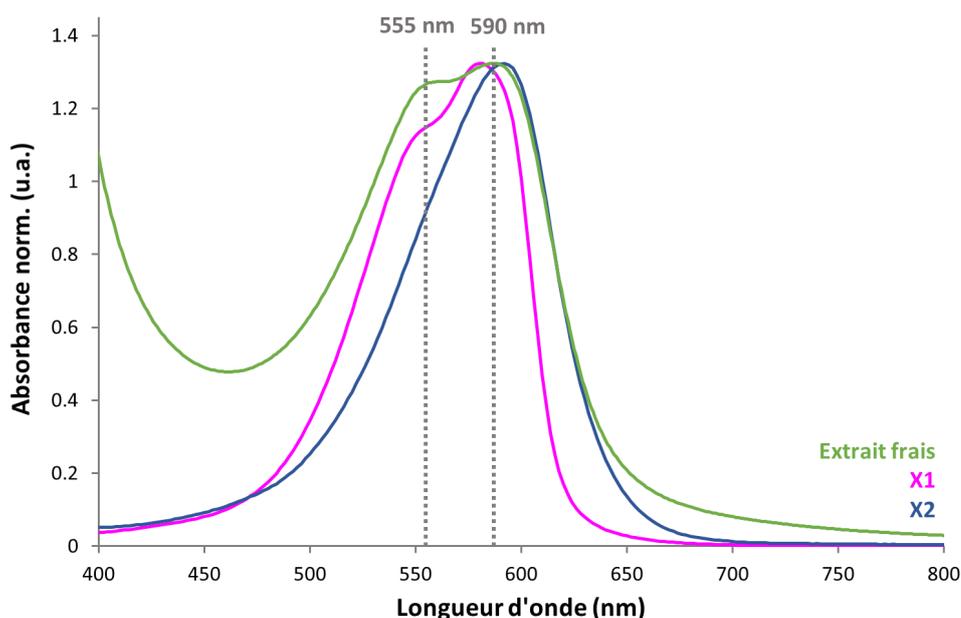


Figure 5.31 – Spectres d'absorption UV-Vis d'un extrait frais de *J. spicigera* (pH 8) et des composés X1 et X2 purifiés (pH 7).

Comme nous l'avons détaillé précédemment dans le Chapitre 3 (partie 3), les propriétés spectrales et la composition moléculaire de l'extrait de *Justicia spicigera* évolue selon son temps de repos. Si le composé X1 est majoritaire pour des temps très proches du début de l'extraction, sa concentration diminue ensuite au cours du temps, au profit du composé X2. La concentration de ce dernier finit également par décroître et après quelques heures, il n'est plus possible de détecter ces deux composés dans l'extrait. Divers composés colorés sont alors détectés avec des absorptions très faibles.

Ainsi, les spectres d'absorption UV-Vis obtenus des composés X1 et X2 purifiés permettent d'expliquer les variations de l'absorption UV-Vis de l'extrait de *Justicia spicigera* au début de l'évolution. L'épaulement autour de 550 nm et le maximum à 590 nm, caractéristiques des composés X1 et X2 sont bien définis pour des temps proches du début de l'extraction puis se confondent en un large pic centré autour de 565 nm (Chapitre 3, Figure 3.11) sous l'effet de leur disparition et de la présence de plusieurs composés responsables de l'absorption dans la gamme 550-600 nm.

Les composés X1 et X2 purifiés en solution ont ensuite été déposés sur support papier Whatman 1 afin de comparer leurs propriétés avec celles des dépôts l'extrait total du Chapitre 3 (partie 2.1.2).

Les photographies des échantillons correspondant éclairés sous UV sont présentés dans la Figure 5.32.



Figure 5.32 - Photographies des échantillons sur papier sous éclairage UV (Crime-lite® 2 UV λ_{\max} 365 nm)

Nous retrouvons la fluorescence rouge intense caractéristique de l'extrait de *Justicia spicigera* dans le dépôt du composé X1 (Figure 5.32b). Dans le cas du composé X2, l'émission est considérablement plus faible; seules des zones^{xxiii} apparaissent légèrement colorées en rouge sur la photographie (Figure 5.32c). Cette différence de fluorescence apparente est cohérente avec les résultats obtenus en solution pour les composés isolés dans la partie précédente (Figure 5.22).

Les spectres d'émission de fluorescence correspondant à ces dépôts ont été enregistrés (Figure 5.33).

Comme attendu, le composé X1 est majoritairement responsable de l'intense émission de fluorescence observée à 630 nm pour l'extrait frais de *Justicia spicigera*. Le composé X2 contribue également à la fluorescence globale détectée, même si son intensité est plus faible. On peut, par ailleurs, noter que l'intensité de son émission est du même ordre de grandeur que celle des dépôts de solution ayant subi des temps de repos plus longs, même si le composé X2 n'est *a priori* plus présent dans la solution au bout de 48 h.

xxiii. Correspondant aux coups de pinceaux lors de l'application sur support.

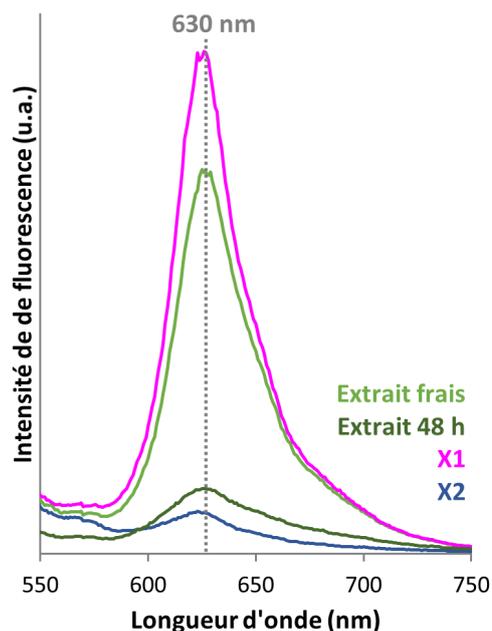


Figure 5.33 – Spectres d'émission de fluorescence de dépôts sur papier d'extraits de *Justicia spicigera* frais (vert clair) et ayant reposé 48 h (vert foncé) ainsi que des composés X1 (rose) et X2 (bleu) purifiés.
 λ_{ex} 250 nm.

La diminution de l'intensité de la fluorescence entre des dépôts de solution fraîche et de solution ayant subi un temps de repos plus long (Figure 5.33) s'explique donc par la disparition du composé X1 dans la solution au cours du temps de repos. Les composés formés dans la solution pour des temps de repos avancés doivent présenter des bandes d'émission de fluorescence moins intenses, comparables à celle du composé X2.

4.2 Diffusion Raman

Les spectres Raman des composés X1 et X2 purifiés ont été comparés à ceux de l'extrait de *Justicia spicigera* (Figure 5.34).

Nous avons pu mettre en évidence la bonne corrélation entre les bandes Raman de l'extrait de *Justicia spicigera* et celles des composés X1 et X2 purifiés.

Par ailleurs, la légère amélioration rapport signal/bruit observée entre les spectres Raman obtenus pour des solutions fraîches et des solutions avec un temps de repos plus long dans le Chapitre 3 (Figure 3.14) semble pouvoir être expliquée par la disparition de X1 dans l'extrait au cours du temps de repos. En effet, le signal Raman du composé X1 purifié est plus bruité et plus faible que celui du composé X2.

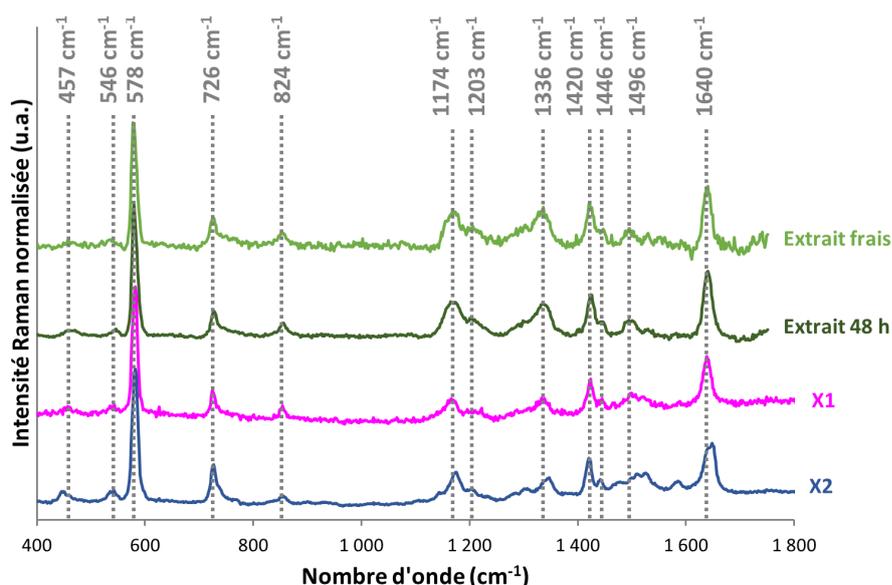


Figure 5.34 – Spectres Raman d’extraits de *Justicia spicigera* frais (vert clair) et ayant reposé 48 h (vert foncé) ainsi que des composés X1 (rose) et X2 (bleu) isolés. Laser 532 nm. Soustraction de la ligne de base.

Les deux composés contribuent donc à la signature spectrale (émission de fluorescence et Raman) caractéristique de l’extrait ayant permis son identification dans le *Codex Borbonicus*. Une comparaison plus fine permet de rapprocher les propriétés du composé X1 à des solutions d’extrait frais et celles de X2 à des solutions ayant subi un temps de repos plus long. L’évolution de la composition de ces deux composés colorés dans la solution au cours du temps permettrait ainsi *a priori* d’expliquer les différences spectrales observées (atténuation de la fluorescence et amélioration du rapport signal/bruit des spectres Raman).

Cependant, nous avons réussi à reproduire des couches picturales d’apparence semblable à celles du manuscrit qu’avec des solutions qui ont subi des temps de repos très avancés et pour lesquelles ni X1 ni X2 ne sont présents.

Il est donc peu probable que ce soit les signaux de ces deux composés que nous ayons détectés sur ces couches de peintures modèles. Nous pouvons émettre l’hypothèse que les composés minoritaires que nous avons détectés en HPLC-DAD pour des solutions avec des temps de repos avancés ou pour la poudre colorante^{xxiv} (Chapitre 3, parties 3.3 et 4.1) dérivent des composés X1 et X2 (famille des phénoxazones) et qu’ils génèrent donc des signaux d’émission de fluorescence et de Raman similaires.

xxiv. Résultant de l’évaporation de l’extrait coloré et ayant servi à la préparation des couches picturales modèles.

Comme déjà mentionné, il n'est toutefois pas à exclure que le mode de préparation des couches picturales du *Codex Borbonicus* soit différent de celui que nous avons pu en mettre en place au laboratoire et qu'il permette de conserver les composés X1 et X2 dans la matière colorante appliquée sur le manuscrit.

Par ailleurs, des essais complémentaires sur des extraits de *Peristrophe bivalvis*, dans lesquels nous avons pu identifier les composés X1 et X2 par HPLC-DAD-MS, ont mis en évidence un spectre Raman très proche de celui de *Justicia spicigera* (Figure 5.35) et ce, malgré leur différence de composition moléculaire. En effet, on ne retrouve par exemple pas de flavonols dans l'extrait de la plante vietnamienne *Peristrophe bivalvis* (Annexe L, Figure L.3). Le signal Raman de ces extraits semble donc bien dominé par le signal des phénoxazones.

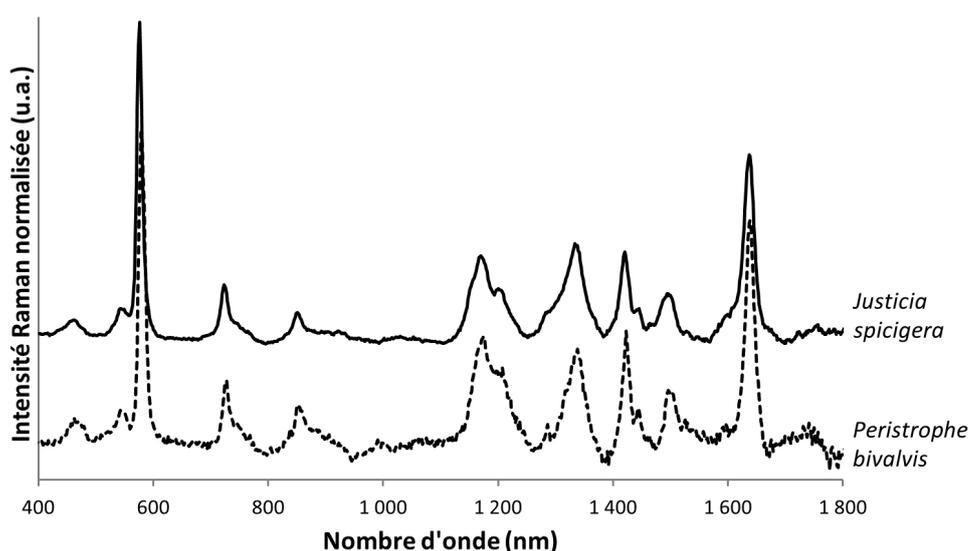


Figure 5.35 - Spectres Raman des extraits de *Justicia spicigera* et *Peristrophe bivalvis*. Laser 532 nm. Soustraction de la ligne de base.

5 Bilan du chapitre

L'élucidation structurale menée par spectrométrie de masse et RMN a permis de mettre en évidence que les deux composés X1 et X2 appartiennent à la famille des phénoxazin-3-ones. Le composé X1 est identifié comme la 2-N-(4-hydroxy- γ -glutamyl)-7-hydroxy-8-méthoxy-3H-phénoxazin-3-one et le composé X2 comme la 2-amino-7-hydroxy-8-méthoxy-3H-phénoxazin-3-one (Figure 5.36).

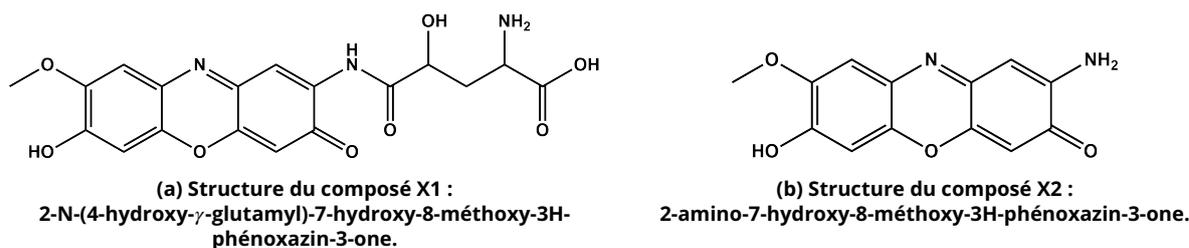


Figure 5.36 – Structures des composés X1 et X2.

Les ions fragments observés en spectrométrie de masse en tandem sont caractéristiques du cœur phénoxazin-3-one commun aux deux composés.

Les couleurs observées pour les composés en solutions à différentes valeurs de pH, ainsi que les absorptions UV-Vis correspondantes sont cohérentes avec celles d'autres phénoxazin-3-ones hydroxylées, comme la résorufine ou les dérivés **hydroxy-orcéines** de l'orseille. Pour les deux composés X1 et X2, les formes ioniques associées aux différentes conditions de pH ont été proposées; elles permettent d'expliquer les propriétés d'absorption observées.

L'intense émission de fluorescence de X1 coïncide également avec celle observée pour cette famille de composés.

Les principales bandes d'absorption infrarouge caractéristiques du cœur phénoxazin-3-one ont été identifiées dans les spectres infrarouges de X1 et X2. Des bandes témoignant de la substitution du cœur phénoxazin-3-one par des groupements hydroxy et amino ont également été repérées.

Des bandes communes à l'orseille ont été mises en évidence dans les spectres Raman des deux composés, ce qui cohérent le fait qu'ils possèdent un cœur commun au constituants de ce colorant.

Les données obtenues ne permettent cependant pas d'attribuer avec certitude la position relative des substituants hydroxyle et méthoxy pour le composé X2.

En effet, des données contradictoires ont été obtenues selon les expériences. Si les données RMN suggèrent une substitution de l'hydroxyle en position C-7, la faible

fluorescence enregistrée pour le composé X2, semblable aux observations faites pour la 8-hydroxy-phénoxazin-3-one laisse présager d'une attribution inverse.

Aucun standard correspondant à ces composés ne sont cependant disponibles pour départager ces deux possibilités.

Néanmoins, nous avons émis l'hypothèse que le composé X1 subit dans l'extrait une dégradation donnant le composé X2, au vu de l'évolution de leurs concentrations au cours du temps. Dans ce cas, il semble bien plus probable que les deux composés possèdent le même motif de substitution, à savoir le groupement hydroxyle en position C-7 et le méthoxy en C-8.

Afin de vérifier que les deux composés sont bien reliés l'un à l'autre, il serait souhaitable de tester si l'hydrolyse du composé X1 purifié permet d'obtenir le composé X2.

Par ailleurs, nous n'avons pas réussi, à ce jour, à cristalliser les deux composés afin de pouvoir mener des analyses de SC-DRX. Elles présenteraient pourtant une solution fiable pour préciser la position relative des groupements hydroxyle et méthoxy pour les deux composés X1 et X2 et également pour résoudre la stéréochimie des carbones asymétriques de la chaîne 4-hydroxy- γ -glutamyl de X1.

Le potentiel des simulations de propriétés spectrales (absorption et émission de fluorescence UV-Vis, diffusion Raman) serait à exploiter pour corréler les données expérimentales à celles prédites pour les structures proposées. Cela pourrait peut-être permettre de lever les doutes sur les positions relatives des groupements hydroxyle et méthoxy.

Enfin, si les propriétés des composés X1 et X2 sont en adéquation avec la signature spectrale (émission de fluorescence^{xxv} et diffusion Raman) des peintures brunes du *Codex Borbonicus*, les modes de préparation nous ayant permis d'obtenir des couches picturales d'apparences proches de celles du manuscrit de peintures ont nécessité des temps de repos de l'extrait de *Justicia spicigera* assez longs pour l'obtention du colorant en poudre. Or, d'après l'évolution de la composition moléculaire que nous avons pu mettre en évidence, les composés X1 et X2 ne sont pas présent dans la poudre colorante. Il est ainsi possible que les autres composés colorés présents dans l'extrait pour des temps de repos assez avancés génèrent des signaux d'émission de fluorescence et Raman similaires à ceux de X1 et X2. Cela est relativement probable car on peut supposer que ces composés dérivent des composés X1 et X2 et qu'ils soient donc probablement de la même famille, avec un cœur phénoxazin-3-one.

xxv. Même si, pour rappel, il est difficile de comparer les niveaux d'intensité de comme deux dispositifs distincts ont été utilisés et qu'il n'y a pas de calibration de l'intensité mesurée.

Il n'est également pas à exclure que le mode de préparation employé pour l'obtention des peintures du *Codex Borbonicus* soit différent de celui que nous avons mis en œuvre et qu'il permette de conserver les composés X1 et X2 dans la matière colorante appliquée sur le manuscrit. Cela serait cohérent avec les différences d'apparence observées entre les échantillons modèles réalisés en laboratoire et les couches picturales du *Codex Borbonicus* qui apparaissent légèrement plus « violettes » que nos essais de peinture, comme si la préparation du colorant permettait une meilleure conservation de la teinte de la solution.

Nous avons également pu mettre en évidence que les composés X1 et X2 ne sont pas spécifiques à l'espèce *Justicia spicigera*. Ils sont également rencontrés dans la composition d'une plante tinctoriale d'Asie, *Peristrophe bivalvis*. La signature spectrale associée à l'extrait coloré de *Justicia spicigera* n'est donc pas unique.

S'il y a peu de chance que *Peristrophe bivalvis* ait été utilisée pour l'obtention des couches picturales du *Codex Borbonicus* au vu de sa distribution géographique et du contexte de production du manuscrit, il est utile de rappeler que d'autres espèces de *Justicia* d'Amérique Centrale sont utilisées pour la production de colorants violets. Leurs molécules colorées n'étant pas caractérisées à l'heure actuelle, rien ne peut assurer que l'on ne retrouve pas les mêmes molécules dans leurs extraits. Il y aurait ainsi un réel intérêt à comparer leur composition à celle de *Justicia spicigera* et de rechercher des composés marqueurs spécifiques permettant de les différencier^{xxvi}.

xxvi. Et cela suscite notamment l'intérêt de l'équipe de recherche du *Centro de la investigacion en productos naturales* de l'Université du Costa Rica dans le cadre du projet « Décryptage de la couleur bleue de trois espèces du genre *Justicia* : *J. colorifera*, *J. macrantha* et *J. spicigera* ». Aucun résultat de leur étude n'est pour l'instant disponible.

Conclusion et perspectives

L'identification des colorants naturels dans les matériaux du patrimoine s'appuie le plus souvent sur des techniques spectroscopiques non-invasives, en raison des possibilités limitées de prélèvement. Elle s'effectue par comparaison des réponses spectrales enregistrées *in situ* sur les objets historiques et celles de matières colorantes de référence. Dans le cas de colorants dont la composition moléculaire n'est pas connue, de telles attributions doivent être considérées avec précaution, car il n'est pas garanti que les composés à l'origine des signatures spectrales soient spécifiques à une espèce biologique donnée.

Dans des travaux précédemment menés, la présence du colorant extrait de *Justicia spicigera* dans des peintures brunes du *Codex Borbonicus*, manuscrit Aztèque du 16^{ème} siècle, a été suggérée par comparaison des signatures spectrales d'émission de fluorescence et de diffusion Raman obtenues *in situ* à des spectres publiés dans la littérature. Ainsi, des analyses approfondies en laboratoire ont été nécessaires pour valider cette hypothétique identification. En effet, ce colorant a été très peu caractérisé et le manque de connaissances relatives à sa composition chimique n'a pas permis d'assurer que les réponses spectrales lui étaient spécifiques. Ce colorant bleu-violet est traditionnellement utilisé pour la teinture de textiles. Son identification dans un manuscrit mésoaméricain est à notre connaissance unique et aucune source historique ne relate son mode de préparation pour une utilisation en peinture, de surcroit pour des teintes brunes.

Les analyses détaillées du colorant de *Justicia spicigera* ont fait l'objet de cette thèse. Les principaux objectifs ont été d'identifier les composés à l'origine de la coloration de l'extrait de cette plante, d'évaluer leur spécificité à l'espèce végétale ainsi que leurs contributions aux signatures spectrales enregistrées *in situ* pour les peintures brunes du *Codex Borbonicus*. Le mode de préparation de peintures brunes à partir de l'extrait issu des feuilles de *Justicia spicigera* ainsi que leur stabilité à la lumière ont également été explorés afin de permettre l'identification non ambiguë de ce colorant dans des objets historiques.

Le colorant semble exister sous une forme incolore dans les feuilles de *Justicia spicigera* et leur macération dans de l'eau permet le développement de sa couleur. L'extrait obtenu présente une coloration bleu-violette, sensible aux variations de pH, ainsi qu'une intense émission de fluorescence rouge. Ses propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence le rapprochent d'autres colorants violets, l'orseille ou la teinture de tournesol (*litmus*), extraits de lichens. Les signatures spectrales des dépôts de cette solution sur un support papier coïncident avec celles enregistrées pour les peintures brunes du *Codex Borbonicus* dans lesquelles l'emploi du colorant de *Justicia spicigera* a été suggéré.

Des analyses chromatographiques ont mis en évidence la présence de deux composés majoritairement responsables de la coloration de l'extrait. L'exploitation préliminaire de leurs propriétés de rétention en HPLC, de leurs spectres d'absorption UV-Vis ou de leurs données de fragmentation en spectrométrie de masse à basse résolution n'a pas permis de les identifier précisément. Ainsi, leur purification a été envisagée afin de pouvoir réaliser leur élucidation structurale par spectroscopie RMN, spectroscopies vibrationnelles et spectrométrie de masse à haute résolution en infusion directe. L'obtention de ces composés purs a également permis d'évaluer leurs contributions aux signatures spectrales caractéristiques de l'extrait de *Justicia spicigera* et des peintures brunes du *Codex Borbonicus*.

Pour ce faire, une méthode de purification par chromatographie préparative en phase liquide a été mise en place. Dans un premier temps, la comparaison des performances obtenues pour plusieurs phases stationnaires C18 et plusieurs phases mobiles à l'échelle analytique a été effectuée. Cela a permis de montrer la nécessité de développer une méthode de séparation bidimensionnelle, afin d'assurer la pureté des composés cibles collectés. Le choix des conditions de séparation dans les deux dimensions s'est appuyé sur une évaluation combinée de l'orthogonalité et de la résolution. Le caractère ionisable des molécules colorées d'intérêt a permis de développer une séparation sur une même phase stationnaire en faisant uniquement intervenir un changement de pH de la phase mobile. Le transfert de la méthode analytique bidimensionnelle optimisée vers le système de chromatographie préparative a donné lieu à la purification des deux composés colorés. La simplicité et le coût modéré de la méthode développée en fait une option prometteuse pour la purification d'autres colorants hydrosolubles sensibles aux variations de pH.

L'analyse approfondie des composés purifiés par une approche multi-techniques employant les techniques spectroscopiques de RMN, d'absorption et d'émission de fluorescence UV-Vis et vibrationnelles (absorption infrarouge et diffusion Raman) ainsi

que la spectrométrie de masse à haute-résolution a permis d'établir leurs structures moléculaires. Ces deux composés appartiennent à la famille des phénoxazones, comme pour les principaux constituants de l'orseille. Ce sont des dérivés hydroxy-méthoxylés de la phénoxazin-3-one et leurs structures ne diffèrent que d'un groupement. L'un d'entre eux présente une substitution par une amine primaire alors que l'autre possède à la place un groupement amide, dérivé de l'acide 4-hydroxyglutamique.

Quelques incertitudes sur la structure de ces composés, notamment la position relative des groupements hydroxyle et méthoxy ou la stéréochimie des carbones asymétriques, mériteraient d'être levées par des analyses complémentaires en diffraction des rayons X sur mono-cristal ou par la simulation numérique des spectres associés aux structures moléculaires proposées via des approches de mécanique quantique.

Les signatures spectrales d'émission de fluorescence et de diffusion Raman des deux phénoxazones sont en adéquation avec celles détectées dans les peintures brunes du *Codex Borbonicus*, ce qui semblerait suggérer, de prime abord, qu'ils sont à l'origine des signaux ayant permis l'identification de *Justicia spicigera* dans le manuscrit.

Des couches picturales ont été confectionnées à partir du colorant extrait des feuilles *Justicia spicigera*. L'extrait coloré a été évaporé jusqu'à siccité donnant un colorant sous forme de poudre, plus adéquat à son utilisation en tant que peinture. Il a été mélangé dans des concentrations variées à deux liants végétaux, la gomme arabique et la colle d'amidon de maïs, et a été appliqué sur un support papier recouvert ou non d'une couche préparatoire au gypse. Des peintures brunes ont ainsi été obtenues, d'apparence proche de celles observées dans le *Codex Borbonicus*. Un vieillissement artificiel de ces peintures modèles a mis en évidence une sensibilité modérée à la lumière comparable à celle des peintures du manuscrit. Quels que soient le mode de préparation ou l'état de vieillissement des couches picturales, dans la mesure des conditions testées, les signaux caractéristiques d'émission de fluorescence et de diffusion Raman ont été détectés.

Comme mentionné précédemment, ces signaux pourraient être attribués aux deux phénoxazones identifiées de par la bonne corrélation des signatures spectrales enregistrées. Cependant, le mode de préparation des couches picturales d'apparence proche de celles des peintures du *Codex Borbonicus* implique un certain délai entre le début de l'extraction et l'obtention du colorant en poudre par évaporation. Or, nous avons pu mettre en évidence que l'extrait coloré était instable tant qu'il était en solution et que sa composition moléculaire évoluait au cours du temps. À l'échelle du temps nécessaire à l'évaporation de la solution colorée à température ambiante, les deux composés colorés caractérisés se sont révélés absents de la composition moléculaire du

colorant en poudre. En revanche, plusieurs composés présentant de faibles absorptions dans le visible y ont été détectés. Nous pouvons faire l'hypothèse qu'ils dérivent des deux phénoxazones majoritaires et possèdent le même cœur de structure. Ils pourraient alors être responsables des signaux d'émission de fluorescence et de diffusion Raman enregistrés dans les peintures modèles fabriquées en laboratoire, considérant qu'ils possèdent des signatures spectrales proches des composés dont ils sont issus. À l'avenir, une caractérisation plus approfondie de ces autres composés colorés serait ainsi souhaitable.

On ne peut toutefois pas écarter le fait qu'un mode de préparation du colorant différent de celui que nous avons adopté ait été mis en œuvre pour la réalisation des peintures brunes du *Codex Borbonicus*. Il pourrait notamment permettre la conservation des deux phénoxazones présentes initialement dans l'extrait, dans la matière colorante appliquée sur le manuscrit. Pour aller plus loin, il serait ainsi pertinent d'envisager d'autres modes d'extraction et de préparation du colorant extrait des feuilles de *Justicia spicigera* et d'évaluer leur influence sur les réponses spectrales et la composition moléculaire des peintures produites. Maintenant que la famille moléculaire du colorant de *Justicia spicigera* est connue, il serait intéressant de faire des rapprochements avec la préparation de l'orseille, présentant des constituants moléculaires proches et permettant l'obtention de rendus colorés très variés selon sa mise en œuvre. Son usage est plus répandu pour la fabrication de peintures et est mieux documenté, constituant une base sur laquelle s'appuyer pour de futures expériences.

Par ailleurs, les signatures spectrales associées à l'extrait coloré de *Justicia spicigera* ne lui sont pas spécifiques. Elles ont également été détectées pour une autre plante tinctoriale de la famille des Acanthacées d'origine asiatique, *Peristrophe bivalvis*, contenant les deux mêmes phénoxazones identifiées pour *Justicia spicigera*. Nous avons pu raisonnablement rejeter l'hypothèse qu'elle ait été utilisée pour l'obtention des couches picturales du *Codex Borbonicus* au vu de sa répartition géographique, limitée à l'Asie et du contexte de production du manuscrit en Mésoamérique. Néanmoins, d'autres espèces de *Justicia* sont utilisées en Amérique Centrale pour la production de colorants violets comme *Justicia tinctoriella* et *Justicia macrantha* et, à ce jour, leurs molécules colorées n'ont pas été caractérisées. Il n'est ainsi pas exclu qu'elles contiennent les mêmes composés colorés que *Justicia spicigera*. Il serait essentiel de comparer la composition moléculaire de ces différentes espèces. Dans le cas où elles partageraient des composés communs, la recherche de marqueurs spécifiques à chacune d'elle sera primordiale pour prétendre pouvoir les distinguer.

Des questions sur la formation des deux composés colorés identifiés à partir des précurseurs présents dans les feuilles de *Justicia spicigera* ou sur la compréhension de la décoloration du colorant face à une exposition à la lumière restent encore à explorer. Pour y répondre, l'approche devra être étendue pour permettre la recherche de composés qui peuvent être incolores (précurseurs ou produits de dégradation).

Malgré ces questions restant en suspens, l'ensemble des caractérisations moléculaires et spectrales réalisées dans le cadre de cette thèse constitue un socle de connaissances solides pour l'identification du colorant extrait de *Justicia spicigera* dans les objets du patrimoine culturel mésoaméricain.

Bibliographie

- [noa, a] Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales. www.cnrtl.fr, consulté le 01/01/2023.
- [noa, b] Global Biodiversity Information Facility. www.gbif.org.
- [noa, c] Natural Dye Textiles. www.coloresdelpueblo.com/collections/natural-dye-textures, consulté le 15/11/2022.
- [noa, d] Plants of the World Online. <https://powo.science.kew.org/>.
- [noa, e] Tz'utujil Guide : Using Plants as Natural Dyes. www.hiptipico.com/blogs/artisan-spotlights/natural-dyes, consulté le 15/11/2022.
- [noa, 2011] (2011). Colouring materials; classification according to coloristic and chemical aspects. Norme DIN 55944.
- [Abdelfattah, 2013] Abdelfattah, M. S. (2013). A new bioactive aminophenoxazinone alkaloid from a marine-derived actinomycete. *Natural Product Research*, 27(22):2126–2131.
- [Aceto *et al.*, 2017] Aceto, M., Calà, E., Agostino, A., Fenoglio, G., Idone, A., Porter, C. et Gulmini, M. (2017). On the identification of folium and orchil on illuminated manuscripts. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 171:461–469.
- [Afanas'eva *et al.*, 1971] Afanas'eva, G. B., Pashkevich, K. I. et Postovskii, I. Y. (1971). Chemistry of phenoxazines : II. Synthesis of benzo[c]phenoxazin-3-one and spectroscopic study of benzophenoxazinones. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 7(6): 691–694.
- [Akoka, 2022] Akoka, S. (2022). *Introduction à la résonance magnétique nucléaire*. Ellipses.
- [Alexander, 1937] Alexander, E. J. (1937). *Addisonia : colored illustrations and popular descriptions of plants*, volume 20. New York botanical garden édition.
- [Alonso-Castro *et al.*, 2012] Alonso-Castro, A. J., Ortiz-Sánchez, E., Domínguez, F., Arana-Argáez, V., Juárez-Vázquez, M. d. C., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., Gaspar-

- Ramírez, O., Espinosa-Reyes, G., López-Toledo, G., Ortiz-Andrade, R. et García-Carrancá, A. (2012). Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3):888–894.
- [Alvarez-Poblano *et al.*, 2020] Alvarez-Poblano, L., Roman-Guerrero, A., Vernon-Carter, E. et Alvarez-Ramirez, J. (2020). Exogenous addition of muicle (*Justicia spicigera* Schechtendal) extract to white maize tortillas affects the antioxidant activity, texture, color, and in vitro starch digestibility. *LWT*, 133:110120.
- [Alves *et al.*, 2018] Alves, F. C., Coqueiro, A., Março, P. H. et Valderrama, P. (2018). Evaluation of olive oils from the Mediterranean region by UV-Vis spectroscopy and Independent Component Analysis. *Food Chemistry*.
- [Anders *et al.*, 1991] Anders, F., Jansen, M. et Reyes García, L., éditeurs (1991). *El libro del ciuacoatl : homenaje para el año del Fuego Nuevo; libro explicativo del llamado Códice Borbónico; codex du Corps Législatif, Bibliothèque de l'Assemblée Nationale Française, Paris, Y 120*. Numéro 3 de Códices mexicanos. Akad. Dr.- und Verl.-Anst, Graz, 1. ed édition.
- [Anderson, 1963] Anderson, A. (1963). Materiales colorantes prehispanicos. *Estudios de Cultura Náhuatl*, 4(44):74–83.
- [Anyasor *et al.*, 2020] Anyasor, G. N., Moses, N. et Kale, O. (2020). Hepatoprotective and hematological effects of *Justicia secunda* Vahl leaves on carbon tetrachloride induced toxicity in rats. *Biotechnic & Histochemistry*, 95(5):349–359.
- [Aral et Rameshkumar, 2017] Aral, S. et Rameshkumar, K. B. (2017). Gamboge- The bark exudate from *Garcinia* species. *In Diversity of Garcinia species in the Western Ghats : Phytochemical Perspective*. Thiruvananthapuram, India, jntbgrí édition.
- [Arberet *et al.*, 2023] Arberet, L., Nowik, W., Michelin, A., Tchaplá, A., Andraud, C. et Héron, S. (2023). Methodology for dyes purification by preparative bidimensional offline reversed-phase high-performance liquid chromatography separation based on mobile phase pH change : Case study of *Justicia spicigera*. *Journal of Separation Science*, 46(5).
- [Arberet *et al.*, 2021] Arberet, L., Pottier, F. M., Nowik, W., Michelin, A., Bellot-Gurlet, L. et Andraud, C. (2021). Spectral characterisation of a traditional Mesoamerican dye : relationship between *in situ* identification on the 16th century *Codex Borbonicus* manuscript and composition of *Justicia spicigera* plant extract. *The Analyst*, 146:2520–2530.
- [Argueta *et al.*, 1994] Argueta, A., Gallardo Vázquez, M. C. et (Mexico), I. N. I., éditeurs (1994). *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*. Biblioteca de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México, D.F, 1. ed édition.

- [Aron *et al.*, 2020] Aron, A. T., Gentry, E. C., McPhail, K. L., Nothias, L.-F., Nothias-Esposito, M., Bouslimani, A., Petras, D., Gauglitz, J. M., Sikora, N., Vargas, F., van der Hooft, J. J. J., Ernst, M., Kang, K. B., Aceves, C. M., Caraballo-Rodríguez, A. M., Koester, I., Weldon, K. C., Bertrand, S., Roullier, C., Sun, K., Tehan, R. M., Boya P., C. A., Christian, M. H., Gutiérrez, M., Ulloa, A. M., Tejeda Mora, J. A., Mojica-Flores, R., Lakey-Beitia, J., Vásquez-Chaves, V., Zhang, Y., Calderón, A. I., Tayler, N., Keyzers, R. A., Tugizimana, F., Ndlovu, N., Aksenov, A. A., Jarmusch, A. K., Schmid, R., Truman, A. W., Bandeira, N., Wang, M. et Dorrestein, P. C. (2020). Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nature Protocols*, 15(6):1954–1991.
- [Awad *et al.*, 2015] Awad, N., Abdelkawy, M., Hamed, M., Souleman, A., Abdelrahman, E. et Ramadan, N. (2015). Antioxidant and hepatoprotective effects of *Justicia spicigera* ethyl acetate fraction and characterization of its anthocyanin content. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(8):91–96.
- [Ayele *et al.*, 2020] Ayele, M., Tesfaye, T., Alemu, D., Limeneh, M. et Sithole, B. (2020). Natural dyeing of cotton fabric with extracts from mango tree : A step towards sustainable dyeing. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 17:100293.
- [Azmir *et al.*, 2013] Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M., Ghafoor, K., Norulaini, N. et Omar, A. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials : A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4):426–436.
- [Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014] Baqueiro-Peña, I. et Guerrero-Beltrán, J. (2014). Uses of *Justicia spicigera* in medicine and as a source of pigments. *Functional Foods in Health and Disease*, 4(9):401–141.
- [Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2017] Baqueiro-Peña, I. et Guerrero-Beltrán, J. (2017). Physicochemical and antioxidant characterization of *Justicia spicigera*. *Food Chemistry*, 218:305–312.
- [Barbillat *et al.*, 1999] Barbillat, J., Bougeard, D., Buntinx, G., Delhaye, M., Dhamelin-court, P. et Fillaux, F. (1999). Spectrométrie Raman.
- [Beecken *et al.*, 2003] Beecken, H., Gottschalk, E.-M., v Gizycki, U., Krämer, H., Maassen, D., Matthies, H.-G., Musso, H., Rathjen, C. et Zdhorszky, U. (2003). Orcein and Litmus. *Biotechnic & Histochemistry*, 78(6):289–302.
- [Behan, 2021] Behan, B. (2021). Mysterious blue. www.botanicalinks.com/journal/2021/2/15/mysterious-blue, consulté le 15/11/2022.
- [Bernardo-Mazariegos *et al.*, 2019] Bernardo-Mazariegos, E., Valdez-Salas, B., González-Mendoza, D., Abdelmoteleb, A., Tzintzun Camacho, O., Ceceña Duran, C. et Gutiérrez-Miceli, F. (2019). Silver nanoparticles from *Justicia spicigera*

and their antimicrobial potentialities in the biocontrol of foodborne bacteria and phytopathogenic fungi. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(2):103–109.

[Bezerra-Gomes *et al.*, 2010] Bezerra-Gomes, P., Nett, M., Dahse, H.-M. et Hertweck, C. (2010). Pitucamycin : Structural Merger of a Phenoxazinone with an Epoxyquinone Antibiotic. *Journal of Natural Products*, 73(9):1461–1464.

[Boch *et al.*, 2019] Boch, L., Charbonneau, D., Desquaires, D., Mercier, O., Pourcheresse, Y. et Tchaplal, A. (2019). Procédé et système de pilotage d'une chromatographie liquide préparative.

[Bos *et al.*, 2020] Bos, T. S., Knol, W. C., Molenaar, S. R., Niezen, L. E., Schoenmakers, P. J., Somsen, G. W. et Pirok, B. W. (2020). Recent applications of chemometrics in one- and two-dimensional chromatography. *Journal of Separation Science*, 43(9-10):1678–1727.

[Boyes et Dong, 2018] Boyes, B. E. et Dong, M. W. (2018). Modern Trends and Best Practices in Mobile-Phase Selection in Reversed-Phase Chromatography. *LCGC North America*, 36(10):752–768.

[Brenac, 2014] Brenac, P. (2014). Extraction végétale et actifs cosmétiques. *Expression Cosmétique*.

[Bruneton, 2009] Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Éd. Tec & doc ; Éd. médicales internationales, Paris ; Cachan. OCLC : 947105618.

[Buche *et al.*, 2021] Buche, G., Colas, C., Fougère, L. et Destandau, E. (2021). Oak Species *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl. Identification Based on UHPLC-HRMS/MS Molecular Networks. *Metabolites*, 11(10):684.

[Bueno *et al.*, 2002] Bueno, C., Villegas, M. L., Bertolotti, S. G., Previtali, C. M., Neumann, M. G. et Encinas, M. V. (2002). The Excited-State Interaction of Resazurin and Resorufin with Amines in Aqueous Solutions. Photophysics and Photochemical Reaction. *Photochemistry and Photobiology*, 76(4):385–390.

[Calà *et al.*, 2019] Calà, E., Gosetti, F., Gulmini, M., Serafini, I., Ciccola, A., Curini, R., Salis, A., Damonte, G., Kinninger, K., Just, T. et Aceto, M. (2019). It's Only a Part of the Story : Analytical Investigation of the Inks and Dyes Used in the Privilegium Maius. *Molecules*, 24(12):2197.

[Cardenal et Ramadhar, 2021] Cardenal, A. D. et Ramadhar, T. R. (2021). Application of Crystalline Matrices for the Structural Determination of Organic Molecules. *ACS Central Science*, 7(3):406–414.

[Cardon, 2014] Cardon, D. (2014). *Le monde des teintures naturelles*. Belin, Paris. OCLC : 881255736.

- [Carr et Stoll, 2015] Carr, P. W. et Stoll, D. R. (2015). Two-dimensional liquid chromatography : Principles, practical implementation and applications. Primer 5991-2359EN, Agilent Technologies.
- [Casanova-González *et al.*, 2012] Casanova-González, E., García-Bucio, A., Ruvalcaba-Sil, J. L., Santos-Vasquez, V., Esquivel, B., Falcón, T., Arroyo, E., Zetina, S., Roldán, M. L. et Domingo, C. (2012). Surface-enhanced Raman spectroscopy spectra of Mexican dyestuffs : SERS spectra of Mexican dyestuffs. *Journal of Raman Spectroscopy*, 43(11):1551–1559.
- [Cassani *et al.*, 2014] Cassani, J., Dorantes-Barrón, A., Novales, L., Real, G. et Estrada-Reyes, R. (2014). Anti-Depressant-Like Effect of Kaempferitrin Isolated from *Justicia spicigera* Schlttdl (Acanthaceae) in Two Behavior Models in Mice : Evidence for the Involvement of the Serotonergic System. *Molecules*, 19(12):21442–21461.
- [Castañeda-Ovando *et al.*, 2009] Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. d. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A. et Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins : A review. *Food Chemistry*, 113(4):859–871.
- [Castro-Alatorre *et al.*, 2021] Castro-Alatorre, N. C., Gallardo-Velázquez, T., Boyano-Orozco, L. C., Téllez-Medina, D. I., Meza-Márquez, O. G. et Osorio-Revilla, G. (2021). Extraction and Microencapsulation of Bioactive Compounds from Muicle (*Justicia spicigera*) and Their Use in the Formulation of Functional Foods. *Foods*, 10(8):1747.
- [Chan-Bacab *et al.*, 2015] Chan-Bacab, M. J., Sanmartín, P., Camacho-Chab, J. C., Palomo-Ascanio, K. B., Huitz-Quimé, H. E. et Ortega-Morales, B. O. (2015). Characterization and dyeing potential of colorant-bearing plants of the Mayan area in Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Cleaner Production*, 91:191–200.
- [Chiluiza, 2011] Chiluiza, C. O. P. (2011). Determinacion de la actividad hipoglicemiante del extracto hidroalcoholico de *Justicia chlorostachya* Leonard (Insulina) en ratones con hiperglicemia inducida. Tesis de grado para el titulo de bioquimico farmaceutico, Escuela superior politecnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- [Chávez, 2017] Chávez, M. G. (2017). Extracción e identificación de metabolitos secundarios presentes en el muicle. page 9.
- [Cielecka-Piontek *et al.*, 2013] Cielecka-Piontek, J., Zalewski, P., Jelińska, A. et Garbacki, P. (2013). UHPLC : The Greening Face of Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 76(21-22):1429–1437.
- [Clementi *et al.*, 2006] Clementi, C., Miliiani, C., Romani, A. et Favaro, G. (2006). In situ fluorimetry : A powerful non-invasive diagnostic technique for natural dyes used in artefacts - Part I. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 64(4):906–912.

- [Clementi *et al.*, 2009] Clementi, C., Miliani, C., Romani, A., Santamaria, U., Morresi, F., Mlynarska, K. et Favaro, G. (2009). In-situ fluorimetry : A powerful non-invasive diagnostic technique for natural dyes used in artefacts - Part II. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(5):2057–2062.
- [Corbett, 1965] Corbett, J. F. (1965). The spectra of polycyclic oxazines and azines—III. The infrared spectra of phenoxazinones. *Spectrochimica Acta*, 21(8):1411–1417.
- [Cserháti, 2007] Cserháti, T. (2007). *Liquid chromatography of natural pigments and synthetic dyes*. Numéro v. 71 de Journal of chromatography library. Elsevier, Amsterdam; Boston, 1st ed édition. OCLC : ocm70671720.
- [Dalibart et Servant, 2000] Dalibart, M. et Servant, L. (2000). Spectroscopie dans l'infrarouge.
- [de Avila, 2009] de Avila, A. (2009). Tejer el Arcoíris : Colorantes en el mundo. Rapport technique, Museo textil de Oaxaca.
- [Degano *et al.*, 2009] Degano, I., Ribechini, E., Modugno, F. et Colombini, M. P. (2009). Analytical Methods for the Characterization of Organic Dyes in Artworks and in Historical Textiles. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(5):363–410.
- [del Hoyo-Meléndez et Mecklenburg, 2012] del Hoyo-Meléndez, J. M. et Mecklenburg, M. F. (2012). Micro-fading spectrometry : A tool for real-time assessment of the light-fastness of dye/textile systems. *Fibers and Polymers*, 13(8):1079–1085.
- [Demarque *et al.*, 2016] Demarque, D. P., Crotti, A. E. M., Vessecci, R., Lopes, J. L. C. et Lopes, N. P. (2016). Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry : an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Natural Product Reports*, 33(3):432–455.
- [Desmet *et al.*, 2006] Desmet, G., Clicq, D., Nguyen, D. T.-T., Guillarme, D., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., Vervoort, N., Torok, G., Cabooter, D. et Gzil, P. (2006). Practical Constraints in the Kinetic Plot Representation of Chromatographic Performance Data : Theory and Application to Experimental Data. *Analytical Chemistry*, 78(7):2150–2162.
- [Deveoğlu et Karadağ, 2019] Deveoğlu, O. et Karadağ, R. (2019). A review on the flavonoids - A dye source. *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 3:188–200.
- [Dey et Mukherjee, 2015] Dey, S. K. et Mukherjee, A. (2015). Investigation of 3d-transition metal acetates in the oxidation of substituted dioxolene and phenols. *Journal of Molecular Catalysis A : Chemical*, 407:93–101.
- [Di Benedetto et Breuil, 2007] Di Benedetto, D. et Breuil, P. (2007). Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible.

- [Dieval et Fafet, 2021] Dieval, F. et Fafet, J.-F. (2021). Colorants pour les matériaux textiles. *Caractérisation et propriétés de la matière*.
- [Diggins,] Diggins, K. The Art of Guatemalan Weaving. <https://pages.kiva.org/blog/the-art-of-guatemalan-weaving>, consulté le 15/11/2022.
- [Doherty *et al.*, 2014] Doherty, B., Gabrieli, F., Clementi, C., Cardon, D., Sgamellotti, A., Brunetti, B. et Miliani, C. (2014). Surface enhanced Raman spectroscopic investigation of orchil dyed wool from *Roccella tinctoria* and *Lasallia pustulata* : Orchil dyed wool from *Roccella tinctoria* and *Lasallia pustulata*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 45(9): 723–729.
- [Dolan et Snyder, 1998] Dolan, J. et Snyder, L. (1998). Maintaining fixed band spacing when changing column dimensions in gradient elution. *Journal of Chromatography A*, 799(1-2):21–34.
- [Dolan, 2013a] Dolan, J. W. (2013a). Gradient Elution, Part I : Intuition. *LCGC North America*, 31(3):204–209.
- [Dolan, 2013b] Dolan, J. W. (2013b). Gradient Elution, Part II : Equivalent Separations. *LCGC North America*, 31(4):300–305.
- [Dolan, 2016] Dolan, J. W. (2016). How Does It Work? Part IV : Ultraviolet Detectors. *LCGC North America*, 34(8):534–539.
- [Dolan, 2017] Dolan, J. W. (2017). Back to Basics : The Role of pH in Retention and Selectivity. *LCGC North America*, 35(1):22–28.
- [Domenici *et al.*, 2014] Domenici, D., Buti, D., Miliani, C., Brunetti, B. G. et Sgamellotti, A. (2014). CHAPTER 5. The Colours of Indigenous Memory : Non-invasive Analyses of Pre-Hispanic Mesoamerican Codices. In Sgamellotti, A., Brunetti, B. G. et Miliani, C., éditeurs : *Science and Art*, pages 94–119. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- [Dominguez *et al.*, 1990] Dominguez, Achenbach, Gonzalez et Ferré-D'Amare (1990). Estudio Quimico del "Muitle" (*Justicia spicigera*). *Revista latinoamericana de quimica*, 21(3-4):142–143.
- [Dulaar,] Dulaar, J.-L. Teintures naturelles. <http://dulaar.blogspot.com/>.
- [Dupont et Steen, 2004a] Dupont, D. et Steen, D. (2004a). Colorimétrie - Mesure des couleurs de surface.
- [Dupont et Steen, 2004b] Dupont, D. et Steen, D. (2004b). Colorimétrie - Éléments théoriques.
- [Eckardt *et al.*, 1982] Eckardt, K., Tresselt, D., Ihn, W., Bradler, G. et Reinhardt, G. (1982). Sarubicin B, a new quinone antibiotic, isolated from the fermentation broth of a *Streptomyces* strain. *The Journal of Antibiotics*, 35(12):1638–1640.

- [Espejo Muriel, 2019] Espejo Muriel, M. d. M. (2019). Nombres científicos y vulgares de la flora en el Tratado del Xiquilite (anial) de José M. Mocino. In Sanmartín Saez, J. et Quilis Merin, M., éditeurs : *Retos y avances en lexicografía : los diccionarios del español en el eje de la variación lingüística*, volume 10 de *Normas. Revista de Estudios Lingüísticos*, page es. Valencia, asociación española de estudios lexicográficos edición.
- [Espinosa-Morales *et al.*, 2012] Espinosa-Morales, Y., Reyes, J., Hermosín, B. et Azamar-Barrios, J. A. (2012). Characterization of a Natural Dye by Spectroscopic and Chromatographic Techniques. *MRS Proceedings*, 1374:49–59.
- [Esquivel-Gutierrez *et al.*, 2013] Esquivel-Gutierrez, E., Noriega-Cisneros, R., Arellano-Plaza, M., Ibarra-Barajas, M., Salgado-Garciglia, R. et Saavedra-Molina, A. (2013). Antihypertensive effect of Justicia spicigera in L-NAME-induced hypertensive rats. *PharmacologyOnline*, 2:120–127.
- [Esquivel Gutierrez, 2013] Esquivel Gutierrez, E. R. (2013). *Efecto antihipertensivo de Justicia spicigera Schltl. y su relación con el estrés oxidativo y nitrosativo en riñón de rata*. Thèse de doctorat, Universidad Michoacana, San Nicolás de Hidalgo.
- [Euler et Alam, 1982] Euler, K. L. et Alam, M. (1982). Isolation of kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of Natural Products*, 45(2):220–221.
- [Fernández-López *et al.*, 2020] Fernández-López, J. A., Fernández-Lledó, V. et Angosto, J. M. (2020). New insights into red plant pigments : more than just natural colorants. *RSC Advances*, 10(41):24669–24682.
- [Ferreira *et al.*, 2004] Ferreira, E. S. B., Hulme, A. N., McNab, H. et Quye, A. (2004). The natural constituents of historical textile dyes. *Chemical Society Reviews*, 33(6):329.
- [Fleming et Williams, 2019] Fleming, I. et Williams, D. (2019). *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. Springer International Publishing, Cham.
- [García-Marquez *et al.*, 2012] García-Marquez, E., Roman-Guerrero, A., Pérez-Alonso, C., Cruz-Sosa, F., Jiménez-Alvarado, R. et Vernon-Carter, E. (2012). Effect of solvent-temperature extraction conditions on the initial antioxidant activity and total phenolic content of Mistle extracts and their decay upon storage at different pH. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1):1–10.
- [García-Ríos *et al.*, 2019] García-Ríos, R. I., Mora-Pérez, A., González-Torres, D., Carpio-Reyes, R. d. J. et Soria-Fregozo, C. (2019). Anxiolytic-like effect of the aqueous extract of *Justicia spicigera* leaves on female rats : A comparison to diazepam. *Phytomedicine*, 55:9–13.
- [Gilar *et al.*, 2005a] Gilar, M., Olivova, P., Daly, A. E. et Gebler, J. C. (2005a). Orthogonality of Separation in Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 77(19):6426–6434.

- [Gilar *et al.*, 2005b] Gilar, M., Olivova, P., Daly, A. E. et Gebler, J. C. (2005b). Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. *Journal of Separation Science*, 28(14):1694–1703.
- [González Tirado, 2006] González Tirado, C. (2006). The Tzauhtli Glue. *Nuevo mundo mundos nuevos*.
- [Grazia *et al.*, 2020] Grazia, C., Buti, D., Amat, A., Rosi, F., Romani, A., Domenici, D., Sgamellotti, A. et Miliani, C. (2020). Shades of blue : non-invasive spectroscopic investigations of Maya blue pigments. From laboratory mock-ups to Mesoamerican codices. *Heritage Science*, 8(1):1.
- [Grazia *et al.*, 2018] Grazia, C., Buti, D., Cartechini, L., Rosi, F., Gabrieli, F., Lladó-Buisán, V. M., Domenici, D., Sgamellotti, A., Romani, A. et Miliani, C. (2018). Exploring the Materiality of Mesoamerican Manuscripts by Non-invasive Spectroscopic Methods : Codex Laud, Bodley, Selden, Mendoza and Selden Roll at the Bodleian Library. In Jansen, M. E. R. G. N., Lladó-Buisán, V. M. et Snijders, L., éditeurs : *Mesoamerican manuscripts : new scientific approaches and interpretations*, volume 8 de *The early Americas : history and culture*, pages 134–159. Brill, Leiden ; Boston.
- [Grumbach *et al.*, 2009] Grumbach, E. S., Arsenault, J. C. et McCabe, D. R. (2009). *Beginners guide to UPLC : Ultrapformance liquid chromatography*. Waters, Milford, MA.
- [Guillarme *et al.*, 2008] Guillarme, D., Nguyen, D. T., Rudaz, S. et Veuthey, J.-L. (2008). Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis : Application to short columns packed with small particle. Part II : Gradient experiments. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(2):430–440.
- [Guillarme *et al.*, 2007] Guillarme, D., Nguyen, D. T.-T., Rudaz, S. et Veuthey, J.-L. (2007). Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis : Application to short columns packed with small particle. Part I : Isocratic separation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66(3):475–482.
- [Guiochon *et al.*, 2008] Guiochon, G., Marchetti, N., Mriziq, K. et Shalliker, R. (2008). Implementations of two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1189(1-2):109–168.
- [Gurzhiy, 2019] Gurzhiy, V. V. (2019). Single-Crystal X-Ray Diffraction. In *Materials Characterization*, volume 10, pages 414–426. ASM International.
- [Handa *et al.*, 2008] Handa, S. S., Khanuja, S. P. S. K., Longo, G. et Rakesh, D. D., éditeurs (2008). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste, international centre for science and high technology édition.

- [Heinisch et Sarrut, 2020] Heinisch, S. et Sarrut, M. (2020). Chromatographie en phase liquide bidimensionnelle (2D-LC).
- [Hernandez, 1943] Hernandez, F. (1943). *Historia de las plantas de Nueva Espana*. Mexico, mexico : imprenta universitaria édition.
- [Hernandez, 1959] Hernandez, F. (1959). *Historia natural de Nueva España*. Mexico, universidad nacional de mexico édition.
- [Hernandez Ramos, 2009] Hernandez Ramos, L. M. (2009). Plantas para la producción y decoración de cestería de las comunidades Nahuas : Alahuatlitla y Hueycuatitla de los municipios de Chicontepec y Benito Juárez Veracruz. BS Tesis, Universidad Veracruzana, Facultad de Biología.
- [Houghton *et al.*, 2021] Houghton, A., Appelhagen, I. et Martin, C. (2021). Natural Blues : Structure Meets Function in Anthocyanins. *Plants*, 10(4):726.
- [Ismail *et al.*, 1998] Ismail, L. D., Lorenz, P. et Stermitz, F. R. (1998). Isolation and Synthesis of an r-Malamic Acid Derivative from *Justicia ghiesbreghtiana*. *Journal of Natural Products*, 61(9):1174–1176.
- [Jablonski *et al.*, 2009] Jablonski, J.-A. M., Wheat, T. E. et Diehl, D. M. (2009). Developing Focused Gradients for Isolation and Purification. Technical Note 720002955EN, Waters, Milford, USA.
- [Jiao *et al.*, 2017] Jiao, L., Tao, Y., Wang, W., Shao, Y., Mei, L., Wang, Q. et Dang, J. (2017). Preparative isolation of flavonoid glycosides from *Sphaerophysa salsula* using hydrophilic interaction solid-phase extraction coupled with two-dimensional preparative liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 40(19):3808–3816.
- [Jiménez Ortega *et al.*, 2018] Jiménez Ortega, L. A. J., Ramírez, L. B. et Rodríguez, E. A. (2018). Desarrollo y evaluación de un yogurt bebible adicionado de extracto liofilizado de *Justicia spicigera* como colorante natural. *e-CUCBA*, 5(9):25–34.
- [Jin *et al.*, 2015] Jin, H., Zhao, J., Zhou, W., Shen, A., Yang, F., Liu, Y., Guo, Z., Zhang, X., Tao, Y., Peng, X. et Liang, X. (2015). Preparative separation of a challenging anthocyanin from *Lycium ruthenicum* Murr. by two-dimensional reversed-phase liquid chromatography/hydrophilic interaction chromatography. *RSC Advances*, 5(76):62134–62141.
- [Johnson et Carlson, 2015] Johnson, A. R. et Carlson, E. E. (2015). Collision-Induced Dissociation Mass Spectrometry : A Powerful Tool for Natural Product Structure Elucidation. *Analytical Chemistry*, 87(21):10668–10678.
- [Jurasekova *et al.*, 2006] Jurasekova, Z., Garcia-Ramos, J. V., Domingo, C. et Sanchez-Cortes, S. (2006). Surface-enhanced Raman scattering of flavonoids. *Journal of Raman Spectroscopy*, 37(11):1239–1241. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jrs.1634>.

- [Kachlicki *et al.*, 2016] Kachlicki, P., Piasecka, A., Stobiecki, M. et Marczak, (2016). Structural Characterization of Flavonoid Glycoconjugates and Their Derivatives with Mass Spectrometric Techniques. *Molecules*, 21(11):1494.
- [Kanchanapoom *et al.*, 2004] Kanchanapoom, T., Noiarsa, P., Ruchirawat, S., Kasai, R. et Otsuka, H. (2004). Triterpenoidal glycosides from *Justicia betonica*. *Phytochemistry*, 65(18):2613–2618.
- [Khue *et al.*, 2014] Khue, B., Mai, S., Tuan, M., Oanh, T. B. et Van, T. H. (2014). PERISTROPHE ROXBURGHIANA - A REVIEW. *Annals. Food Science and Technology*, 15(1).
- [Kind et Fiehn, 2007] Kind, T. et Fiehn, O. (2007). Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics*, 8(1):105.
- [Klein, 1997] Klein, K., éditeur (1997). *The unbroken thread : conserving the textile traditions of Oaxaca*. Getty Conservation Institute, Los Angeles. OCLC : 611608299.
- [Know, 2020] Know (2020). LC Method Translation - the Dwell Volume. <https://community.agilent.com/technical/consumables/w/wiki/2897/lc-method-translation---the-dwell-volume>, consulté le 16/10/2022.
- [Koffi *et al.*, 2013] Koffi, E. N., Le Guernevé, C., Lozano, P. R., Meudec, E., Adjé, F. A., Bekro, Y.-A. et Lozano, Y. F. (2013). Polyphenol extraction and characterization of *Justicia secunda* Vahl leaves for traditional medicinal uses. *Industrial Crops and Products*, 49:682–689.
- [Kumar Panigrahi et Kumar Mishra, 2019] Kumar Panigrahi, S. et Kumar Mishra, A. (2019). Inner filter effect in fluorescence spectroscopy : As a problem and as a solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology C : Photochemistry Reviews*, 41:100318.
- [Levsen *et al.*, 2007] Levsen, K., Schiebel, H.-M., Terlouw, J. K., Jobst, K. J., Elend, M., Preiß, A., Thiele, H. et Ingendoh, A. (2007). Even-electron ions : a systematic study of the neutral species lost in the dissociation of quasi-molecular ions. *Journal of Mass Spectrometry*, 42(8):1024–1044.
- [Liu *et al.*, 1995] Liu, Z., Patterson, D. G. et Lee, M. L. (1995). Geometric Approach to Factor Analysis for the Estimation of Orthogonality and Practical Peak Capacity in Comprehensive Two-Dimensional Separations. *Analytical Chemistry*, 67(21):3840–3845.
- [Lorenz *et al.*, 1999] Lorenz, P., Stermitz, F. R. et Ismail, L. D. (1999). An amide of L-threo-g-hydroxyglutamic acid from *Justicia ghiesbreghtiana*. *Phytochemistry*, 52:63–66.
- [Luna, 2018] Luna, F. S. S. (2018). Extracción e identificación de los metabolitos secundarios con capacidad tintórea de *Justicia spicigera* Schltd para su posible uso cosmético. Rapport technique.

- [Malaret, 1959] Malaret, A. (1959). Lexicón de fauna y flora (conclusión). *Thesaurus*, XIV:186–250.
- [Manokari *et al.*, 2019] Manokari, M., Latha, R., Priyadharshini, S., Cokul, R. M., Beniwal, P., Manjunatha, R. Y., Rajput, B. S. et Shekhawat, M. S. (2019). A comprehensive review on a less explored medicinally important plant *Justicia betonica* L. *World Scientific News*, 131:110–122.
- [Marlot *et al.*, 2018] Marlot, L., Batteau, M., De Beer, D. et Faure, K. (2018). In silico screening of comprehensive two-dimensional centrifugal partition chromatography × liquid chromatography for multiple compound isolation. *Analytical Chemistry*, 90(24):14279–14286.
- [Maskey *et al.*, 2003] Maskey, R. P., Li, F. C., Qin, S., Fiebig, H. H. et Laatsch, H. (2003). Chandrananimycins A-C : Production of Novel Anticancer Antibiotics from a Marine Actinomadura sp. Isolate M048 by Variation of Medium Composition and Growth Conditions. *The Journal of Antibiotics*, 56(7):622–629.
- [McDonald et Bidlingmeyer, 1987] McDonald, P. D. et Bidlingmeyer, B. (1987). Strategies for successful preparative liquid chromatography. In Bidlingmeyer, B., éditeur : *Preparative Liquid Chromatography*, volume 38 de *Journal of Chromatography Library*. Elsevier Science.
- [Merlin, 2002] Merlin, J.-C. (2002). Interaction rayonnement-matière et couleur. In *Pigments et colorants de l'Antiquité et du Moyen Âge*, Colloques Internationaux du CNRS, pages 41–57. CNRS Éditions.
- [Messaili *et al.*, 2020] Messaili, S., Colas, C., Fougère, L. et Destandau, E. (2020). Combination of molecular network and centrifugal partition chromatography fractionation for targeting and identifying *Artemisia annua* L. antioxidant compounds. *Journal of Chromatography A*, 1615:460785.
- [Miliani *et al.*, 2012] Miliani, C., Domenici, D., Clementi, C., Presciutti, F., Rosi, F., Buti, D., Romani, A., Laurencich Minelli, L. et Sgamellotti, A. (2012). Colouring materials of pre-Columbian codices : non-invasive in situ spectroscopic analysis of the Codex Cospi. *Journal of Archaeological Science*, 39(3):672–679.
- [Miliani *et al.*, 1998] Miliani, C., Romani, A. et Favaro, G. (1998). A spectrophotometric and fluorimetric study of some anthraquinoid and indigoid colorants used in artistic paintings. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 54(4): 581–588.
- [Musso et Beecken, 1961] Musso, H. et Beecken, H. (1961). Über Orceinfarbstoffe, XII : Synthesen des -Oxy-orceins. *Chemische Berichte*, 94(3):585–600.

- [Musso et Döpp, 1966] Musso, H. et Döpp, D. (1966). Phenoxazine, IX. Synthese und Lichtabsorption von 8-Hydroxy-phenoxazonen-(3). *Chemische Berichte*, 99(5):1470–1478.
- [Musso et Matthies, 1957] Musso, H. et Matthies, H. (1957). Über Orceinfarbstoffe, V. IR- und UV-Spektren Hydroxy- und Amino-Substituierter Phenoxazone. *Chemische Berichte*, 90(9):1814–1827.
- [Musso *et al.*, 1967] Musso, H., Spauke, K. et Walter, K. R. (1967). Phenoxazine, X. Zur Zuordnung charakteristischer Banden im IR-Spektrum von Phenoxazonen_3). *Chemische Berichte*, 100(5):1436–1441.
- [Nabais *et al.*, 2020] Nabais, P., Oliveira, J., Pina, F., Teixeira, N., de Freitas, V., Brás, N. F., Clemente, A., Rangel, M., Silva, A. M. S. et Melo, M. J. (2020). A 1000-year-old mystery solved : Unlocking the molecular structure for the medieval blue from *Chrozophora tinctoria* , also known as folium. *Science Advances*, 6(16):eaaz7772.
- [Nigudkar *et al.*, 2014] Nigudkar, M., Patil, N., Sane, R. et Datar, A. (2014). Preliminary phytochemical screening and HPTLC fingerprinting analysis of *Justicia wynaadensis* (Nees) And. page 6.
- [Nowik, 2013] Nowik, W. (2013). Dyes | Liquid Chromatography. *In Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier.
- [Nowik *et al.*, 2013a] Nowik, W., Bonose, M., Héron, S., Nowik, M. et Tchaplá, A. (2013a). Assessment of two-dimensional separative systems using the nearest neighbor distances approach. Part 2 : Separation quality aspects. *Analytical Chemistry*, 85(20): 9459–9468.
- [Nowik *et al.*, 2013b] Nowik, W., Héron, S., Bonose, M., Nowik, M. et Tchaplá, A. (2013b). Assessment of two-dimensional separative systems using nearest-neighbor distances approach. Part 1 : Orthogonality aspects. *Analytical Chemistry*, 85(20):9449–9458.
- [Ortiz-Andrade *et al.*, 2012] Ortiz-Andrade, R., Cabañas-Wuan, A., Arana-Argáez, V. E., Alonso-Castro, A. J., Zapata-Bustos, R., Salazar-Olivo, L. A., Domínguez, F., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C. et García-Carrancá, A. (2012). Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2):455–462.
- [Ovarlez, 2008] Ovarlez, S. (2008). *Le bleu maya et ses secrets : réactivité indigo-sépiolite et son influence sur la couleur du nanocomposite obtenu : vers l'élaboration de couleurs inspirée du modèle maya*. Thèse de doctorat, Université de Nice.
- [Parkin, 1905] Parkin, J. (1905). ON A BRILLIANT PIGMENT APPEARING AFTER INJURY IN SPECIES. page 2.

- [Patil *et al.*, 2015] Patil, N., Nigudkar, M., Sane, R., Ajitkumar, B. et Datar, A. (2015). Evaluation of microscopic structure of *Justicia wynaadensis* and the stability of its color extracted by using conventional and microwave extraction method. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10):6455–6464.
- [Pauk *et al.*, 2014] Pauk, V., Barták, P. et Lemr, K. (2014). Characterization of natural organic colorants in historical and art objects by high-performance liquid chromatography : Liquid Chromatography. *Journal of Separation Science*, 37(23):3393–3410.
- [Pavón-García *et al.*, 2011] Pavón-García, L. M. A., Pérez-Alonso, C., Orozco-Villafuerte, J., Pimentel-González, D. J., Rodríguez-Huezo, M. E. et Vernon-Carter, E. J. (2011). Storage stability of the natural colourant from *Justicia spicigera* microencapsulated in protective colloids blends by spray-drying : Colour storage stability. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(7):1428–1437.
- [Pena *et al.*, 1995] Pena, A., Capella, S. et Gonzalez, C. (1995). Characterization and identification of the mucilage extracted from orchid bulbs (*Bletia campanulata*) by high temperature capillary gas chromatography (HT-CGC). *Journal of High Resolution Chromatography*, 18:713–717.
- [Pena Agüero, 2010] Pena Agüero, B. (2010). Usos y aplicaciones del muile (*Justicia spicigera* Schlect et Schdl). Diplomado de Temazcal y Medicina tradicional mexicana, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- [Penduff, 2013] Penduff, P. (2013). Analytical to preparative HPLC method transfer - An easy way to scale up from UHPLC to preparative HPLC using focused gradients. Technical Overview 5991-2013EN, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany.
- [Perez Gutierrez *et al.*, 2018] Perez Gutierrez, R., Mota Flores, J. et Neira Gonzalez, A. (2018). Anti-inflammatory effect of procumbenoside B from *Justicia spicigera* on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages and zebrafish model. *Pharmacognosy Research*, 10(2):218.
- [Perles, 2020] Perles, J. (2020). Characterisation and Study of Compounds by Single Crystal X-ray Diffraction. *Crystals*, 10(10):934.
- [Pino Chala *et al.*, 2003] Pino Chala, W., Guerrero, J. E., Castro Rivas, A., Castro, A. A., Palacios, J. A. et Castro, A. (2003). Extracción artesanal de colorantes naturales, una alternativa de aprovechamiento de la diversidad biológica del Choco, Colombia. *Acta Biologica Colombiana*, 8(2):95–98.
- [Pito-Benitez et Cordoba C., 2007] Pito-Benitez, N. et Cordoba C., Y. (2007). Actividad antimicrobiana y fitoquímica preliminar de plantas utilizadas como colorantes en el municipio de quibdó – chocó. *Scientia et Technica*, 1(33).

- [Plesner *et al.*, 2015] Plesner, M., Hensel, T., Nielsen, B. E., Kamounah, F. S., Brock-Nannestad, T., Nielsen, C. B., Tortzen, C. G., Hammerich, O. et Pittelkow, M. (2015). Synthesis and properties of unsymmetrical azatrioxa[8]circulenes. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13(21):5937–5943.
- [Pottier, 2017] Pottier, F. (2017). *Etude des matières picturales du Codex Borbonicus - Apport des spectroscopies non-invasives à la codicologie*. Thèse de doctorat, Cergy-Pontoise.
- [Pottier *et al.*, 2017] Pottier, F., Kwimang, S., Michelin, A., Andraud, C., Goubard, F. et Lavédrine, B. (2017). Independent macroscopic chemical mappings of cultural heritage materials with reflectance imaging spectroscopy : case study of a 16th century Aztec manuscript. *Analytical Methods*, 9(42):5997–6008.
- [Pottier *et al.*, 2018] Pottier, F., Michelin, A., Andraud, C., Goubard, F. et Lavédrine, B. (2018). Characterizing the intrinsic fluorescence properties of historical painting materials : the case study of a sixteenth-century Mesoamerican manuscript. *Applied Spectroscopy*, 72(4):573–583.
- [Pottier *et al.*, 2019] Pottier, F., Michelin, A., Kwimang, S., Andraud, C., Goubard, F. et Lavédrine, B. (2019). Macroscopic reflectance spectral imaging to reveal multiple and complementary types of information for the non-invasive study of an entire polychromatic manuscript. *Journal of Cultural Heritage*, 35:1–15.
- [Pérez-Vásquez *et al.*, 2022] Pérez-Vásquez, A., Díaz-Rojas, M., Castillejos-Ramírez, E. V., Pérez-Esquivel, A., Montaña-Cruz, Y., Rivero-Cruz, I., Torres-Colín, R., González-Andrade, M., Rodríguez-Sotres, R., Gutiérrez-González, J. A., Madariaga-Mazón, A. et Mata, R. (2022). Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of compounds from *Justicia spicigera* (Acanthaceae). *Phytochemistry*, 203(113410).
- [Qin *et al.*, 1999] Qin, J., Xu, X., Wu, L., Ling, Z. et Pu, Q. (1999). Identification of two compounds from *Peristrophe roxburghiana*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 34(8):596–599.
- [Raji *et al.*, 2020] Raji, Y., Mechnou, I., Yassine, W., Kadri, Z., Oumghar, K., Cherkaoui, O. et Zyade, S. (2020). Extraction of the natural indigo carmine pigment from the Isatis plant, characterization and dyeing of wool. *IOP Conference Series : Materials Science and Engineering*, 948(1):012017.
- [Ren *et al.*, 2013] Ren, J., Liu, D., Tian, L., Wei, Y., Proksch, P., Zeng, J. et Lin, W. (2013). Venezuelines A–G, new phenoxazine-based alkaloids and aminophenols from *Streptomyces venezuelae* and the regulation of gene target Nur77. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(1):301–304.
- [Rondeau, 2017a] Rondeau, D. (2017a). Spectrométrie de masse organique - Analyseurs et méthodes en tandem ou MS.

- [Rondeau, 2017b] Rondeau, D. (2017b). Spectrométrie de masse organique - Principe, méthodes d'introduction et d'ionisation.
- [Roquero, 2006] Roquero, A. (2006). *Tintes y tintoreros de América : catálogo de materias primas y registro etnográfico de México, Centro América, Andes Centrales y Selva Amazónica*. Ministerio de Cultura : Instituto del Patrimonio Histórico Español, Madrid.
- [Roquero et Nowik, 2006] Roquero, A. et Nowik, W. (2006). Tintes azules de mesoaméri-
ca. Muicle : un sucedàneo del azul anil. *In III Jornadas internacionales sobre textiles precolombinos : actas, Barcelona, 29.11-1.12, 2004*, pages 19–33. Solanilla i Demestre, Barcelona.
- [Russo et al., 2015] Russo, M., Dugo, P., Marzocco, S., Inferrera, V. et Mondello, L. (2015). Multidimensional preparative liquid chromatography to isolate flavonoids from bergamot juice and evaluation of their anti-inflammatory potential. *Journal of Separation Science*, 38(24):4196–4203.
- [Ruíz-Baltazar, 2020] Ruíz-Baltazar, d. J. (2020). Green synthesis assisted by sonochemical activation of Fe₃O₄-Ag nano-alloys : Structural characterization and studies of sorption of cationic dyes. *Inorganic Chemistry Communications*, 120:108148.
- [Schellinger et Carr, 2005] Schellinger, A. P. et Carr, P. W. (2005). A practical approach to transferring linear gradient elution methods. *Journal of Chromatography A*, 1077(2): 110–119.
- [Schulenberg-Schell et Tei, 2015] Schulenberg-Schell, H. et Tei, A. (2015). Principles and Practical Aspects of Preparative Liquid Chromatography. Primer 5991-2358EN, Agilent Technologies.
- [Schulte et al., 2012] Schulte, M., Jöhnck, M., Skudas, R., Unger, K. K., du Fresne von Hohenesche, C., Wewers, W., Dingenen, J. et Kinkel, J. (2012). Stationary Phases and Chromatographic Systems. *In Schmidt-Traub, H., Schulte, M. et Seidel-Morgenstern, A., éditeurs : Preparative Chromatography*, pages 47–198. Wiley, 1 édition.
- [Schure, 2011] Schure, M. R. (2011). The dimensionality of chromatographic separations. *Journal of Chromatography A*, 1218(2):293–302.
- [Seidel-Morgenstern, 2020] Seidel-Morgenstern, A. (2020). Fundamentals and General Terminology*. *In Schmidt-Traub, H., Schulte, M. et Seidel-Morgenstern, A., éditeurs : Preparative Chromatography*, pages 9–48. Wiley, 1 édition.
- [Semard et al., 2010] Semard, G., Peulon-Agasse, V., Bruchet, A., Bouillon, J.-P. et Cardinaël, P. (2010). Convex hull : A new method to determine the separation space used and to optimize operating conditions for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217(33):5449–5454.

- [Sepulveda-Jimenez *et al.*, 2009] Sepulveda-Jimenez, G., Reyna-Aquino, C., Chaires-Martinez, L., Bermudez-Torres, K. et Rodriguez-Monroy, M. (2009). Antioxidant Activity and Content of Phenolic Compounds and Flavonoids from *Justicia spicigera*. *Journal of Biological Sciences*, 9(6):629–632.
- [Sequin-Frey, 1981] Sequin-Frey, M. (1981). The chemistry of plant and animal dyes. *Journal of Chemical Education*, 58(4):301.
- [Shubina *et al.*, 2010] Shubina, L. K., Makarieva, T. N., Dyshlovoy, S. A., Fedorov, S. N., Dmitrenok, P. S. et Stonik, V. A. (2010). Three New Aaptamines from the Marine Sponge *Aaptos* sp. and Their Proapoptotic Properties. *Natural Product Communications*, 5(12):1934578X1000501.
- [Sinisterra, 2018] Sinisterra, C. (2018). Process - Natural Textile Dyeing. <https://thekalahome.com/blogs/journal/the-process-natural-dyes>, consulté le 15/11/2022.
- [Slonecker *et al.*, 1996] Slonecker, P. J., Li, X., Ridgway, T. H. et Dorsey, J. G. (1996). Informational Orthogonality of Two-Dimensional Chromatographic Separations. *Analytical Chemistry*, 68(4):682–689.
- [Snyder *et al.*, 1997] Snyder, L. R., Kirkland, J. J. et Glajch, J. L. (1997). Appendix II : Properties of solvents used in HPLC. In *Practical HPLC method development*, pages 721–728. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- [Socrates, 2010] Socrates, G. (2010). *Infrared and Raman characteristic group frequencies : tables and charts*. Wiley, Chichester, 3. ed., repr. as paperback édition. OCLC : 838274796.
- [Sorokina et Steinbeck, 2020] Sorokina, M. et Steinbeck, C. (2020). Review on natural products databases : where to find data in 2020. *Journal of Cheminformatics*, 12(1):20.
- [Soto-Robles *et al.*, 2021] Soto-Robles, C., Nava, O., Cornejo, L., Lugo-Medina, E., Vilchis-Nestor, A., Castro-Beltrán, A. et Luque, P. (2021). Biosynthesis, characterization and photocatalytic activity of ZnO nanoparticles using extracts of *Justicia spicigera* for the degradation of methylene blue. *Journal of Molecular Structure*, 1225:129101.
- [Standley, 1938] Standley, P. C. (1938). *Flora of Costa Rica : Part IV*, volume 18 de *Field Museum of National History : Botanical Series*. Chicago.
- [Stoll, 2020] Stoll, D. R. (2020). Rules of Thumb for Reversed-Phase LC : What's In Your Chromatographic Mind? *LCGC North America*, 38(9):480–485.
- [Stužka *et al.*, 1967] Stužka, V., Šimánek, V. et Stránský, Z. (1967). Infra-red spectroscopy of benzo(1)phenoxazines. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular Spectroscopy*, 23(7):2175–2183.

- [Subbaraju *et al.*, 2004] Subbaraju, G. V., Kavitha, J., Rajasekhar, D. et Jimenez, J. I. (2004). Jusbetonin, the First Indolo[3,2- *b*]quinoline Alkaloid Glycoside, from *Justicia betonica*. *Journal of Natural Products*, 67(3):461–462.
- [Sun *et al.*, 2022] Sun, H., Zhang, A., Bao, H., Chu, C. et Tong, S. (2022). In silico screening of off-line comprehensive two-dimensional counter-current chromatography with liquid chromatography for four saponins isolation. *Journal of Separation Science*, 45(20):3909–3918.
- [Surowiec *et al.*, 2008] Surowiec, I., Nowik, W. et Trojanowicz, M. (2008). Post-column deprotonation and complexation in HPLC as a tool for identification and structure elucidation of compounds from natural dyes of historical importance. *Microchimica Acta*, 162(3-4):393–404.
- [Sutherland *et al.*, 2001] Sutherland, J. B., Freeman, J. P., Heinze, T. M., Moody, J. D., Parshikov, I. A., Williams, A. J. et Zhang, D. (2001). Oxidation of phenothiazine and phenoxazine by *Cunninghamella elegans*. *Xenobiotica*, 31(11):799–809.
- [Taylor, 2015] Taylor, T. (2015). Important Aspects of UV Detection for HPLC. *LCGC North America*, 33(11):870.
- [Terada, 2008] Terada, T. (2008). HPLC analysis of colorant from *sacatinta* (*Justicia spicigera* Schlecht). *The Kwassui review*, 51:93–95.
- [Terrazas Mata, 2012] Terrazas Mata, E. (2012). TEÑIDO DE TEXTILES CON TINTES NATURALES. Rapport technique.
- [Teutenberg *et al.*,] Teutenberg, T., Hetzel, T., Loeker, D. et Leonhardt, J. Overview - Selectivity versus Efficiency. *Wiley Analytical Science Magazine*. <https://analyticalscience.wiley.com/do/10.1002/gitlab.15604/>, consulté le 03/01/2023.
- [Thomas, 1866] Thomas, F.-J. (1866). Sur le sericographis mohitli et sur la matière colorante fournie par cette plante. In *Recueil de mémoires de médecine de chirurgie et de pharmacie militaires*, pages 62–78. Charles Noblet, Paris.
- [Thuy *et al.*, 2012a] Thuy, T. T., Huong, N. T. T., Nhung, L. T. H., Ninh, P. T., Delfino, D. V. et Van Sung, T. (2012a). Isolation, characterisation and biological evaluation of a phenoxazine, a natural dyestuff isolated from leaves of *Peristrophe bivalvis*. *Natural Product Research*, 27(8):771–774.
- [Thuy *et al.*, 2012b] Thuy, T. T., Lam, T. H., Thanh Huong, N. T., Hong Nhung, L. T., Ninh, P. T., Hoang Anh, N. T., Phuong Thao, T. T. et Van Sung, T. (2012b). Natural phenoxazine alkaloids from *Peristrophe bivalvis* (L.) Merr. *Biochemical Systematics and Ecology*, 44:205–207.

- [Thuy *et al.*, 2012c] Thuy, T. T., Lam, T. H., Thanh Huong, N. T., Hong Nhung, L. T., Ninh, P. T., Hoang Anh, N. T. et Van Sung, T. (2012c). Nghiên cứu thành phần và đặc tính của chất màu từ lá cây cẩm tím (*Peristrophe bivalvis*) (Study of the composition and toxicity of the colorant from *Peristrophe Bivalvis* leaves of the violet form). *Tap Chi Hoa Hoc*, 50(3):394–397.
- [Tian *et al.*, 2021] Tian, L., Feng, H., Dai, Z. et Zhang, R. (2021). Resorufin-based responsive probes for fluorescence and colorimetric analysis. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(1):53–79.
- [Torres Montes, 2000] Torres Montes, L. A. (2000). Dyes and pigments. In Carrasco, D., éditeur : *The Oxford Encyclopedia of Mesoamerican Cultures*, pages 346–348. Oxford, oxford university press édition.
- [Umetsu *et al.*, 2019] Umetsu, Kanda, Imai, Sakai et Fujita (2019). Quetiomyocins, Algicidal Compounds Produced by the Marine Bacterium *Alteromonas* sp. D and Their Production Cue. *Molecules*, 24(24):4522.
- [Ushida *et al.*, 2005] Ushida, S., Terada, T., Fukumoto, T. et Kohama, Y. (2005). Properties of the Colorant Obtained from Sacatinta and Its Behavior to Dyeing. *Journal of Home Economics of Japan*, 56(12):899–902.
- [Van Gyseghem *et al.*, 2004] Van Gyseghem, E., Crosiers, I., Gourvéneq, S., Massart, D. et Vander Heyden, Y. (2004). Determining orthogonal and similar chromatographic systems from the injection of mixtures in liquid chromatography–diode array detection and the interpretation of correlation coefficients color maps. *Journal of Chromatography A*, 1026(1-2):117–128.
- [Van Gyseghem *et al.*, 2005] Van Gyseghem, E., Jimidar, M., Sneyers, R., Redlich, D., Verhoeven, E., Massart, D. et Vander Heyden, Y. (2005). Orthogonality and similarity within silica-based reversed-phased chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*, 1074(1-2):117–131.
- [Van Gyseghem *et al.*, 2003] Van Gyseghem, E., Van Hemelryck, S., Daszykowski, M., Questier, F., Massart, D. et Vander Heyden, Y. (2003). Determining orthogonal chromatographic systems prior to the development of methods to characterise impurities in drug substances. *Journal of Chromatography A*, 988(1):77–93.
- [Vankar *et al.*, 2009] Vankar, P. S., Shanker, R., Dixit, S., Mahanta, D. et Tiwari, S. (2009). Chemical characterisation of extract derived from *Daphne papyraceae* and sonicator dyeing of cotton, silk and wool with the extract. *Pigment & Resin Technology*, 38(3):181–187.
- [Vauzelle, 2014] Vauzelle, L. (2014). Partition du corps et ornements des dieux aztèques. *Ateliers d'anthropologie*, (40).

- [Wallert, 1995] Wallert, A. (1995). On Some Natural Organic Yellow Colorants in Aztec Codices : the Florentine Codex. *MRS Proceedings*, 352:653.
- [Wanyama *et al.*, 2010] Wanyama, P. A. G., Kiremire, B. T., Ogwok, P. et Murumu, J. S. (2010). The Effect of Different Mordants on Strength and Stability of Colour Produced from Selected Dye-Yielding Plants in Uganda. *International Archive of Applied Sciences and Technology*, 1(2):81–92.
- [Watson, 2005] Watson, D. (2005). Mexican Fugitives : a preliminary investigation of Purple in the Torner Collection. In *The Book and Paper Group Annual*, page 137. Washington DC, the american institute for conservation édition.
- [Witkowski *et al.*, 2017] Witkowski, B., Ganeczko, M., Hryszko, H., Stachurska, M., Gierczak, T. et Biesaga, M. (2017). Identification of orcein and selected natural dyes in 14th and 15th century liturgical paraments with high-performance liquid chromatography coupled to the electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI/MS/MS). *Microchemical Journal*, 133:370–379.
- [Wu *et al.*, 2012] Wu, Z.-Y., Schoenmakers, P. et Mariott, P. J. (2012). Nomenclature and Conventions in Comprehensive Multidimensional Chromatography – An Update. *LCGC Europe*, 25(5):266–275.
- [Wysocki et Dong, 2019] Wysocki, J. et Dong, M. W. (2019). Ultraviolet Detectors : Perspectives, Principles, and Practices. *LCGC North America*, 37(10):750–759.
- [Yamoah *et al.*, 2020] Yamoah, A., Adosraku, R. K., Amenu, J. D., Baah, M. K. et Abaye, D. A. (2020). Evaluation of the Haematinic Activities of Extracts of *Justicia secunda* Vahl Leaves in Red Blood Cells of Laboratory Rats. *Journal of Biosciences and Medicines*, 08(03):48–57.
- [Yusuf *et al.*, 2017] Yusuf, M., Shabbir, M. et Mohammad, F. (2017). Natural Colorants : Historical, Processing and Sustainable Prospects. *Natural Products and Bioprospecting*, 7(1):123–145.
- [Zarate Betancourt, 2016] Zarate Betancourt, E. (2016). Especies utilizadas en la lavandería tradicional entre los Popolucas y Nahuas del sur de Veracruz. *Revista Planta*, 11(22):11–12.
- [Zasada-Kłodzińska *et al.*, 2020] Zasada-Kłodzińska, D., Basiul, E., Buszewski, B. et Szumski, M. (2020). Analysis of Natural Dyes from Historical Objects by High Performance Liquid Chromatography and Electromigration Techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, pages 1–34.
- [Zeng *et al.*, 2012] Zeng, J., Zhang, X., Guo, Z., Feng, J., Zeng, J., Xue, X. et Liang, X. (2012). Separation and identification of flavonoids from complex samples using off-line two-

dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1220:50–56.

[Zhang *et al.*, 2009] Zhang, J., Jin, Y., Liu, Y., Xiao, Y., Feng, J., Xue, X., Zhang, X. et Liang, X. (2009). Purification of alkaloids from *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang using preparative 2-D HPLC. *Journal of Separation Science*, 32(9):1401–1406.

[Zhang *et al.*, 2018] Zhang, Q.-W., Lin, L.-G. et Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products : a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(1):20.

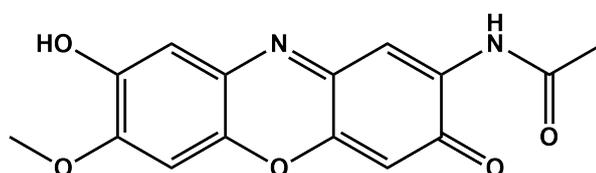
[Zhang *et al.*, 2014] Zhang, Y., Zeng, L., Pham, C. et Xu, R. (2014). Preparative two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry for the purification of complex pharmaceutical samples. *Journal of Chromatography A*, 1324:86–95.

Annexes

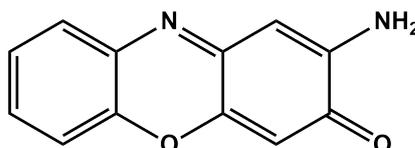
Annexe A Glossaire des molécules

Classement par ordre alphabétique

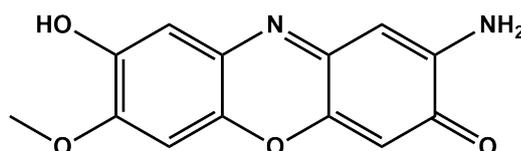
2-acétylamino-8-hydroxy-7-méthoxy-phénoxazin-3-one ou Périssbivalvine A



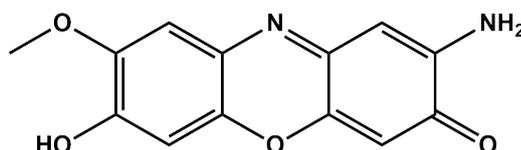
2-amino-phénoxazin-3-one ou Questionmycine A



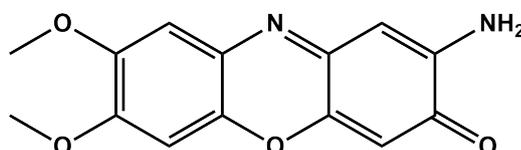
2-amino-8-hydroxy-7-méthoxy-phénoxazin-3-one ou Périssbivalvine B



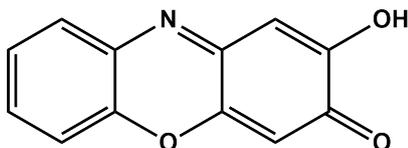
2-amino-7-hydroxy-8-méthoxy-phénoxazin-3-one



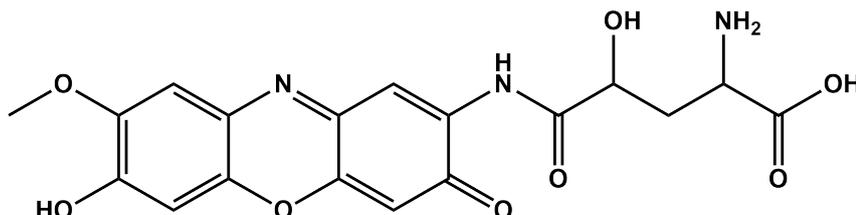
2-amino-7,8-méthoxy-phénoxazin-3-one ou Péristrophine



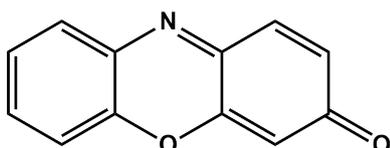
2-hydroxy-phénoxazin-3-one



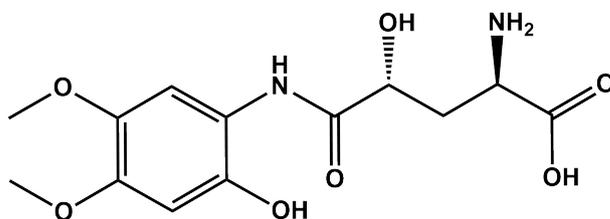
2-N-(4-hydroxy- γ -glutamyl)-7-hydroxy-8-méthoxy-3H-phénoxazin-3-one



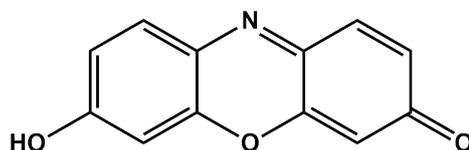
3H-phénoxazin-3-one (ou phénoxazin-3-one)



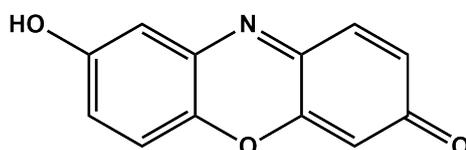
4-hydroxy-N-(2-hydroxy-4,5-diméthoxyphényl)-L-glutamine ou Justiciamide



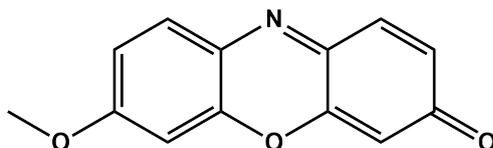
7-hydroxy-phénoxazin-3-one ou Résorufine



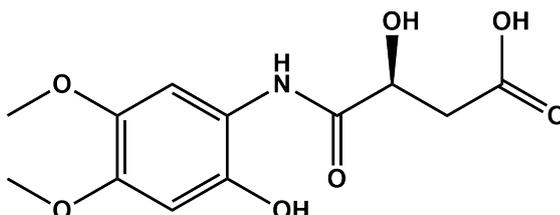
8-hydroxy-phénoxazin-3-one



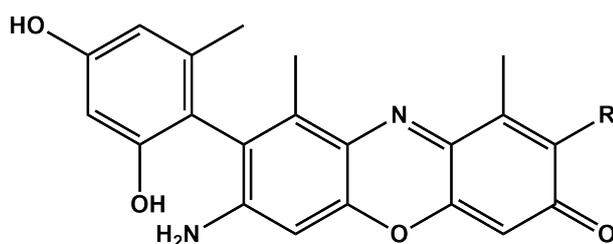
7-hydroxy-phénoxazin-3-one ou Éther méthylique de résorufine



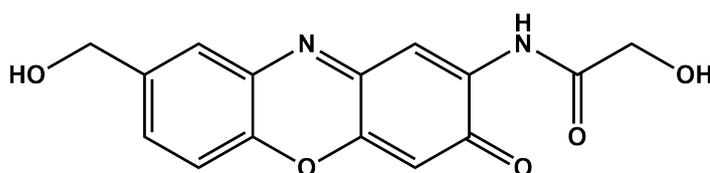
Acide 4-amino-3-hydroxy-N-(2-hydroxy-4,5-diméthoxyphényl)-4-oxobutanoïque



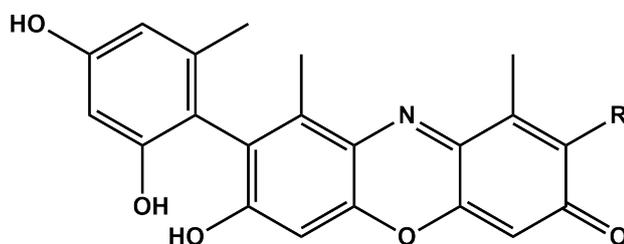
Amino-orcéines avec R = H ou orcinol



Chandrananimycine D



Hydroxy-orcéines avec R = H ou orcinol



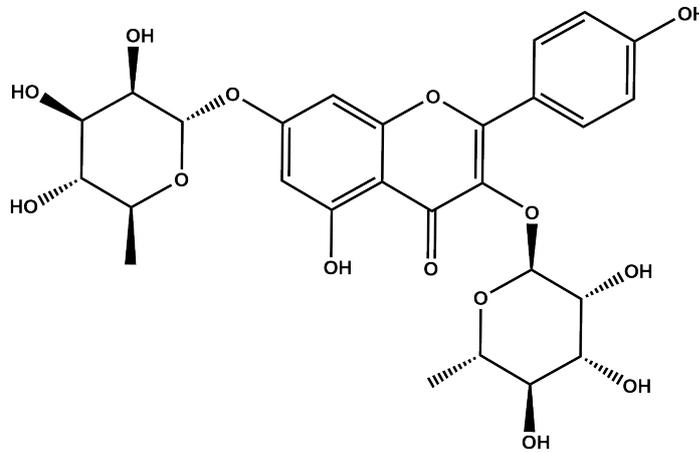
Justiciamide

voir à [4-hydroxy-N-\(2-hydroxy-4,5-diméthoxyphényl\)-L-glutamine](#)

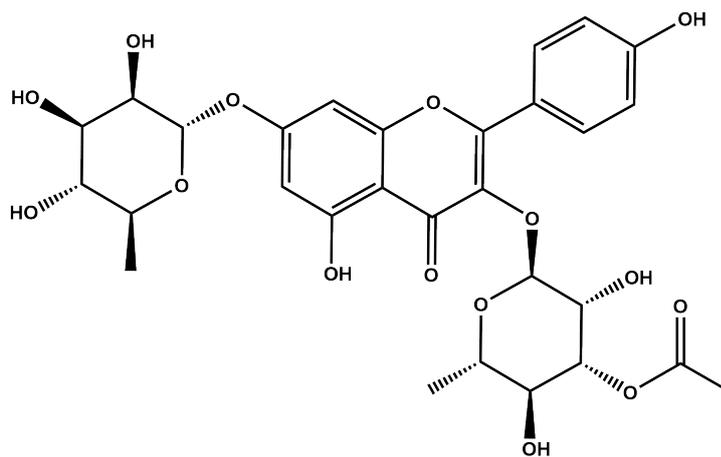
Kaempféritrine

voir à [Kaempférol-3,7-dirhamnose](#)

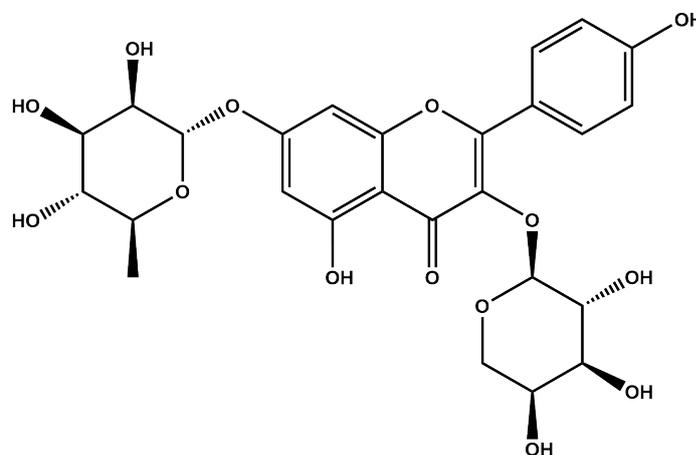
Kaempférol-3,7-dirhamnose ou Kaempféritrine



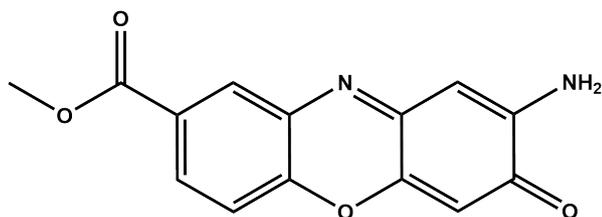
Kaempférol-3-(3'-acétyl-rhamnose)-7-rhamnose



Kaempférol 3-arabinose-7-rhamnose



Maroxazinone



Périsbivalvine A

voir à [2-acétylamino-8-hydroxy-7-méthoxy-phénoxazin-3-one](#)

Périsbivalvine B

voir à [2-amino-8-hydroxy-7-méthoxy-phénoxazin-3-one](#)

Péristrophine

voir à [2-amino-7,8-méthoxy-phénoxazin-3-one](#)

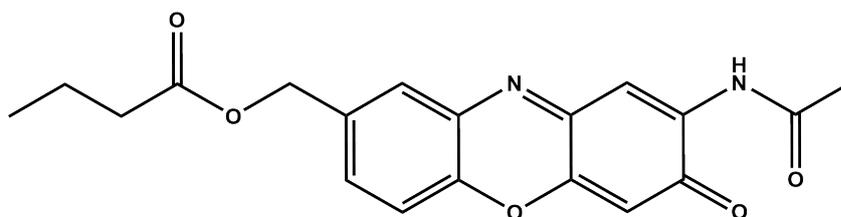
Questiomycine A

voir à [2-amino-phénoxazin-3-one](#)

Résorufine

voir à [7-hydroxy-phénoxazin-3-one](#)

Vénézuéline E



Annexe B Appellations vernaculaires correspondant à l'espèce *Justicia spicigera*

L'espèce *Justicia spicigera* est connue sous diverses appellations vernaculaires. Elles sont résumées dans le Tableau B.1.

Tableau B.1 - Appellations vernaculaires de *J. spicigera*.
MX = Mexique, GT = Guatemala.

Nom	Langue/peuple	Zone géographique	Référence(s)
Andichkaan Caandathana	Popoluca	Veracruz (MX)	[Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]
Añil de piedra	Espagnol		[Pena Aguero, 2010] [Chávez, 2017]
Bisil k'aax	Maya	Péninsule du Yucatán (MX)	[Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]
Chak lool	Maya	Péninsule du Yucatán (MX)	[Ortiz-Andrade <i>et al.</i> , 2012] [Espinosa-Morales <i>et al.</i> , 2012] [Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]
Chak xiu	Maya		[Chan-Bacab <i>et al.</i> , 2015]
Charatzicua	Tarascan	Michoacán (MX)	[Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]
Cross k'aax tsiits	Maya	Péninsule du Yucatán (MX)	[Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]
Cruz k'aax		Péninsule du Yucatán (MX)	[Pena Aguero, 2010]
Gu gi'in	Zapoteca	MX	[Roquero, 2006]
			Suite à la page suivante

Tableau B.1 – suite de la page précédente

Nom	Langue/peuple	Zone géographique	Référence(s)
Hierba azul			[Thomas, 1866] [Chávez, 2017]
Hierba de añil	Espagnol	Chiapas (MX)	[Roquero, 2006]
Hierba de la virgen	Espagnol		[Chávez, 2017]
Hierba de Santa Inés	Espagnol	GT	[Roquero, 2006] [Terrazas Mata, 2012]
Hierba del sol	Espagnol	Puebla (MX)	[Roquero, 2006]
Hierba purpura	Espagnol		[Chávez, 2017]
Hierba tinta	Espagnol		[Chávez, 2017]
Ichkan	Maya	Péninsule du Yucatán (MX)	[Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]
Limalin			[Chávez, 2017]
Mayotte	Huastèques	San Luis Potosí (MX)	[Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]
Me tzi ña		Oaxaca (MX)	[Pena Aguero, 2010] [Chávez, 2017]
Mexican honeysuckle	Anglais		[Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]
Micle		Durango, Guerrero et Hidalgo (MX)	[Hernandez, 1943] [Pena Aguero, 2010] [Cardon, 2014] [Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]
Mohintle		Guanajuato, Hidalgo, México, Oaxaca, etc. (MX)	[Hernandez, 1943] [Cardon, 2014] [Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]
Mohintli		Hidalgo (MX)	[Pena Aguero, 2010] [Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]
Mohitli	Huastèque	San Luis Potosí (MX) et Orizaba, Veracruz (MX)	[Thomas, 1866] [Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]
			Suite à la page suivante

Tableau B.1 – suite de la page précédente

Nom	Langue/peuple	Zone géographique	Référence(s)
Mohuite		Hidalgo (MX)	[Pena Aguero, 2010] [Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014] [Chávez, 2017]
Mohuitli	Nahua	Chiapas, Nayarit, San Luis Potosí et Veracruz (MX)	[Alexander, 1937] [Hernandez, 1943] [Hernandez, 1959] [Wallert, 1995] [Klein, 1997] [Roquero, 2006] [Pena Aguero, 2010] [Casanova-González et al., 2012] [Cardon, 2014] [Chávez, 2017]
Moictle		Guanajuato, México, Oaxaca, etc. (MX)	[Hernandez, 1943]
Moitle		Puebla (MX)	[Chávez, 2017]
Mouait	Tepehua	Puebla (MX)	[Pena Aguero, 2010]
Mouel		Puebla (MX)	[Chávez, 2017]
Mouitl		Puebla (MX)	[Chávez, 2017]
Moyotli	Huastèque	San Luis Potosí (MX)	[Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]
Mozote	Huastèque	San Luis Potosí (MX)	[Pena Aguero, 2010] [Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]
Muecle			[Pena Aguero, 2010]
Muele			[Pena Aguero, 2010]
			Suite à la page suivante

Tableau B.1 – suite de la page précédente

Nom	Langue/peuple	Zone géographique	Référence(s)
Muicle		Guanajuato, Jalisco, México, Oaxaca, San Luis Potosí, etc. (MX)	[Hernandez, 1943] [Roquero, 2006] [Pena Aguero, 2010] [Terrazas Mata, 2012] [Ortiz-Andrade <i>et al.</i> , 2012] [Baqueiro-Peña <i>et Guerrero-Beltrán</i> , 2014]
Muh	Huastèque	San Luis Potosí (MX)	[Baqueiro-Peña <i>et Guerrero-Beltrán</i> , 2014]
Muu	Tenek	San Luis Potosí (MX)	[Pena Aguero, 2010]
Muille			[Pena Aguero, 2010]
Muite	Huastèque	San Luis Potosí (MX)	[Pena Aguero, 2010] [Ortiz-Andrade <i>et al.</i> , 2012]
Muitle		Hidalgo, Oaxacan et Veracruz (MX)	[de Avila, 2009] [Hernandez Ramos, 2009] [Pena Aguero, 2010] [Cardon, 2014] [Chan-Bacab <i>et al.</i> , 2015] [Baqueiro-Peña <i>et Guerrero-Beltrán</i> , 2017]
Muitle if-si		Veracruz (MX)	[Baqueiro-Peña <i>et Guerrero-Beltrán</i> , 2014]
Sacatinta	Espagnol	GT et MX	[Roquero, 2006] [Ushida <i>et al.</i> , 2005] [Terada, 2008] [Terrazas Mata, 2012] [Cardon, 2014] [Luna, 2018]
Sacatinte	Espagnol	GT	[Roquero, 2006]
Sacramento		Chiapas (MX)	[Roquero, 2006]
			Suite à la page suivante

Tableau B.1 – suite de la page précédente

Nom	Langue/peuple	Zone géographique	Référence(s)
Tinta	Espagnol	GT	[Roquero, 2006]
Trompeta del diablo	Espagnol		[Terrazas Mata, 2012]
Ts'is anduhaa-ink-Spanish	Zapotec	Oaxaca (MX)	[Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]
Ts'i'its	Maya	Péninsule du Yucatán (MX)	[Baqueiro-Peña et Guerrero-Beltrán, 2014]
Yich-kaan	Maya	Péninsule du Yucatán (MX)	[Pena Aguero, 2010] [Ortiz-Andrade <i>et al.</i> , 2012] [Chávez, 2017]

Annexe C *J. tinctoriella* et *J. macrantha*

Deux espèces du genre *Justicia*, employées en Amérique Centrale, ont des propriétés tinctoriales très proches de l'espèce *Justicia spicigera* : *Justicia tinctoriella* et *Justicia macrantha*. Les trois espèces sont d'ailleurs toutes nommées par une appellation vernaculaire commune : *sacatina* (en espagnol, *sacar* : enlever et *tinta* : le colorant).

Les synonymes taxonomiques et les distributions géographiques des espèces *J. tinctoriella* et *J. macrantha* sont présentés dans les Tableaux et les Figures qui suivent.

Tableau C.1 – Classification et synonymes botaniques de *Justicia tinctoriella* et *Justicia macrantha*, d'après *Plants of the World Online* [noa, d].

≡ pour les synonymes homotypiques (ou nomenclaturaux) et = pour les synonymes hétérotypiques (ou taxinomiques).

	<i>J. tinctoriella</i>	<i>J. macrantha</i>
Règne	Plantae	Plantae
Phylum	Tracheophyta	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales	Lamiales
Famille	Acanthaceae	Acanthaceae
Genre	<i>Justicia</i> L.	<i>Justicia</i> L.
Espèce	<i>Justicia tinctoriella</i> Bennet & Raizada	<i>Justicia macrantha</i> Benth.
≡	<i>Jacobinia tinctoria</i> (Oerst.) Hemsl.	<i>Cyrtanthera macrantha</i> (Benth.) Nees
≡	<i>Justicia colorifera</i> V.A.W.Graham	<i>Cyrtantherella macrantha</i> (Benth.) Oerst.
≡	<i>Justicia neotinctoria</i> K.Hammer	<i>Jacobinia macrantha</i> Benth. & Hook.f. ex Hemsl.
≡	<i>Justicia tinctoria</i> (Oerst.) D.N.Gibson	
≡	<i>Sericographis tinctoria</i> Oerst.	



(a) *Justicia tinctoriella*



(b) *Justicia macrantha*

Figure C.1 – Distributions géographiques, d'après *Plants of the World Online* [noa, d].

Annexe D Études complémentaires de certains paramètres d'extraction

L'influence de certains paramètres intervenant lors de l'extraction du colorant, comme le lot de feuilles, le mode de stockage des feuilles, le temps de macération ou le solvant d'extraction a été évaluée.

1 Influence du lot de feuilles

Au cours du projet, plusieurs lots de feuilles ont été reçus et utilisés après leur séchage. Dans les mêmes conditions d'extraction, nous avons pu constater certaines différences dans la composition de l'extrait aqueux issus des différents lots. Les chromatogrammes obtenus pour trois lots de feuilles distincts sont représentés dans les Figures D.1 et D.2 pour une détection en total scan et dans le visible, respectivement.

Les sept composés repérés précédemment (A1, A2, F1, F2, F3, X1 et X2) ont été identifiés quel que soit le lot de feuilles. Nous pouvons cependant remarquer des différences notables dans la proportion relative de ces composés entre chaque lot, notamment pour les composés colorés X1 et X2. L'aire intégrée du pic correspondant au composé X1 varie par exemple de $3 \cdot 10^6$ pour le lot 11/2019 à $7 \cdot 10^4$ pour le lot 11/2020. Nous notons également des proportions des glycosides de flavonols (F1, F2 et F3) variables de 60 %, 30 % et 10 % pour les lots 11/2019 et 11/2020 vs 40 %, 50 % et 10 % pour le lot 04/2018. Un composé supplémentaire à un t_r d'environ 23,5 min, avec une absorbance notable, a également été détecté dans l'extrait du lot 04/2018, probablement un autre dérivé de flavonol au vu de son temps de rétention et de son spectre d'absorption (Figure D.1b).

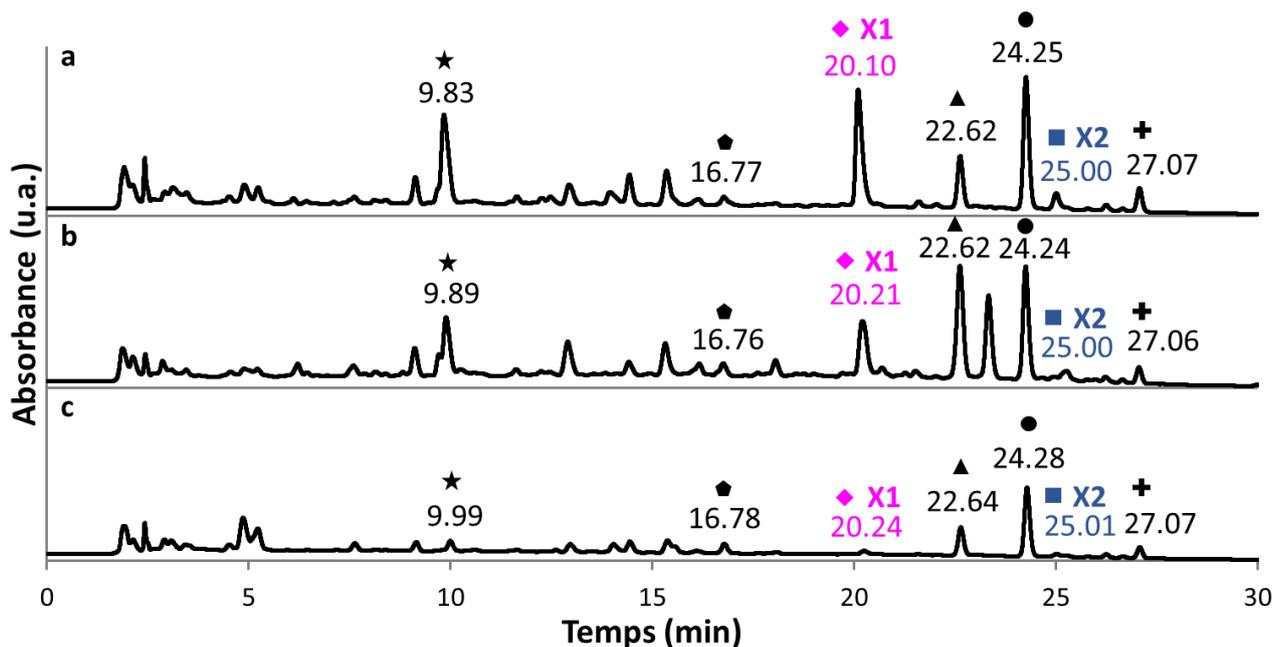


Figure D.1 – Chromatogrammes d'extrait aqueux de *Justicia spicigera*
 a) Lot 11/2019 b) Lot 04/2018 c) Lot 11/2020.
 Phase stationnaire : puriFlash® C18-XS. Phase mobile : HCOOH 0,1 % pH 3 / MeOH.
 Gradient : 5-80 % MeOH de 0 à 30 min. Détection : DAD total scan 200-750 nm.
 Composés identifiés : ★ : A1; ◆ : A2; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; ■ : X2; + : F3.
 (Attributions correspondant au Tableau 3.1 du Chapitre 3)

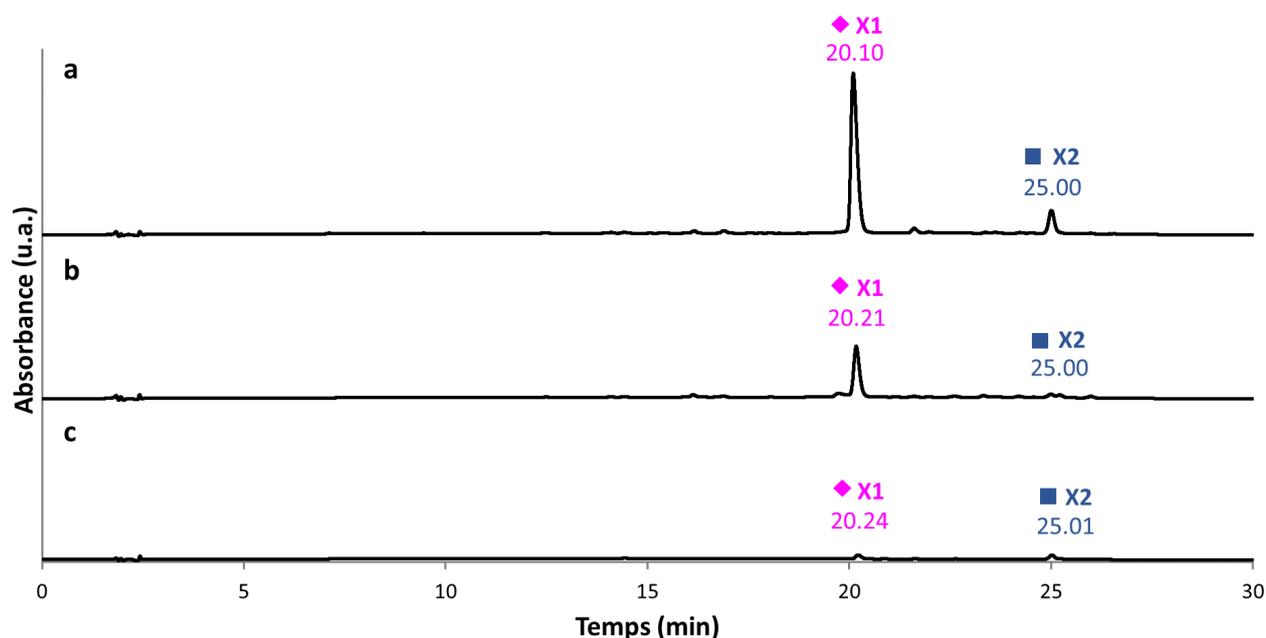


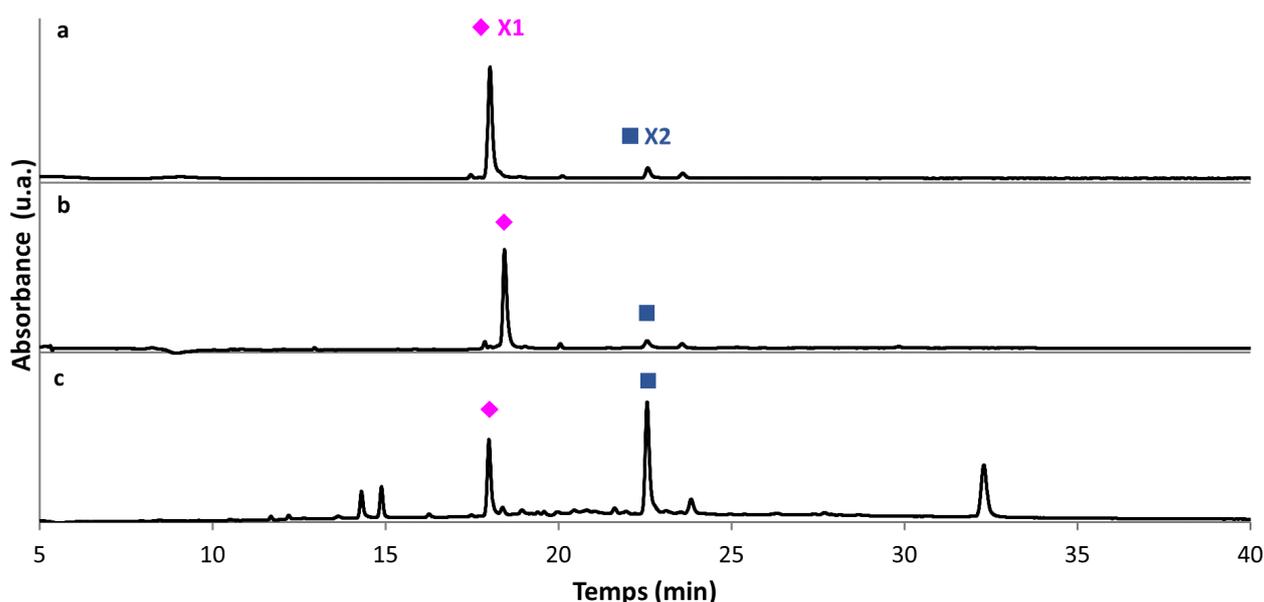
Figure D.2 – Chromatogrammes d'extrait aqueux de *Justicia spicigera*
 a) Lot 11/2019 b) Lot 04/2018 c) Lot 11/2020.
 Phase stationnaire : puriFlash® C18-XS. Phase mobile : MeOH/HCOOH 0,1 % pH 3.
 Gradient : 5-80 % MeOH de 0 à 30 min. Détection : DAD 400-750 nm.

Ainsi, pour s'affranchir de cette variabilité, dans la mesure du possible, le **même lot de feuilles** a été utilisé. Et ce, particulièrement, lors de la phase de développement et d'optimisation de la méthode de purification des composés colorés par chromatographie préparative. En effet, comme nous avons cherché à comparer les chromatogrammes obtenus avec divers paramètres de séparation, il était important que l'extrait analysé soit le plus constant possible.

2 Influence du mode de stockage des feuilles

Afin de ne pas dépendre d'envoi de feuilles fraîches, le potentiel de deux modes de stockage (séchage et congélation) a été évalué.

Des extraits d'un même lot de feuilles fraîches, séchées et congelées ont été analysés par HPLC-DAD et leur composition moléculaire a été comparée (Figure D.3).



**Figure D.3 – Chromatogrammes d'extrait aqueux à partir de
a) Feuilles fraîches, b) Feuilles séchées et c) Feuilles congelées
Lot de feuilles : 04/2018.**

**Phase stationnaire : Aquasil C18. Phase mobile : A - H₂O HCOOH 0,1 pH 3 % / B - MeCN. Gradient :
0 % de B de 0 à 1 min ; 0-60 % B de 1 à 41 min. Débit : 0,3 mL/min. Détection DAD 485 nm.**

Les extraits de feuilles fraîches et séchées présentent des chromatogrammes similaires pour les composés absorbant dans la gamme du visible, considérant le nombre de pics, leur temps de rétention et leur intensité relative. Ainsi, le procédé de séchage

ne semble pas affecter sa compositionⁱ En revanche, dans le cas de la congélation, la composition de l'extrait résultant diffère considérablement. Dans toutes les expériences menées par la suite, des feuilles séchées ont donc été utilisées.

Par ailleurs, nous avons vérifié que le séchage des feuilles n'avait pas d'influence sur les propriétés spectrales (émission de fluorescence et Raman) ayant permis l'identification du colorant dans le *Codex Borbonicus*.

Les spectres Raman de dépôts de feuilles fraîches et séchées sont comparés dans la Figure D.4. Les mêmes bandes Raman sont mesurées indépendamment de l'état des feuilles utilisées lors de l'extraction du colorant. Le profil spectral correspond à celui détecté dans les peintures brunes de la partie II du *Codex Borbonicus*.

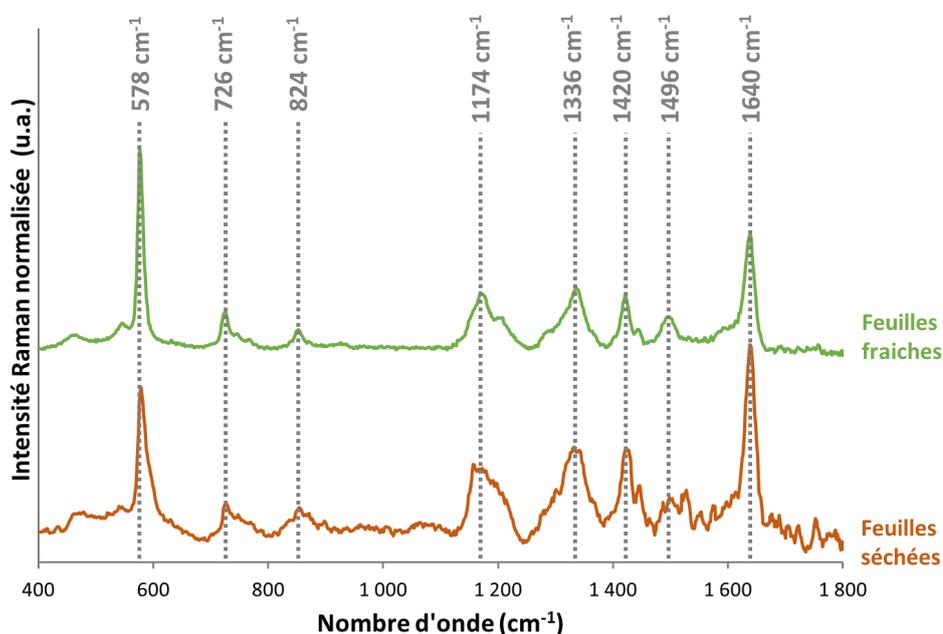


Figure D.4 – Spectres Raman de dépôts de feuilles séchées vs fraîches, d'après [Pottier, 2017]. Lot de feuilles 2015. Laser 532 nm. Soustraction de la ligne de base.

Les spectres d'émission de fluorescence de dépôts de feuilles fraîches et séchées sont comparés dans la Figure D.5 .

i. Ou tout du moins, pas si les feuilles sont mises à sécher alors qu'elles sont encore bien fraîches et en bon état. En effet, nous avons pu remarquer que lorsque l'opération de séchage est réalisée alors que l'état des feuilles a déjà commencé à se dégrader, il n'est ensuite pas possible d'extraire le beau colorant violet, des extraits bruns sont plutôt obtenus.

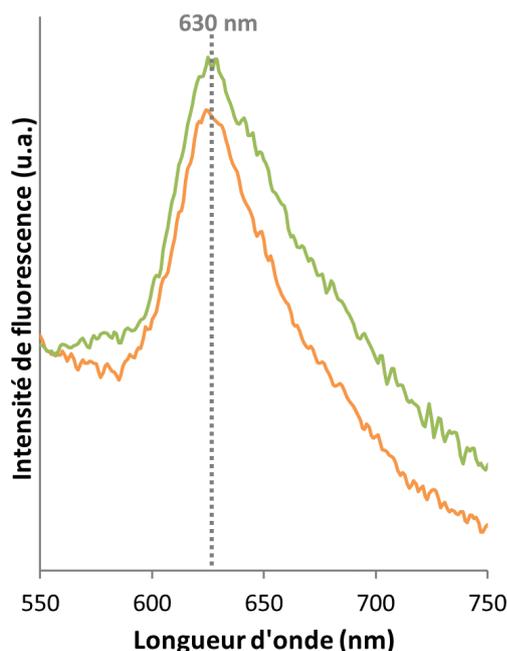


Figure D.5 – Spectres d'émission de fluorescence de dépôts de feuilles séchées (orange) vs fraîches (vert), d'après [Pottier, 2017]. Lot de feuilles 2015. λ_{ex} 465 nm.

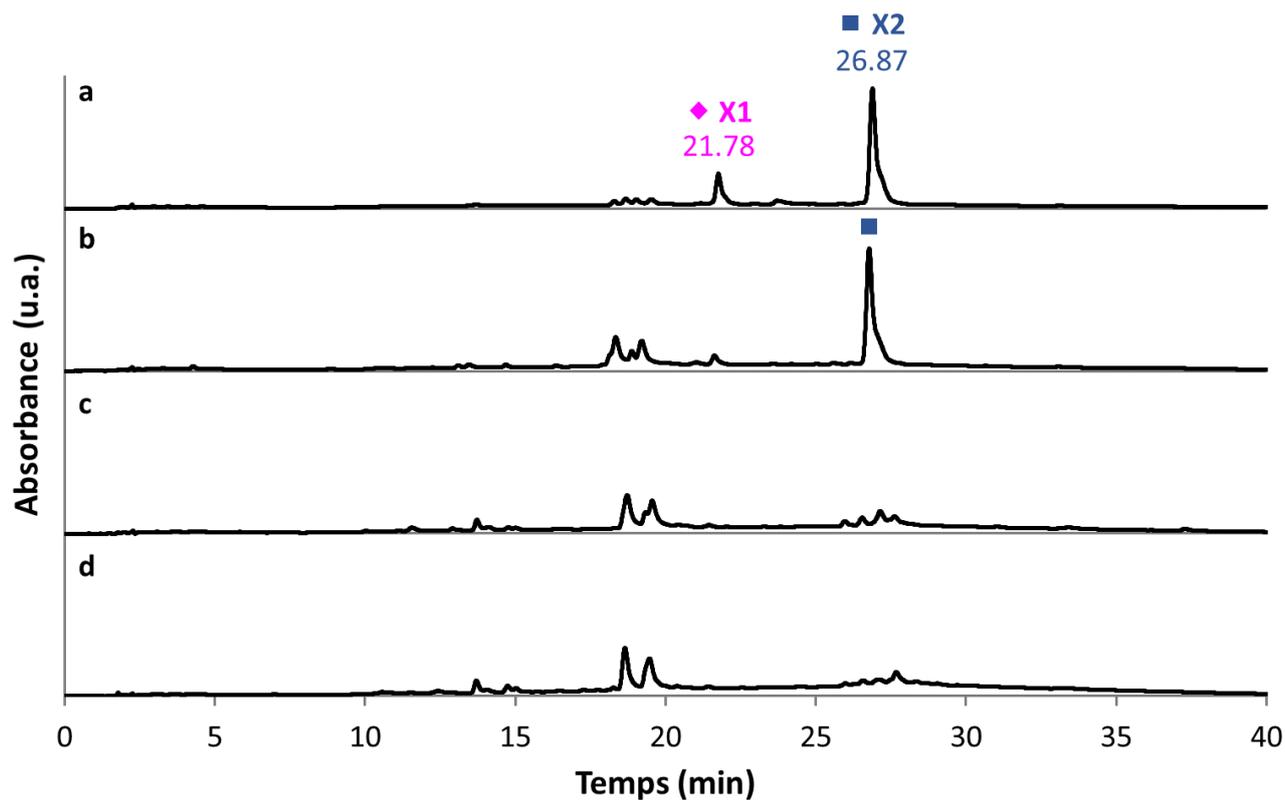
Le maximum d'émission centré autour de 630 nm semble indépendant de l'état des feuilles. Le séchage ne dégrade *a priori* pas les composés responsables de la fluorescence.

Nous avons ainsi travaillé avec des **feuilles séchées**, en prenant soin de commencer le procédé de séchage dès la réception des feuilles fraîches.

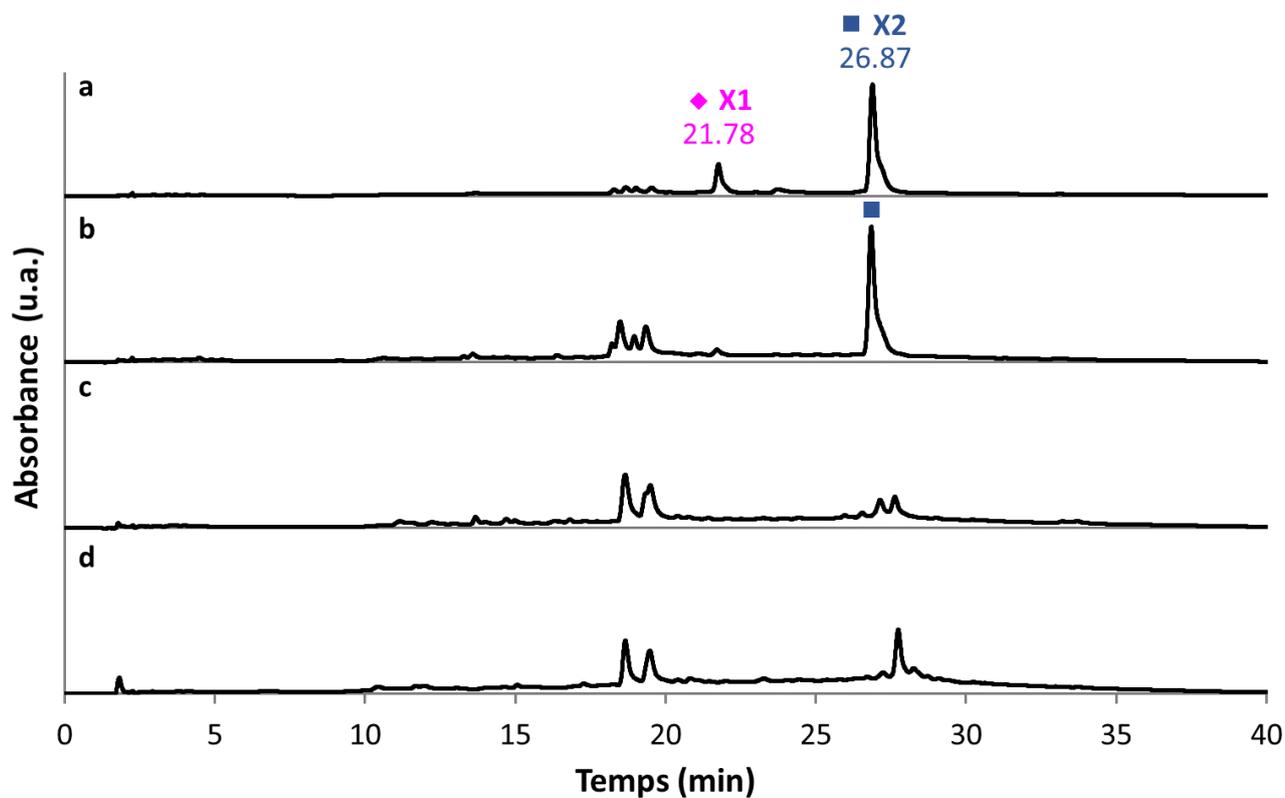
3 Influence du temps de macération

Lors de cette expérience, un extrait a été préparé comme précédemment par macération des feuilles de *Justicia spicigera* dans de l'eau. Au bout de 10 min de macération, une partie de la solution a été prélevée et a été filtrée (dite « Sans macération », par simplification) et l'autre partie a été laissée à macérer (dite « Avec macération »).

Un suivi par HPLC-DAD de la composition de ces deux solutions au cours du temps a été réalisé (Figure D.6).



(a) Solution « Sans macération ».



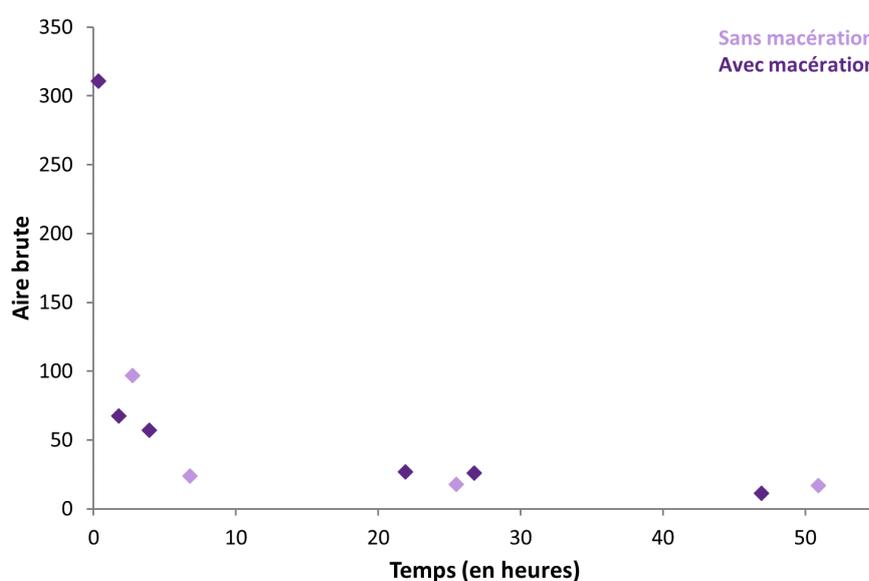
(b) Solution « Avec macération ».

Figure D.6 – Chromatogrammes pour les extraits « Sans macération » et « Avec macération » à des temps de repos de a) 10 min, b) 2 h, c) 24 h et d) 8 jours.

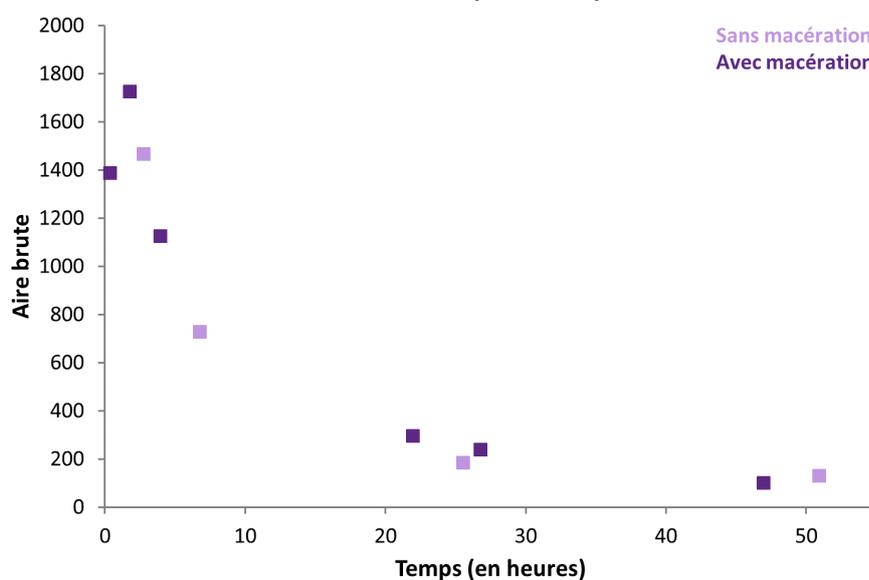
Phase stationnaire : Uptisphere® Strategy™ C18-HQ. Phase mobile : A - HCOOH 0,1 % pH 3 / B - MeOH. Gradient : 5-80 % B de 0 à 30 min. Détection 485 nm.

Une composition similaire pour les composés absorbant à 485 nm a été observée au cours du temps que l'extrait subisse une longue macération ou non ; les intensités d'absorbance sont également comparables.

Pour les composés X1 et X2, l'aire des pics a notamment été comparée qualitativement pour les deux extraits avec et sans macération au cours du temps (jusqu'à 50 h) et aucune différence significative n'a été observée (Figure D.7). La macération ne permet donc pas d'extraire les composés en plus grande quantité, ni de modifier la cinétique de l'évolution de l'extrait.



(a) Aires brutes extraites pour le composé X1



(b) Aires brutes extraites pour le composé X2

Figure D.7 – Aires brutes extraites pour les composés X1 et X2 en fonction du temps pour des extraits « Sans macération » et « Avec macération ».

Nous pouvons toutefois noter la présence d'un composé supplémentaire à un temps de rétention entre 25 et 30 min pour l'extrait « Avec macération » à 8 jours, en comparaison à celui « Sans macération ». Comme indiqué précédemment, nous avons remarqué une grande variabilité dans la détection des composés minoritaires; or, cette expérience n'a pu être réalisée qu'une seule fois. Il serait nécessaire de répéter l'expérience pour relier la présence de ce composé à l'influence de la macération.

La macération ayant peu d'influence sur la concentration et l'évolution de l'extrait, par praticité, nous avons travaillé à **des temps de macération courts et constants de 5 à 10 min.**

4 Influence du solvant d'extraction

Même si, traditionnellement, il est très peu probable que l'extraction ait été réalisée avec un solvant organique, d'un point de vue méthodologique, il est toutefois intéressant de voir si certains solvants ont un pouvoir d'extraction meilleur que l'eau afin de maximiser la quantité de composés d'intérêt colorés en vue de leur purification.

Le protocole d'extraction était identique à celui décrit précédemment (partie 2.2.1). Seul le solvant d'extraction a été modifié.

Plusieurs solvants d'extraction ont été testés afin de voir leur influence sur la composition moléculaire de l'extrait obtenu. Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans les Figures D.8a et D.8b, en total scan et dans le visible respectivement.

Nous avons pu constater que l'eau est de loin le meilleur solvant pour mettre l'extraction des composés colorés principaux, X1 et X2 (Figure D.8b). Seul le mélange eau-méthanol permet l'extraction du composé X1 en quantité notable (avec une intensité du pic correspondant toutefois 4 fois inférieure à celui dans de l'eau); le composé X2 n'est quant à lui pas détecté avec ce mélange extracteur.

Les chromatogrammes obtenus en total scan présentent moins de pics que pour celui des extraits à l'eau et mettent ainsi en évidence une moins grande variété de composés extraits dans le cas des extraction réalisées avec des solvants différents de l'eau.

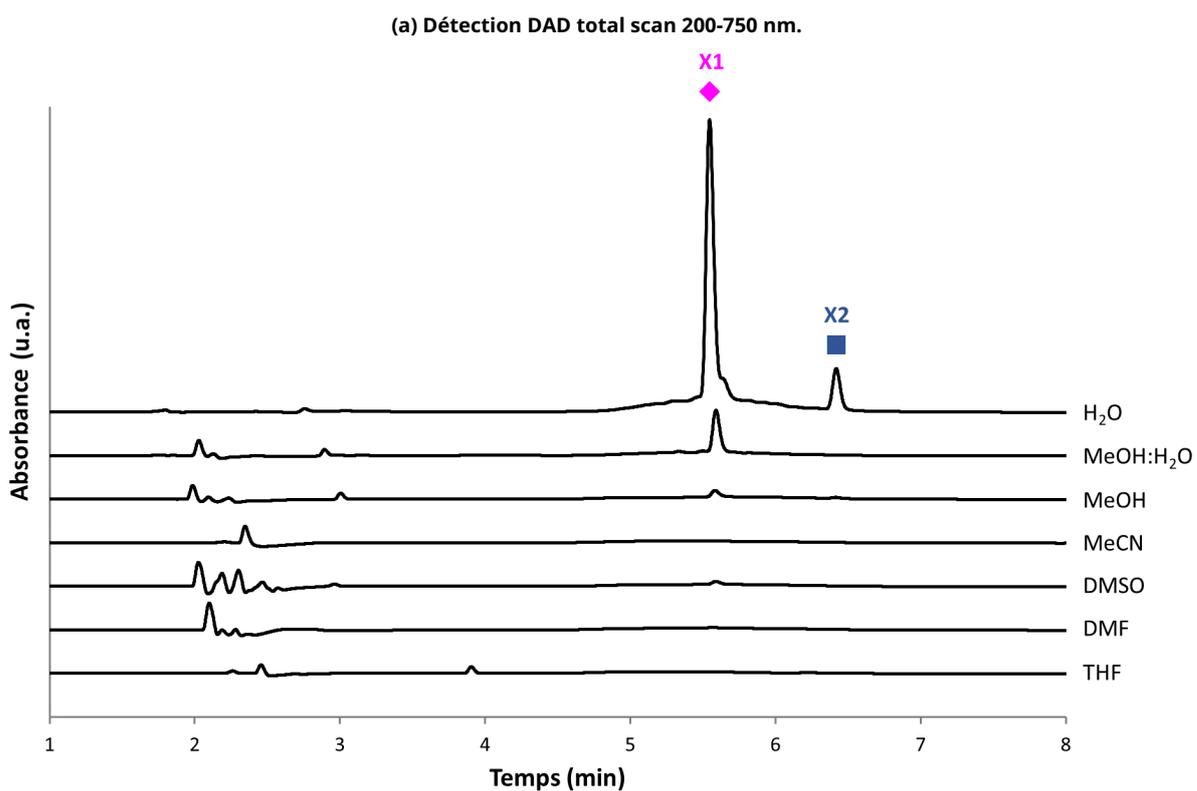
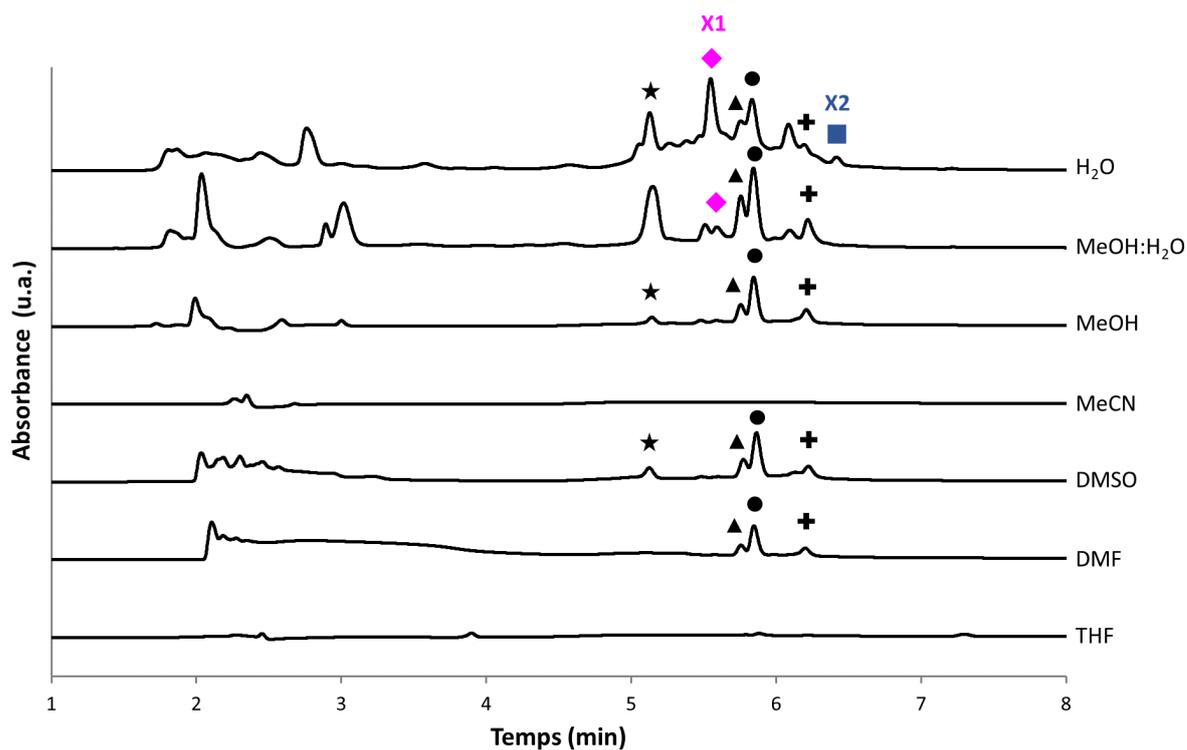


Figure D.8 - Chromatogrammes de l'extrait de *J. spicigera* avec différents solvants d'extraction.
 Phase stationnaire : Strategy™ C18-HQ. Phase mobile : A - H₂O 0,1 % HCOOH pH 3 / B - MeCN.
 Gradient : 5-95 % B de 0 à 5 min puis 95 % B de 5 à 10 min.
 Composés identifiés : ★ : A1; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; ■ : X2; + : F3.
 (Attributions correspondant au Tableau 3.1 du Chapitre 3)

Annexe E Définition des gradients génériques

Pour les analyses préliminaires en HPLC, des gradients génériques ont été définis en s'inspirant de conditions classiquement employées dans le cadre d'analyse de colorants (Chapitre 2, partie 1.1.3).

1 Choix du débit de la phase mobile

Le choix du débit de travail s'appuie sur l'équation de Van Deemter. La courbe de Van Deemter représente la hauteur équivalente à un plateau théorique, *HEPT* (définie par l'équation 2.5), en fonction de la vitesse linéaire de la phase mobile, *u*, et est régie par l'équation :

$$HEPT = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (E.1)$$

avec *A*, terme de diffusion turbulente, $\frac{B}{u}$, terme de diffusion moléculaire longitudinale et $C \cdot u$, terme de résistance au transfert de masse. Cette courbe est une hyperbole dont le minimum correspond à l'efficacité maximale du système chromatographique, pour une vitesse *u* optimale (et un débit optimal associé). Ces paramètres sont notamment dépendants du diamètre des particules, d_p : plus d_p est petit, meilleure est l'efficacité ($HEPT_{min}$ faible) et plus grande est la vitesse linéaire optimale (et donc le débit)(Figure E.1). Par conséquent, l'utilisation de particules de faible diamètre permet de travailler à des débits supérieurs, donc de faire des analyses plus rapides, sans perte d'efficacité.

Nous travaillons avec des colonnes dont le diamètre de particules du remplissage est de 5 μm ; d'après la courbe de Van Deemter pour des particules de ce diamètre, la vitesse linéaire optimale pour des colonnes de ce diamètre se trouve entre 0,8 et 1,5 mm/s [Desmet *et al.*, 2006, Grumbach *et al.*, 2009, Cielecka-Piontek *et al.*, 2013]. Cela correspond à un débit optimal, D_{opt} , compris entre 0,10 à 0,20 mL/min pour des colonnes de diamètre interne de 2,1 mm et de porosité 0,62ⁱ.

i. Calculé d'après $D_{opt} = u_{opt} \cdot S_{eff} = u_{opt} \cdot \pi \frac{d_c^2}{4} \cdot \epsilon$.

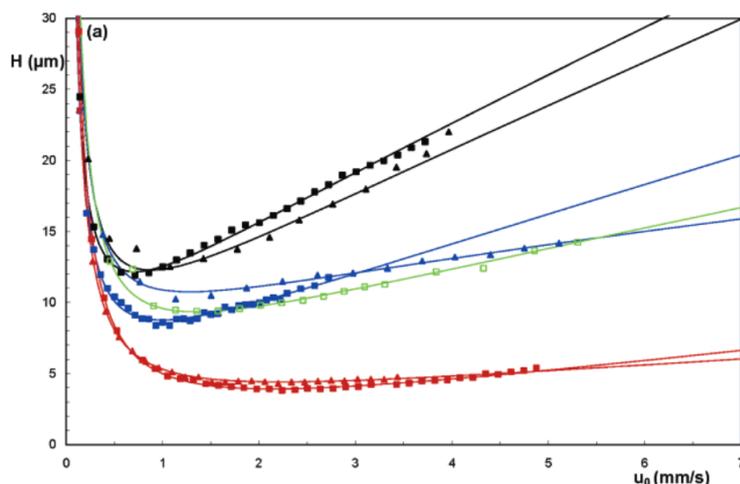


Figure E.1 - Influence de la taille des particules sur les courbes de Van Deemter.
Noir : 5 µm, Bleu : 3,5 µm, Rouge : 1,7 µm, Vert : Monolithe.
Figure extraite de [Desmet *et al.*, 2006]

Nous avons fait le choix de travailler en milieu de gamme à un **débit de 0,15 mL/min**.

2 Proportions en solvant organique

Des systèmes binaires hydro-organiques ont été utilisés comme phase mobile, avec comme modificateur organique de l'acétonitrile ou du méthanol.

Dans un premier temps, pour définir les proportions en solvant organique, des tests ont été réalisés avec la phase stationnaire HQ dans le système d'élution MeCN pH 3. Pour commencer, un long gradient de faible pente, de 5 à 95 % MeCN en 60 min, a été testé (chromatogramme non montré). L'ensemble des composés a été élué au bout d'une vingtaine de minutes : le temps de gradient a donc été raccourci de 60 à 30 min. Les divers composés étant bien répartis dans le gradient et plutôt bien résolus, la pente de 1,5 %/min a été conservée : le gradient générique dans l'acétonitrile a donc été défini comme 5 à 50 % MeCN en 30 min.

Pour créer un gradient en MeOH avec une gamme de rétention similaire à celle obtenue en MeCN, nous nous sommes appuyés sur les proportions d'isoéluance définies telles que $\%MeOH = 1,28 \cdot \%MeCN$ [Boyes et Dong, 2018, Stoll, 2020]. Ainsi, un premier gradient de 5 à 70% MeOH en 30 min a été testé. Cependant, dans ces conditions, les temps de rétention étaient bien supérieurs à ceux obtenus avec le gradient générique en MeCN. Il a donc été nécessaire d'augmenter la proportion de méthanol pour augmenter la force éluante de la phase mobile. De ce fait, une autre proposition de gradient générique de 5 à 80 % MeOH en 30 min a été adoptée. Elle a permis d'avoir des gammes de rétention comparables pour les deux modificateurs organiques (avec

des temps de rétention pour le composé le plus retenu de 20 et 25 min, respectivement dans MeCN et MeOH, voir Figure E.2).

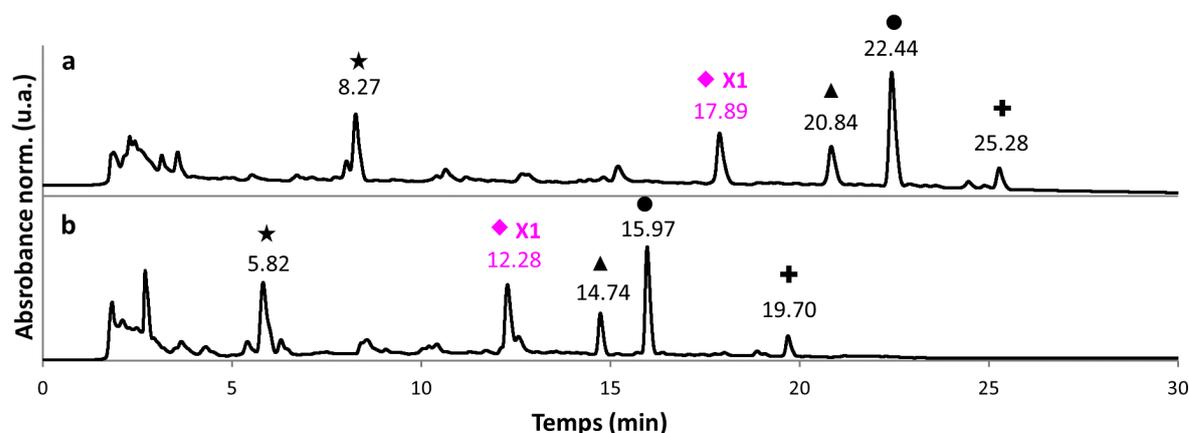


Figure E.2 – Chromatogrammes de l'extrait aqueux obtenus avec les gradients génériques (a) de MeOH, 5-80 % en 30 min et (b) de MeCN, 5-50 % en 30 min. Phase stationnaire : Uptisphere® Strategy™ C18-HQ. Phase mobile : HCOOH 0,1 % pH 3/solvant organique. Détection : DAD total scan 200-750 nm. Composés identifiés : ★ : A1; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; + : F3. (Attributions correspondant à la Table 3.1 du Chapitre 3)

Les gradients d'élution génériques ont ainsi été définis : de 5 à 50 % de MeCN en 30 min ou de 5 à 80 % de MeOH en 30 min, avec un débit de phase mobile de 0,15 mL/min.

3 Influence de l'ajout d'additif dans la phase organique

Pour les phases mobiles composées d'un mélange binaire hydro-organique, dans le cas de la présence d'additif (HCOOH ou HCOONH₄), celui-ci est peut être ajouté à la phase aqueuse et à la phase organique (exemple : MeCN HCOOH 0,1 % pH 3/H₂O HCOOH 0,1 % pH 3) ou uniquement à la phase aqueuse (exemple : MeCN/H₂O HCOOH 0,1 % pH 3).

Dans le cadre de notre étude d'optimisation et de comparaison des différents systèmes d'élution, afin de faciliter les manipulations en limitant la préparation de phases mobiles, nous avons envisagé l'utilisation de mélanges binaires où l'additif est seulement présent dans la phase aqueuse. De cette façon, les quatre voies du mélangeur de la pompe sont reliées aux bouteilles suivantes : pur méthanol, pur acétonitrile, solution aqueuse d'acide formique (à 0,1 %) et solution aqueuse de formiate d'ammonium (5 mM). Il est ainsi possible d'obtenir directement les quatre systèmes d'élution à l'étude sans manipulations supplémentaires de préparation de phase mobile. Cela aura évidemment un avantage considérable à l'échelle semi-préparative au vu des quantités de solvants consommées.

Nous avons donc cherché à vérifier que cette simplification n'avait pas de grosses incidences sur les séparations obtenues.

La figure E.3 présente les chromatogrammes de l'extrait aqueux obtenus pour l'acétonitrile dans les cas MeCN/H₂O HCOOH 0,1 % pH 3 (A) et MeCN HCOOH 0,1 % pH 3/H₂O HCOOH 0,1 % pH 3 (B). Peu de différences ont été constatées en termes de rétention, sélectivité et résolution. Pour faciliter les manipulations, nous avons donc choisi de travailler par la suite en ajoutant l'additif seulement à la phase aqueuse. Les mêmes résultats (non montrés) ont été obtenus à pH 8 et également dans le méthanol (pH 3 et pH 8).

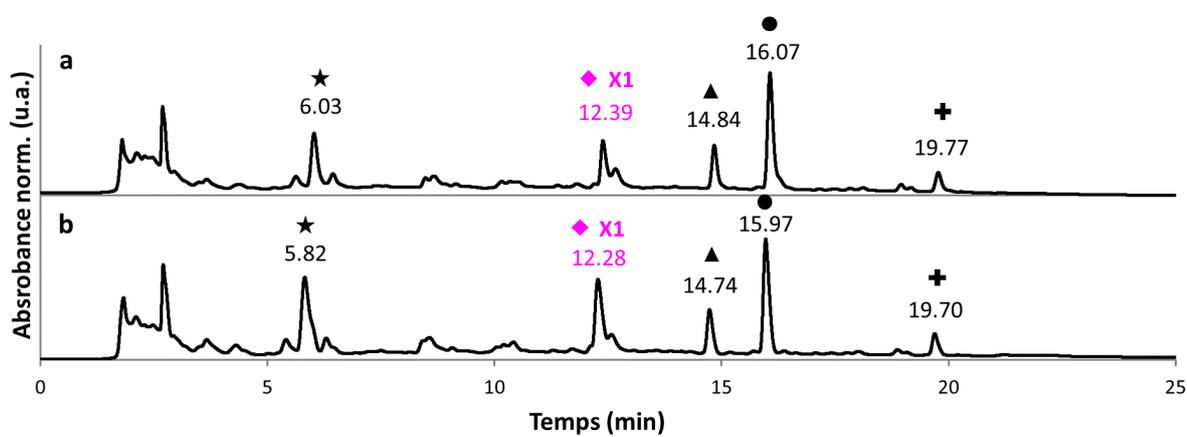


Figure E.3 – Chromatogrammes de l'extrait aqueux obtenus pour une phase mobile (a) H₂O HCOOH 0,1 % pH 3/MeCN (additif uniquement dans la phase aqueuse) et (b) H₂O HCOOH 0,1 % pH 3/MeCN HCOOH 0,1 % pH 3 (additif dans les phases aqueuse et organique).

**Phase stationnaire : Uptisphere® Strategy™ C18-HQ.
 Gradient : 5-50 % MeCN en 30 min. Détection : DAD total scan 200-750 nm.
 Composés identifiés : ★ : A1; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; + : F3.
 (Attributions correspondant à la Table 3.1 du Chapitre 3)**

Annexe F Données complémentaires sur les composés F1, F2, F3, etc.

1 Flavonols

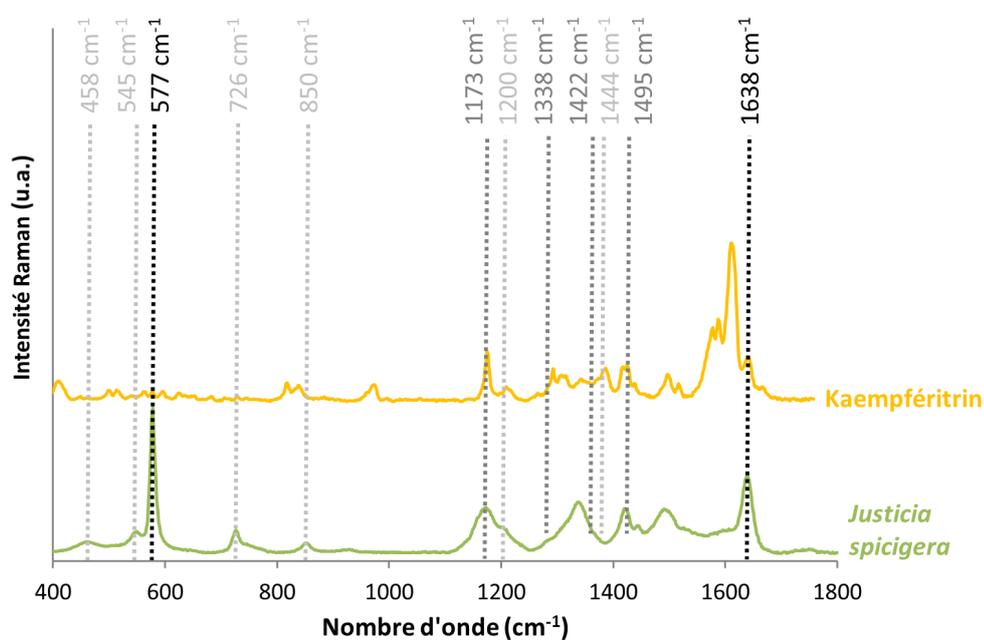
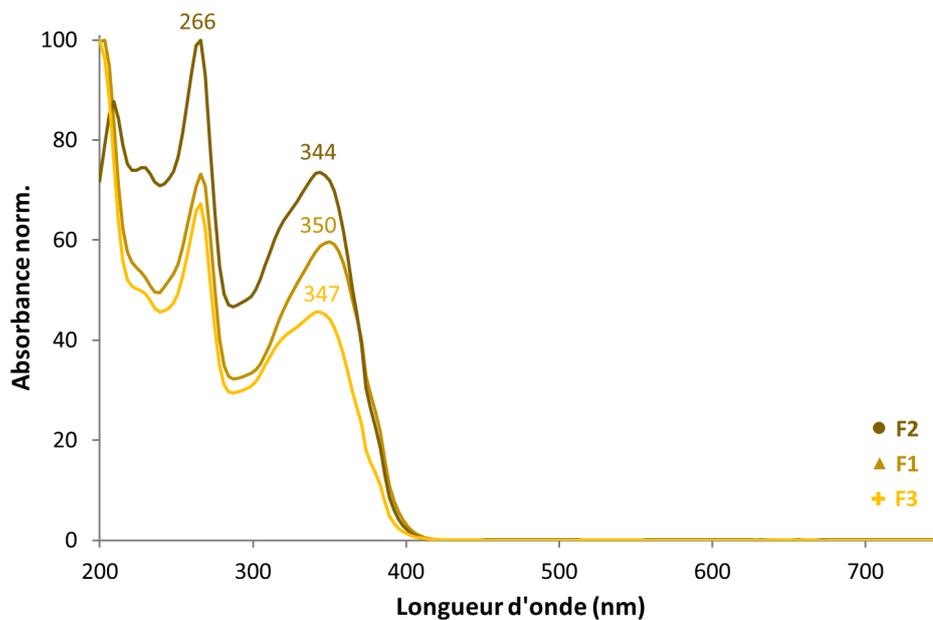
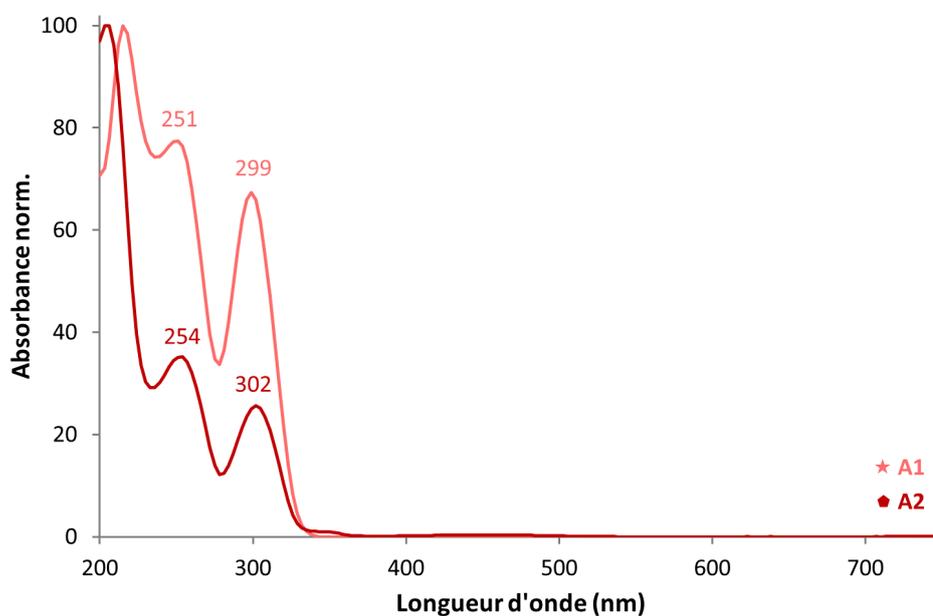


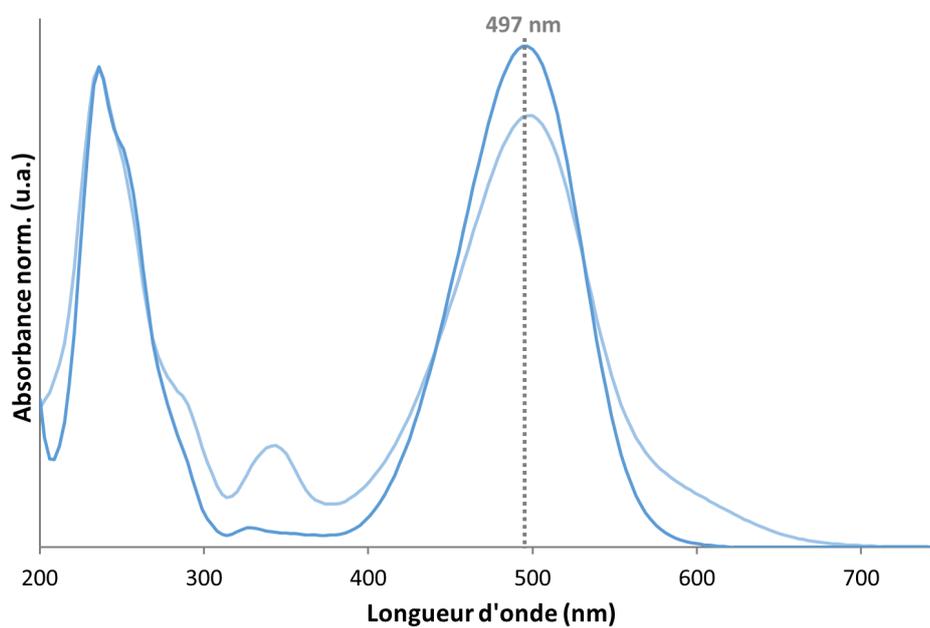
Figure F.1 – Spectres Raman d'un standard de kaempféritrine et de l'extrait de *J. spicigera*. Laser 532 nm. Soustraction de la ligne de base.



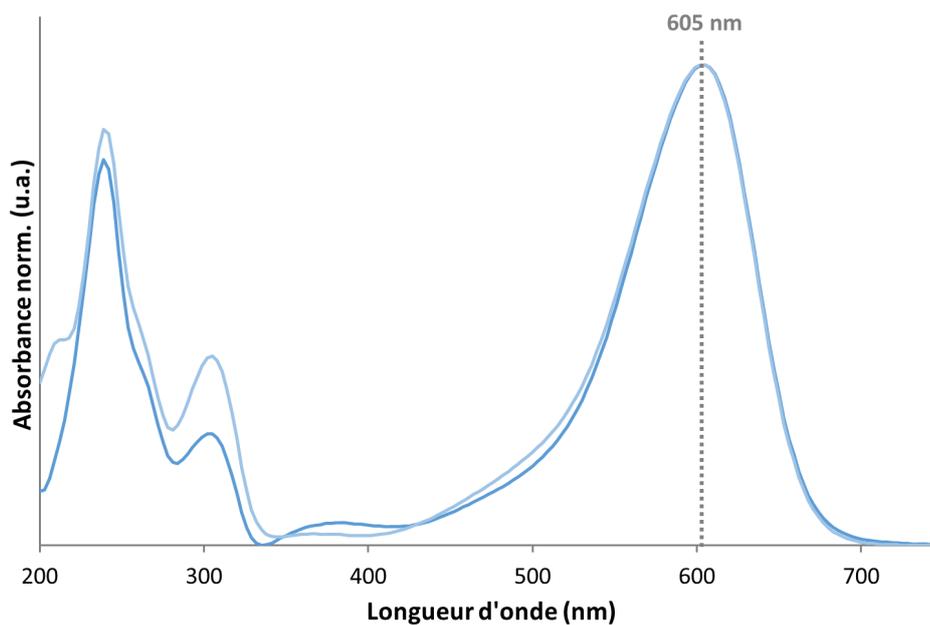
2 Dérivés amino-diméthoxyphénol



3 Autres composés



(a) Spectres d'absorption UV-Vis à pH 3



(b) Spectres d'absorption UV-Vis à pH 8

Figure F.4 – Spectres d'absorption UV-Vis des composés $[M+H]^+$ m/z 358, notamment détectés dans le chromatogramme Figure 3.15 du Chapitre 3.

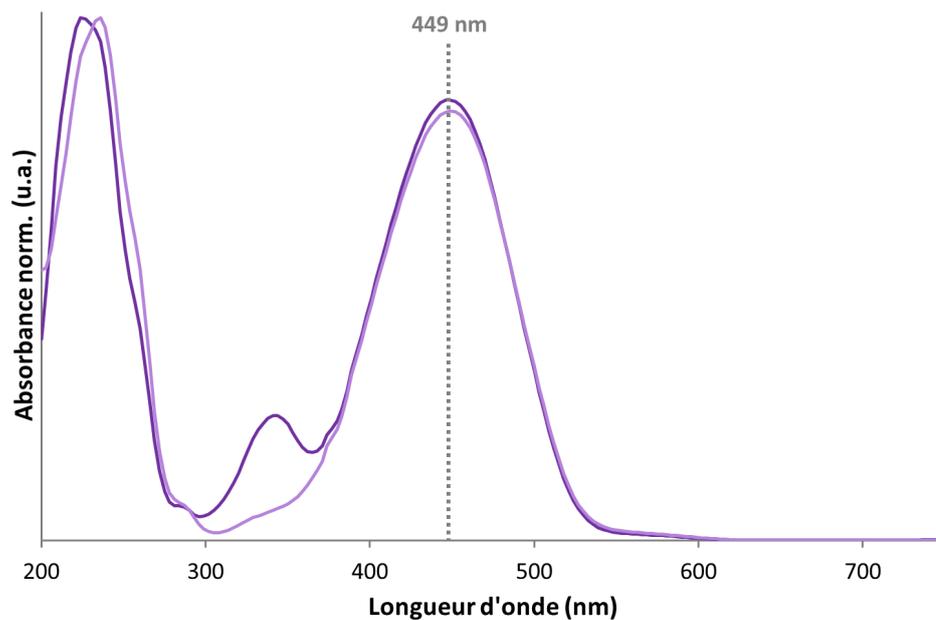


Figure F.5 – Spectre d'absorption UV-Vis des composés $[M+H]^+$ m/z 359 à pH 3, notamment détectés dans le chromatogramme Figure 3.15 du Chapitre 3.

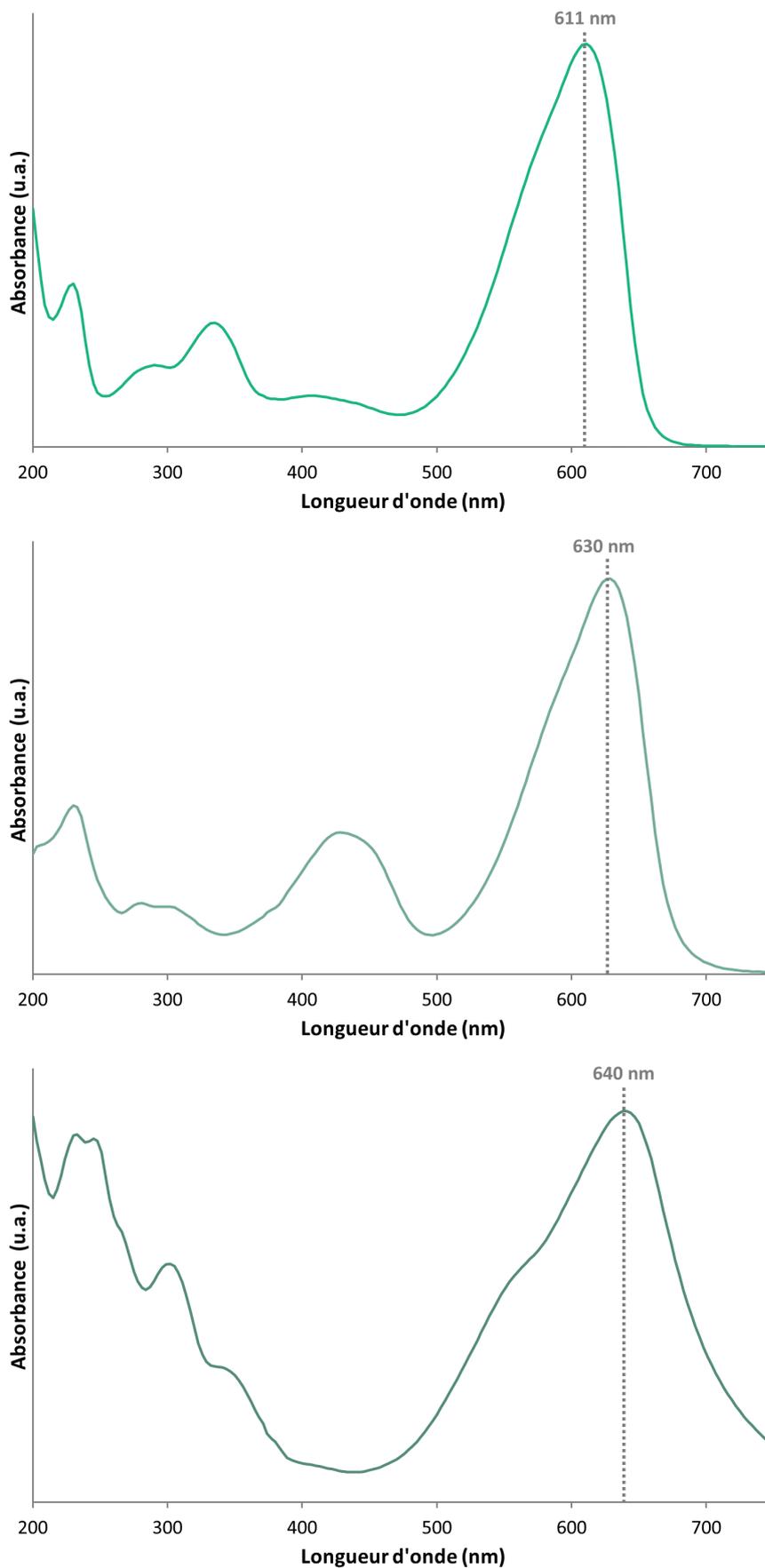


Figure F.6 – Exemples de spectres d'absorption UV-Vis à pH 8 d'autres composés minoritaires présents à des temps de repos longs.

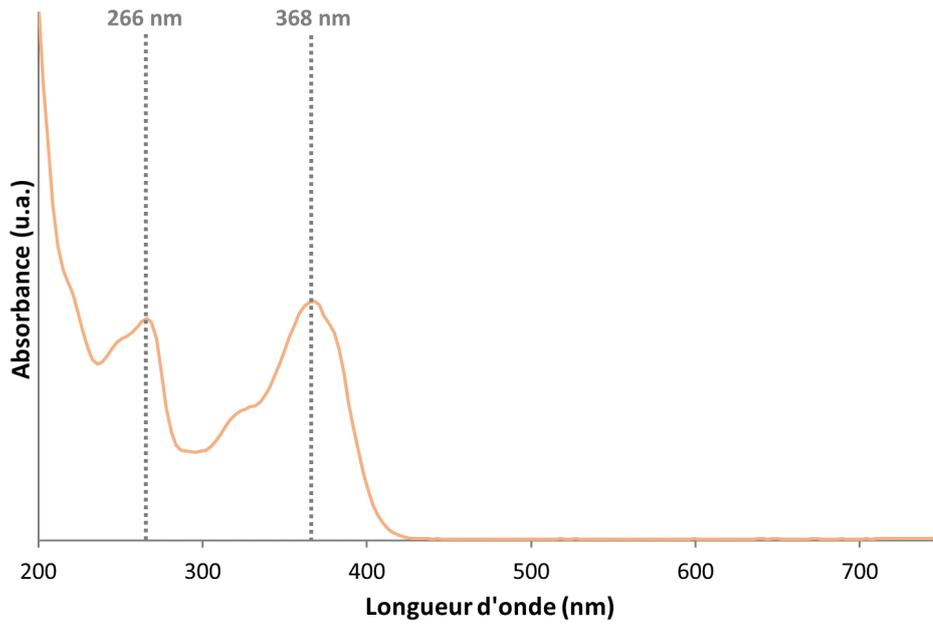


Figure F.7 – Spectre d’absorption UV-Vis du composé détecté dans le chromatogramme Figure 3.31 du Chapitre 3, lors du vieillissement à la lumière d’un dépôt de solution du papier.

Annexe G Évolution de la composition de la solution : données complémentaires

Nous avons mis en évidence que la concentration des composés colorés, notamment X1 et X2, dans l'extrait aqueux évoluait en fonction du temps de repos de la solution (après avoir retiré les feuilles) (Figure 3.15, partie 3.3). En complément, les chromatogrammes obtenus en détection total scan pour différents temps de repos sont présentés en Figure G.1. Aucune évolution notable des autres composés de l'extrait, tels que les flavonols, n'a été observée.

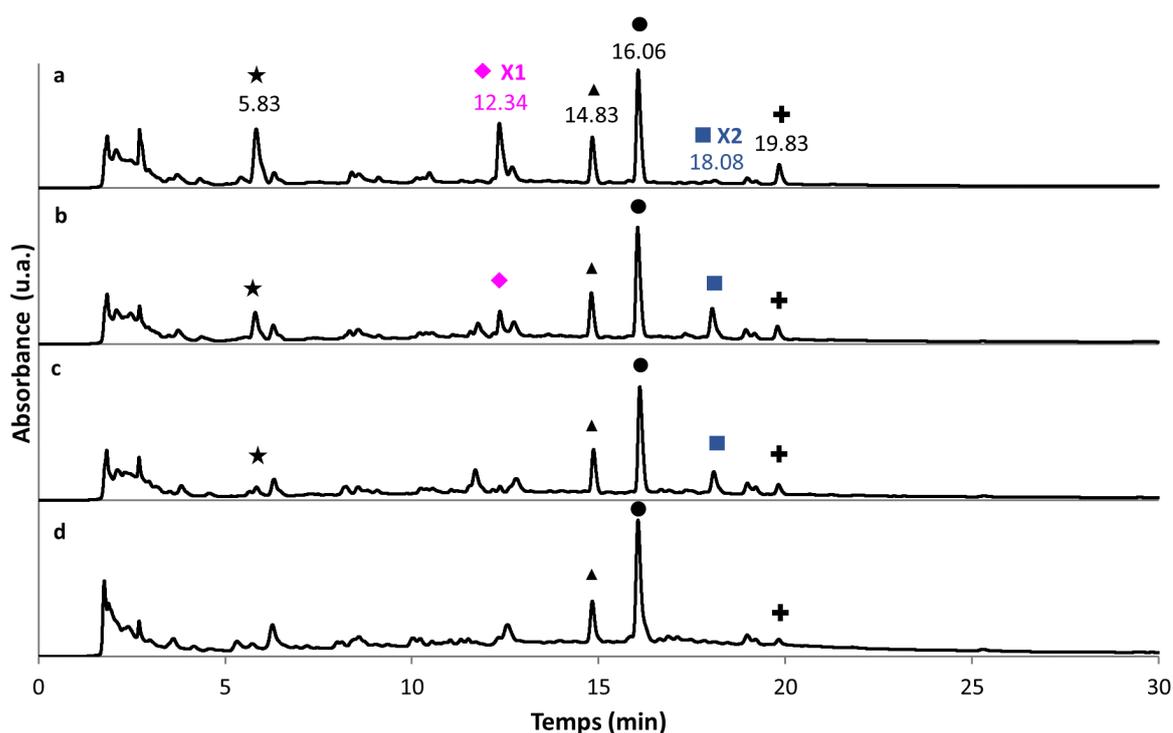


Figure G.1 – Chromatogrammes de l'extrait aqueux pour des temps de repos distincts : 10 min, 5 h, 8 h et 6 jours.

Phase stationnaire : Strategy™ C18-HQ. Phase mobile : A - H₂ 0,1 % HCOOH / B - MeCN. Gradient : 5-50 % B de 0 à 30 min puis 50 % B de 30 à 40 min. Détection : DAD Total scan 200-750 nm.

Composés identifiés : ★ : A1; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; ■ : X2; + : F3.
(Attributions correspondant au Tableau 3.1)

Afin d'identifier plus précisément les temps de repos maximisant les quantités des composés X1 et X2, un suivi de l'évolution a été réalisé entre 0 et 760 min (environ 12,5 heures). Un gradient d'élution raccourci a été utilisé pour permettre des points rapprochés en début de réaction d'évolution. Les aires intégrées pour les composés X1 et X2 ont été extraites et tracées en fonction du temps de repos pour trois expériences indépendantes (pour un même lot de feuilles). Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure G.2.

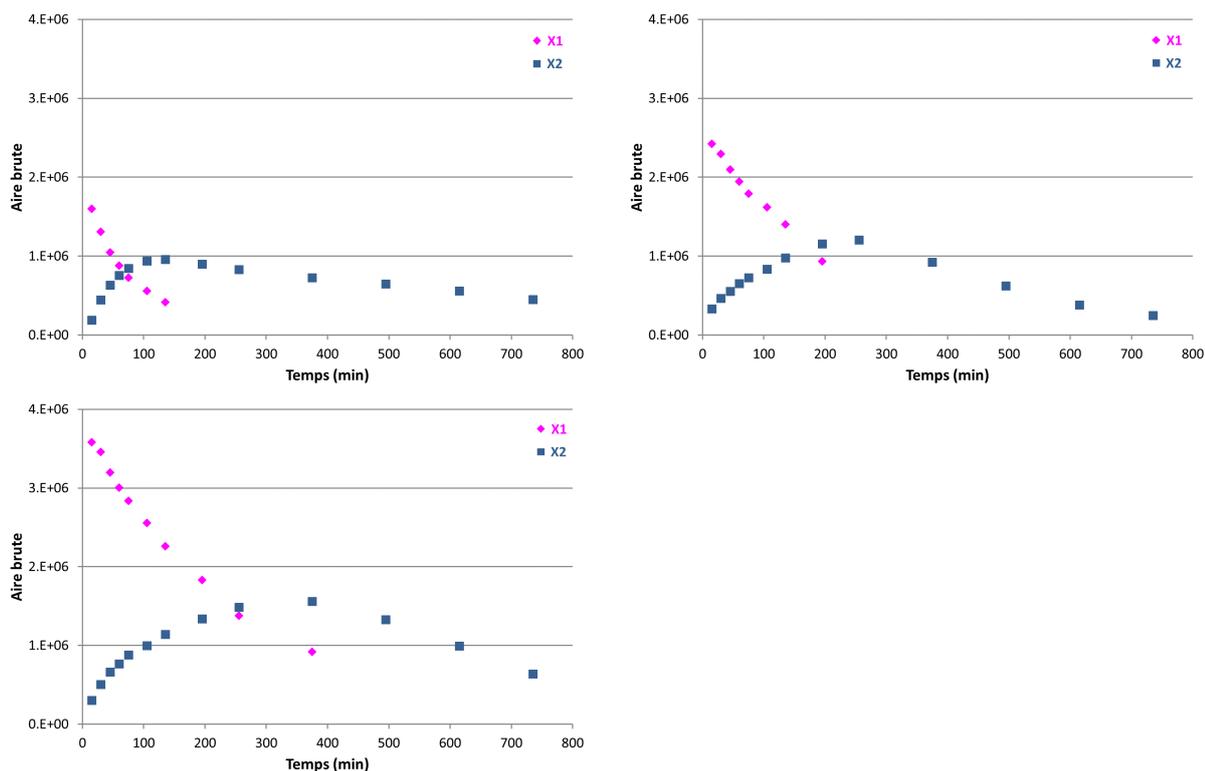


Figure G.2 – Aires des composés X1 et X2 en fonction du temps pour trois expériences indépendantes

Pour les trois expériences, la concentration maximale du composé X1 a été atteinte pour le temps de repos le plus faibleⁱ. Sa concentration diminue ensuite jusqu'à ne plus être détectable. Quant à la concentration du composé X2, elle augmente du début du temps de repos jusqu'à 200-300 min, avant de diminuer également jusqu'à des valeurs très faibles. Il semblerait que la diminution de la concentration en X1 se fait au profit de celle en X2.

Si la tendance d'évolution est commune aux trois expériences, nous pouvons constater une absence de répétabilité exacte de l'expérience : la décroissance de X1 est plus ou moins rapide selon les cas, et le pic en concentration de X2 est atteint pour des temps

ⁱ. Les temps incompressibles de macération et de filtration de l'extrait avant son injection, ne nous ont pas permis de réaliser d'analyse en moins de 10 min après le début de l'extraction.

de repos variables. Cette variation pourrait provenir de l'inhomogénéité de l'échantillon solide (différence de composition entre limbe et nervures des feuilles) ou de la variabilité de composition interfeuilles.

Lors de la phase d'isolement des composés d'intérêt, on a cherché à se placer dans des conditions maximisant la quantité des composés à purifier. Malgré la non-répétabilité de l'évolution constatée, se placer dans de telles conditions n'a pas été problématique. En effet, même si l'aire du composé n'était pas exactement à son maximum, les valeurs restaient satisfaisantes sur une fenêtre de temps suffisamment large.

Annexe H Chromatogrammes supplémentaires : HPLC-FLD

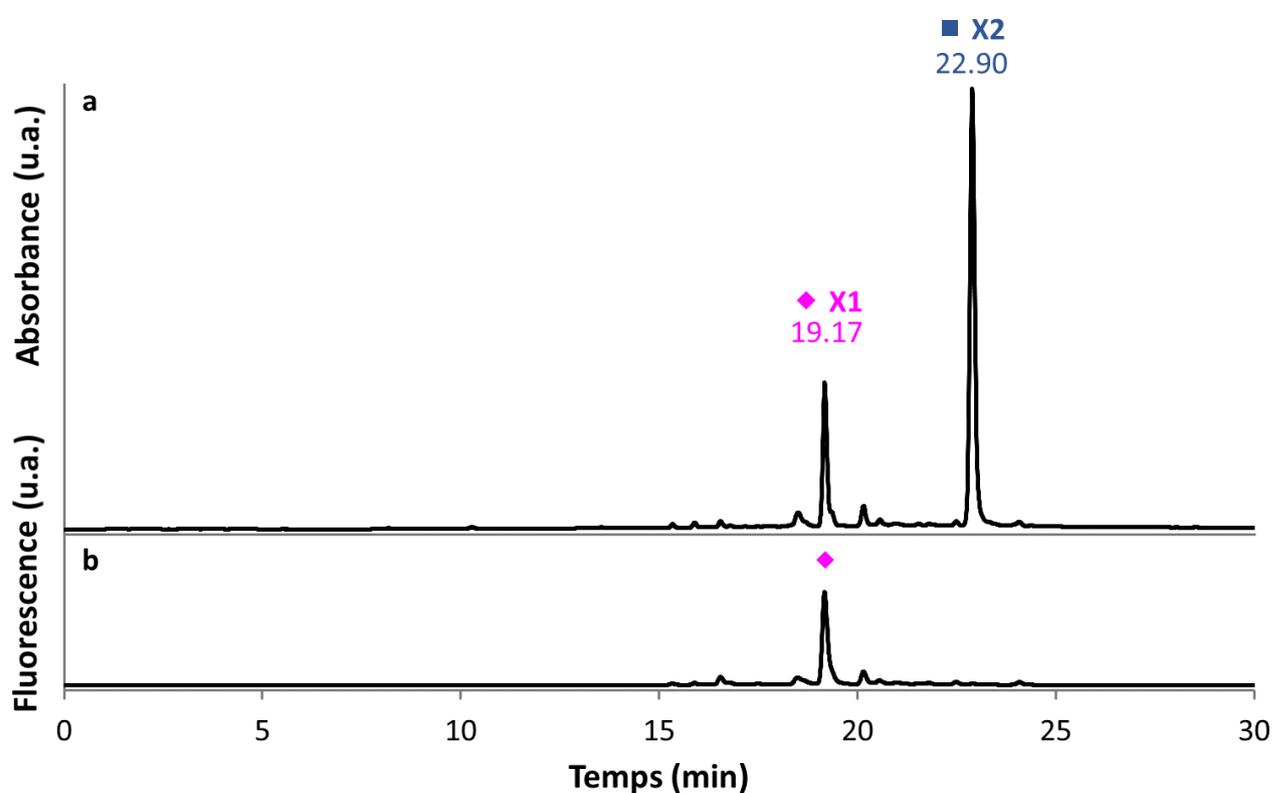


Figure H.1 - Chromatogrammes de l'extrait aqueux de *J. spicigera* a) Détection DAD 485 nm et b) Détection FLD $\lambda_{ex} = 500$ nm et $\lambda_{em} = 600$ nm
Phase stationnaire : Aquasil C18. Phase mobile : A - HCOOH 0,1 % pH 3 / B - MeCN. Gradient : 0 % de B de 0 à 1 min; 0-60 % B de 1 à 41 min. Débit : 0,3 mL/min.
Composés identifiés : ◆ : X1; ■ : X2.

Annexe I Optimisation des conditions de ré-extraction du colorant après dépôt sur papier

Afin de pouvoir évaluer analyser la composition moléculaire du colorant après son dépôt sur support, un protocole de réextraction du colorant a été établi.

Les performances de quatre solvants extracteurs (H₂O, H₂O/MeOH 50/50, MeOH et DMSO) ont été comparées vis-à-vis du rendement d'extraction des composés colorés, X1 et X2.

Un extrait de *Justicia spicigera* a été préparé selon le protocole habituel (décrit dans la partie 2.2.1). Une partie de la solution filtrée a été directement analysée par HPLC-DAD et une autre partie a été utilisée pour réaliser des dépôts de 20 µL sur du papier Whatman 1. Après leur séchage, les dépôts ont été découpés en morceaux et immergés dans 200 µL de solvant extracteur pendant 20 min. Les solutions résultantes ont ensuite été prélevées, filtrées et analysées en HPLC-DAD. Les aires des pics des composés X1 et X2 ont été intégrées pour l'extrait aqueux obtenu par macération des feuilles et pour les solutions du colorant réextrait par les différents solvants testés. Les rapports de l'aire réextraite sur l'aire du composé dans l'extrait aqueux ont été calculés en pourcentage pour chaque solvant extracteur.

Cette expérience a été réalisée en triplicat, avec trois préparations indépendantes d'extrait aqueux à partir de feuilles de *Justicia spicigera*. Les moyennes des rapports obtenus pour les trois expériences sont présentées dans la Figure I.1.

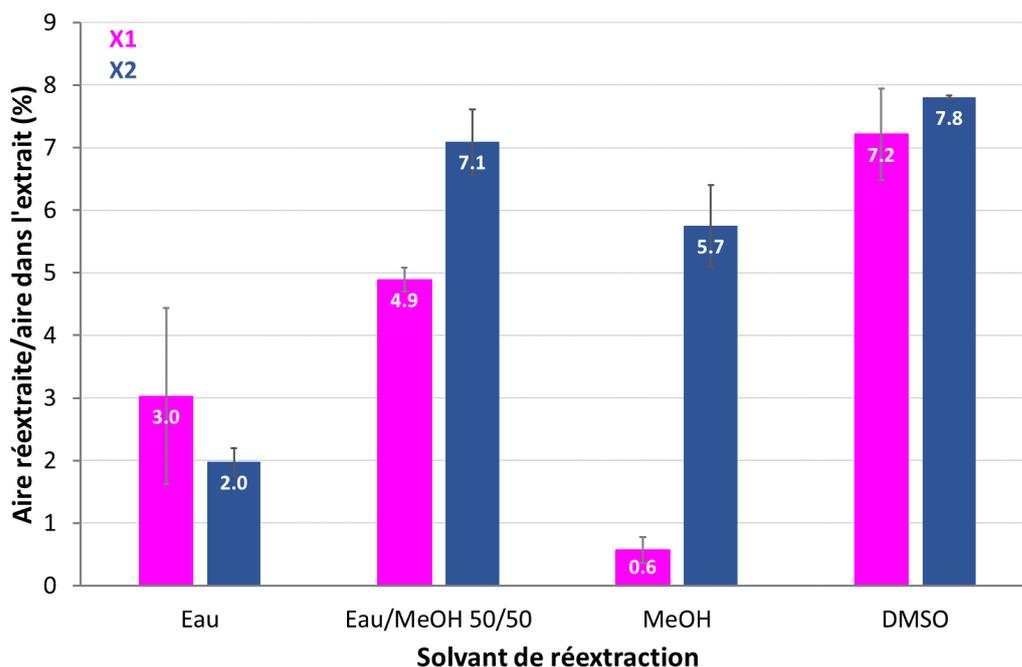


Figure I.1 – Moyennes des rapports des aires des pics des composés X1 et X2 dans les solution réextraites sur leurs aires dans l'extrait aqueux brut.

Pour les quatre solvants, les rendements de réextraction obtenus sont assez faibles (inférieurs à 10 %). Les meilleurs résultats pour les deux composés semblent obtenus avec le DMSO. Cependant, pour éviter les soucis liés à l'injection en HPLC de larges volumes de DMSO, très éluant, nous avons fait le choix de travailler avec un mélange eau-méthanol 50/50.

La répétabilité du protocole avec le solvant extracteur ainsi choisi a été évaluée pour la réextraction de cinq dépôts sur papier à partir d'un même extrait aqueux brut. Les coefficients de variation obtenus étaient d'environ 7 et 4 % respectivement pour X1 et X2. Nous les avons jugés satisfaisants pour le suivi semi-quantitatif de la composition que nous cherchions à mettre en place.

Annexe J Pigments laqués

Afin d'obtenir le colorant sous forme de poudre, des essais de fabrications de pigments laqués ont été réalisés.

Un pigment laqué consiste en un support minéral sur lequel est précipité un colorant organique, pour le rendre insoluble. Cela permet notamment une facilité de stockage et d'application en couches picturales couvrantes.

Une solution d'alun $KAl(SO_2)_4$ à 10 % massique, ainsi que deux solutions alcalines (Na_2CO_3 et $Ca(OH)_2$, toutes deux à 2,5 % massique) ont tout d'abord été préparées.

Un extrait de *Justicia spicigera* a été préparé selon le protocole classiquement réalisé dans ce mémoire et décrit dans la partie 2.2.1.

Ensuite, 50 mL d'extrait aqueux de *J. spicigera* ont été mélangés à 50 mL de la solution d'alun, puis 65 mL de solution alcaline ont été ajoutés goutte-à-goutte, sous agitation. La solution résultante a été laissée au repos quelques heures puis filtrée. La pâte obtenue a été mise à sécher à l'air libre, puis réduite en poudre avec un pilon et un mortier en agate. Les poudres obtenues ont ensuite été dispersées dans deux liants (gomme arabique et colle de maïs, préparation détaillée dans la partie 2.2.5) et appliquées en peinture sur du papier Whatman 1 préalablement enduit d'une préparation de gypse (préparation détaillée dans la partie 2.2.5) ou non.

Cinq préparations différentes ont été mises en œuvre :

- A : extrait de *Justicia spicigera* frais brut (pH 8) + alun + carbonate de sodium
- B : extrait de *Justicia spicigera* frais brut (pH 8) + alun + hydroxyde de calcium
- C : extrait de *Justicia spicigera* reposⁱ brut (pH 8) + alun + carbonate de sodium
- D : extrait de *Justicia spicigera* frais pH 10 + alun + carbonate de sodium
- E : extrait de *Justicia spicigera* frais pH 4 + alun + carbonate de sodium

i. Pour rappel, en opposition aux extraits frais qui sont employés quelques heures après que l'extraction ait été réalisée, les extraits subissent des temps de repos de un à plusieurs jours.



Figure J.1 - Peintures obtenues à partir de pigments laqués dans les liants gomme arabique et colle de maïs sur des papiers préparés ou non au gypse.

Annexe K Systèmes 1D : données complémentaires

Les performances des cinq phases stationnaires à l'étude ont été comparées dans les quatre systèmes d'élution disponibles : MeOH pH 3, MeCN pH 3, MeOH pH 8 et MeCN pH 8. En complément de la Figure 4.1 pour MeOH pH 3 (Chapitre 4, partie 2.2.1), les résultats obtenus pour les trois autres systèmes d'élution sont présentés dans les Figures K.1, K.2 et K.3.

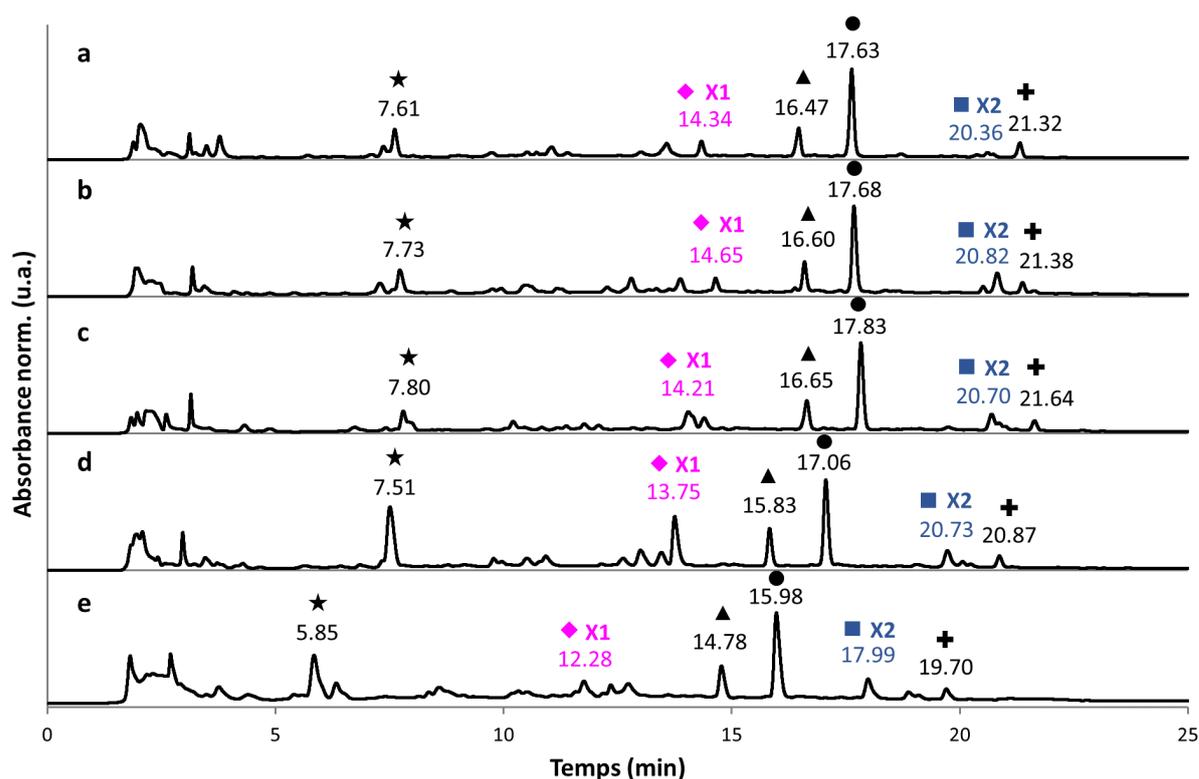


Figure K.1 – Chromatogrammes de l'extrait aqueux de *J. spicigera* pour les cinq phases stationnaires à l'étude : (a) puriFlash® C18-AQ (b) Uptisphere® C18-NEC (c) Uptisphere® Strategy™ C18-RP (d) puriFlash® C18-XS et (e) Uptisphere® Strategy™ C18-HQ. Phase mobile : HCOOH 0,1 % pH 3 / MeCN. Gradient : 5-50 % MeCN de 0 à 30 min. Détection : DAD 200-750 nm total scan. Composés identifiés : ★ : A1; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; ■ : X2; + : F3. (Attributions correspondant au Tableau 3.1 du Chapitre 3)

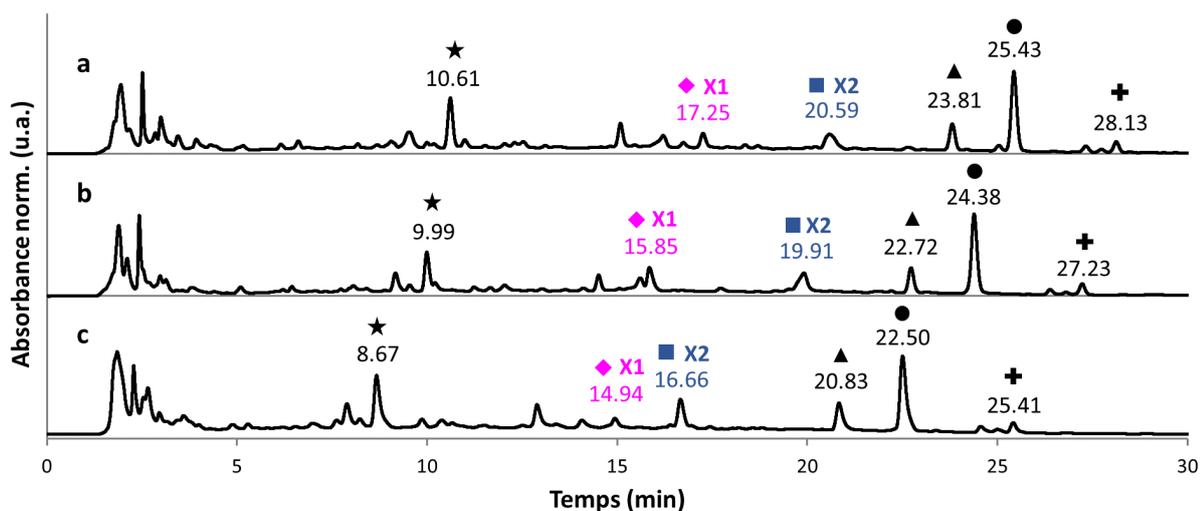


Figure K.2 – Chromatogrammes de l'extrait aqueux de *J. spicigera* pour les trois phases stationnaires à l'étude compatibles avec pH 8 : (a) Uptisphere® Strategy™ C18-RP (b) puriFlash® C18-XS et (c) Uptisphere® Strategy™ C18-HQ.
 Phase mobile : HCOONH₄ 5 mM pH 8 / MeOH. Gradient : 5-80 % MeOH de 0 à 30 min.
 Détection : DAD 200-750 nm total scan.
 Composés identifiés : ★ : A1; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; ■ : X2; + : F3.
 (Attributions correspondant au Tableau 3.1 du Chapitre 3)

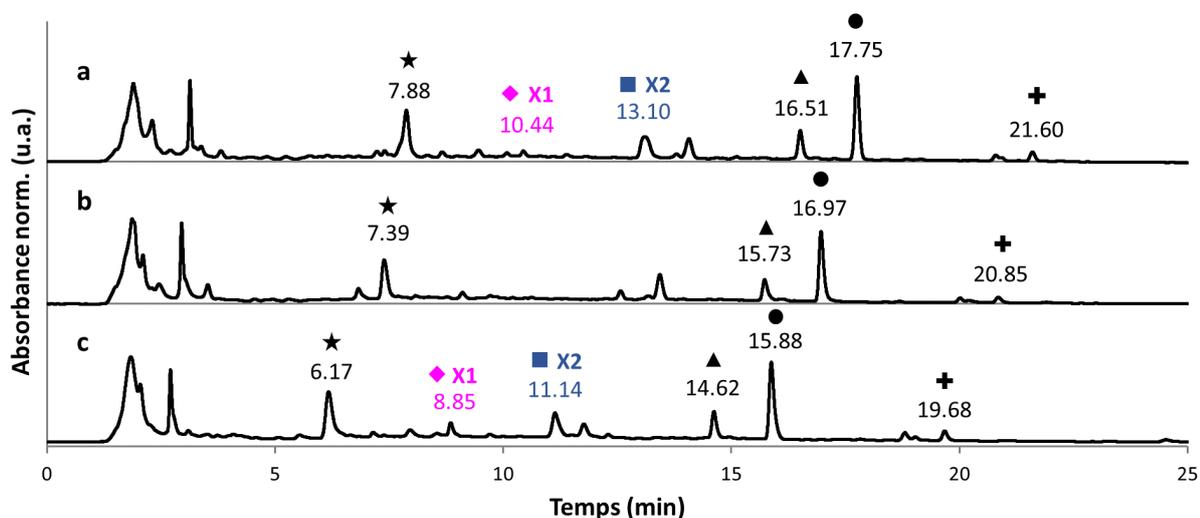


Figure K.3 – Chromatogrammes de l'extrait aqueux de *J. spicigera* pour les trois phases stationnaires à l'étude compatibles avec pH 8 : (a) Uptisphere® Strategy™ C18-RP (b) puriFlash® C18-XS et (c) Uptisphere® Strategy™ C18-HQ.
 Phase mobile : HCOONH₄ 5 mM pH 8 / MeCN. Gradient : 5-50 % MeCN de 0 à 30 min.
 Détection : DAD 200-750 nm total scan.
 Composés identifiés : ★ : A1; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; ■ : X2; + : F3.
 (Attributions correspondant au Tableau 3.1 du Chapitre 3)

Annexe L *Peristrophe bivalvis*

1 Données taxonomiques et distribution géographique

Peristrophe bivalvis (ou *Lá Cam*, pour l'appellation vernaculaire en vietnamien) est une espèce de la famille des Acanthacées, employée au Vietnamien pour la coloration de plats traditionnels en violet [Khue *et al.*, 2014].

Tableau L.1 – Classification et synonymes botaniques, d'après *Plants of the World Online* [noa, d].
≡ pour les synonymes homotypiques (ou nomenclaturaux) et = pour les synonymes hétérotypiques (ou taxinomiques).

Règne	Plantae
Phylum	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Acanthaceae
Genre	<i>Dicliptera</i>
Espèce	<i>Dicliptera tinctoria</i> (Nees) Kostel.
≡	<i>Dicliptera sivarajanii</i> Karthik. & Moorthy
≡	<i>Justicia tinctoria</i> Roxb.
≡	<i>Peristrophe tinctoria</i> Nees
=	<i>Adeloda integra</i> Raf.
=	<i>Dicliptera babui</i> Karthik. & Moorthy
=	<i>Justicia baphica</i> Spreng.
=	<i>Justicia bivalvis</i> L.
=	<i>Justicia purpurea</i> Lour.
=	<i>Justicia roxburghiana</i> Schult.
=	<i>Peristrophe baphica</i> (Spreng.) Bremek.
=	<i>Peristrophe bivalvis</i> (L.) Merr.
=	<i>Peristrophe dalaora</i> Nees
=	<i>Peristrophe roxburghiana</i> (Schult.) Bremek.



Figure L.1 – Distribution géographique d'après *Plants of the World Online* [noa, d].

2 Analyse de l'extrait par HPLC-DAD-MS

Faute de pouvoir se procurer un standard de péricisbivalvine B, nous avons cherché à comparer les propriétés du composé X2 (rétention ou spectres MS et MS-MS) avec celles du colorant de *Peristrophe bivalvis*, dans lequel est présente la péricisbivalvine B.

Un extrait de *Peristrophe bivalvis* a été préparé à partir de poudre de feuilles destinée à un usage alimentaire (Lotus Marché, Palaiseau, France). 0,01 g de poudre a été extrait avec 200 μ l d'eau ultra-pure pendant 5 min, à température ambiante. L'extrait a été filtré avec un filtre PTFE hydrophile de 0,20 μ m (Millipore, Burlington, MA, USA).

Les chromatogrammes obtenus pour les deux extraits, *J. spicigera* et *P. bivalvis*, sont comparés dans les Figures L.3 et L.2.

Nous retrouvons dans l'extrait de *Peristrophe bivalvis* des composés à des temps de rétention identiques à ceux des composés X1 et X2. Leurs spectres de rétention (non montrés) sont également en adéquation. Les spectres de fragmentation MS² des ions [M+H]⁺ à m/z 259 et 404 obtenus pour les deux extraits sont également identiques (Figure L.4).

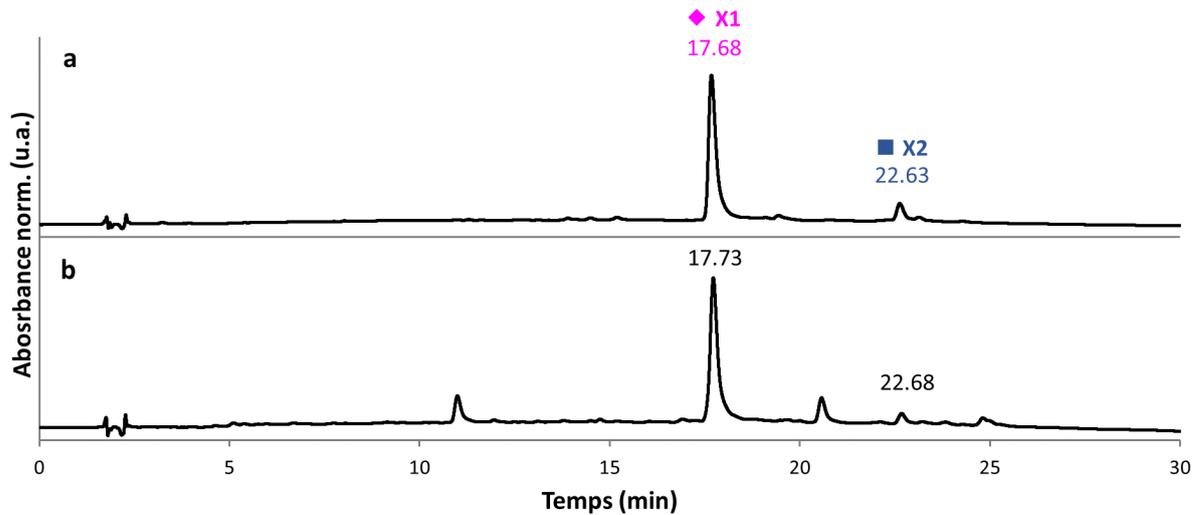


Figure L.2 – Chromatogrammes des extraits de *J. spicigera* (a) et *P. bivalvis* (b).
Phase stationnaire : Uptisphere® Strategy™ C18-HQ. Phase mobile : A - HCOOH 0,1 % pH 3 / B - MeOH. Gradient : 5-80 % B de 0 à 30 min.
Détection : DAD Visible 400-750 nm.

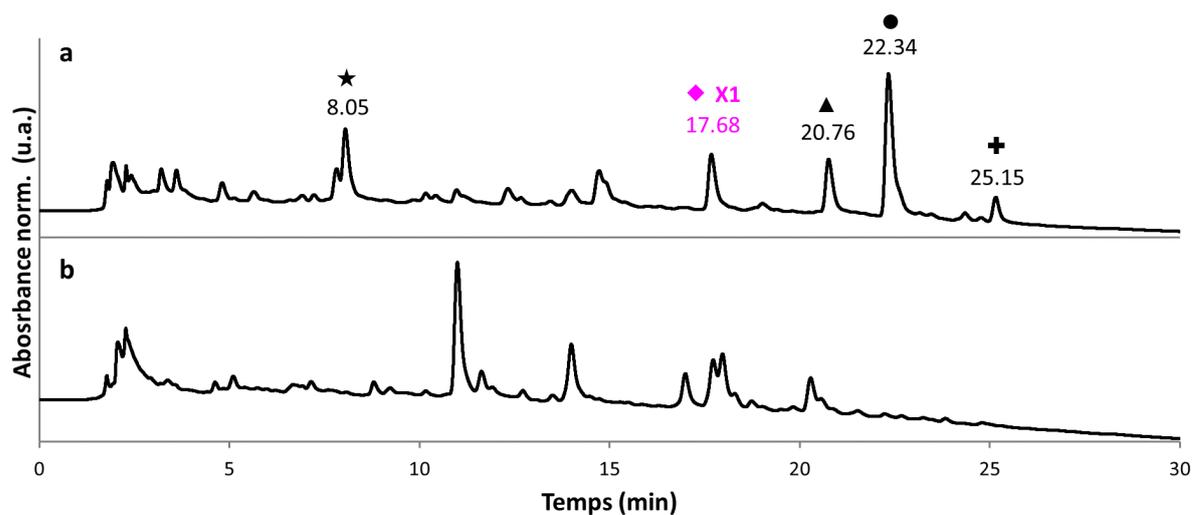


Figure L.3 – Chromatogrammes des extraits de *J. spicigera* (a) et *P. bivalvis* (b).
Phase stationnaire : Uptisphere® Strategy™ C18-HQ. Phase mobile : A - HCOOH 0,1 % pH 3 / B - MeOH. Gradient : 5-80 % B de 0 à 30 min.
Détection : DAD 200-750 nm total scan.
Composés identifiés : ★ : A1; ● : A2; ◆ : X1; ▲ : F1; ● : F2; ■ : X2; + : F3.
(Attributions correspondant au Tableau 3.1, Chapitre 3)

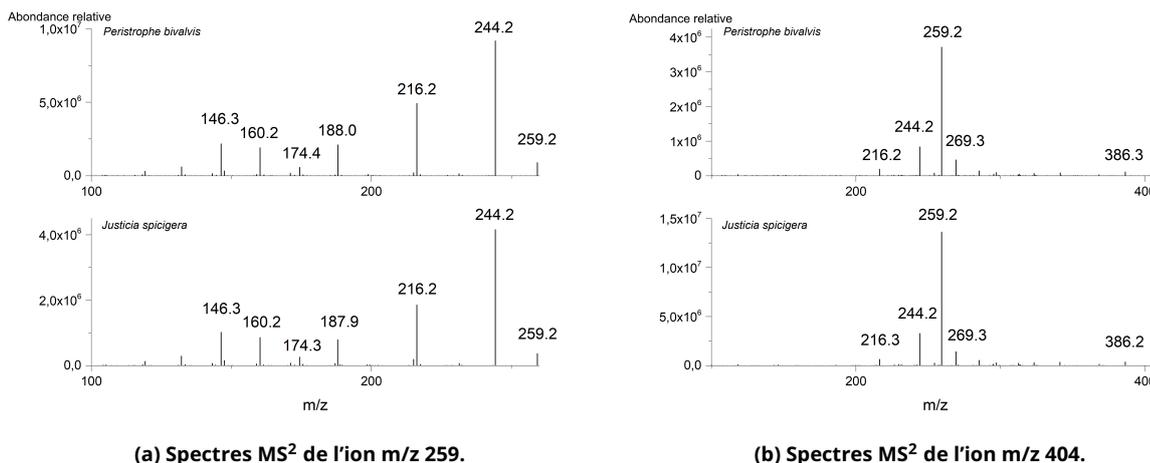


Figure L.4 – Spectres MS² des ions à m/z 259 et 404 pour les extraits de *J. spicigera* et *P. bivalvis*. Énergie de collision (CE) 30 eV.

Nous pouvons ainsi considérer que les composés X1 et X2 sont communs aux extraits colorés de *Justicia spicigera* et *Peristrophe bivalvis*. On peut noter que le composé n'avait jamais été reporté à ce jour dans un extrait de *Peristrophe bivalvis*.

Par ailleurs, nous avons également mis en évidence que l'extrait de *Peristrophe bivalvis* présente une évolution de sa composition moléculaire au cours d'un temps de repos, comme l'extrait de *Justicia spicigera*. Le composé à t_R 17,7 min, assimilé à X1 est majoritaire pour des temps de repos proche du début de l'extraction et sa concentration diminue au cours du temps au profit du composé à t_R 22,7 min, assimilé à X2 (Figure L.5).

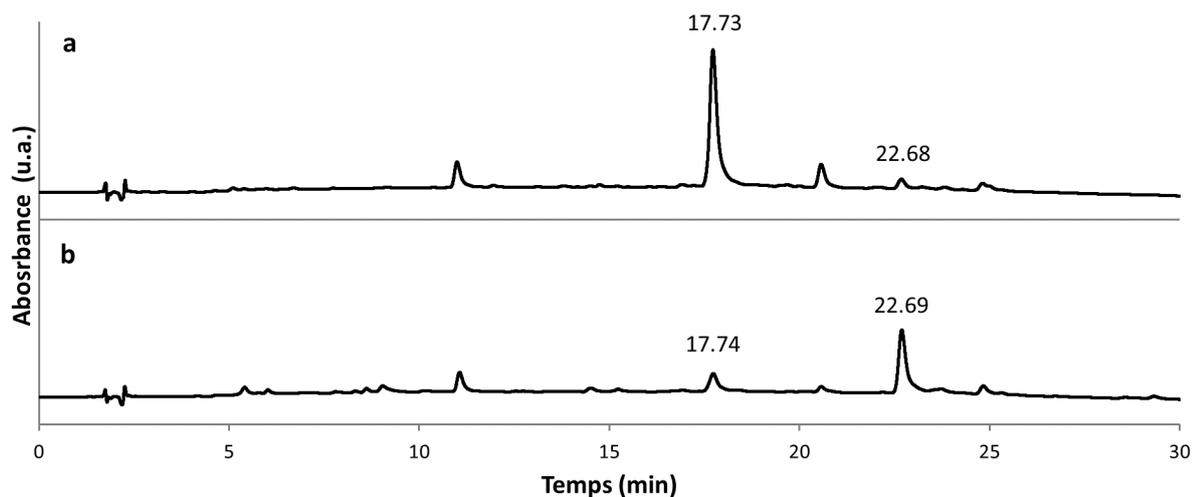


Figure L.5 – Chromatogrammes d'extrait aqueux de *J. spicigera* *P. bivalvis* pour un temps de repos de (a) 15 min et (b) 3 h.

Phase stationnaire : Uptisphere® Strategy™ C18-HQ. Phase mobile : A - HCOOH 0,1 % pH 3 / B - MeOH. Gradient : 5-80 % B de 0 à 30 min. Détection : DAD Visible 400-750 nm.

Annexe M Spectres RMN

1 Composé X2

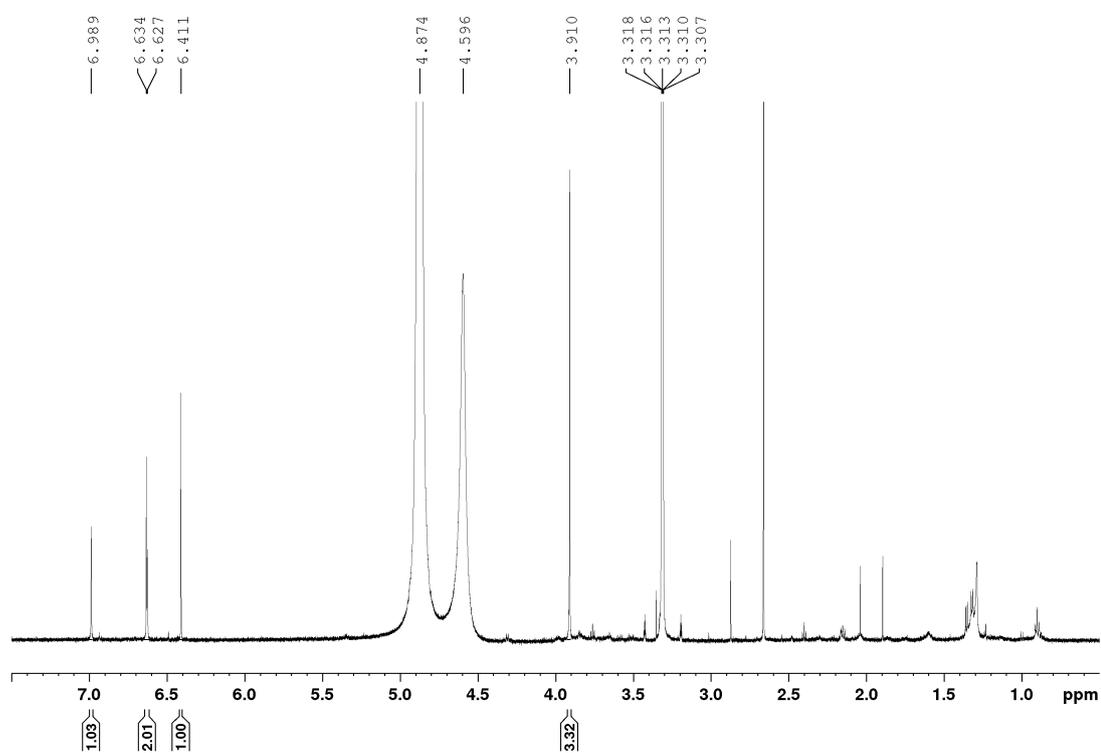


Figure M.1 – Spectre RMN ^1H du composé X2 dans CD_3OD

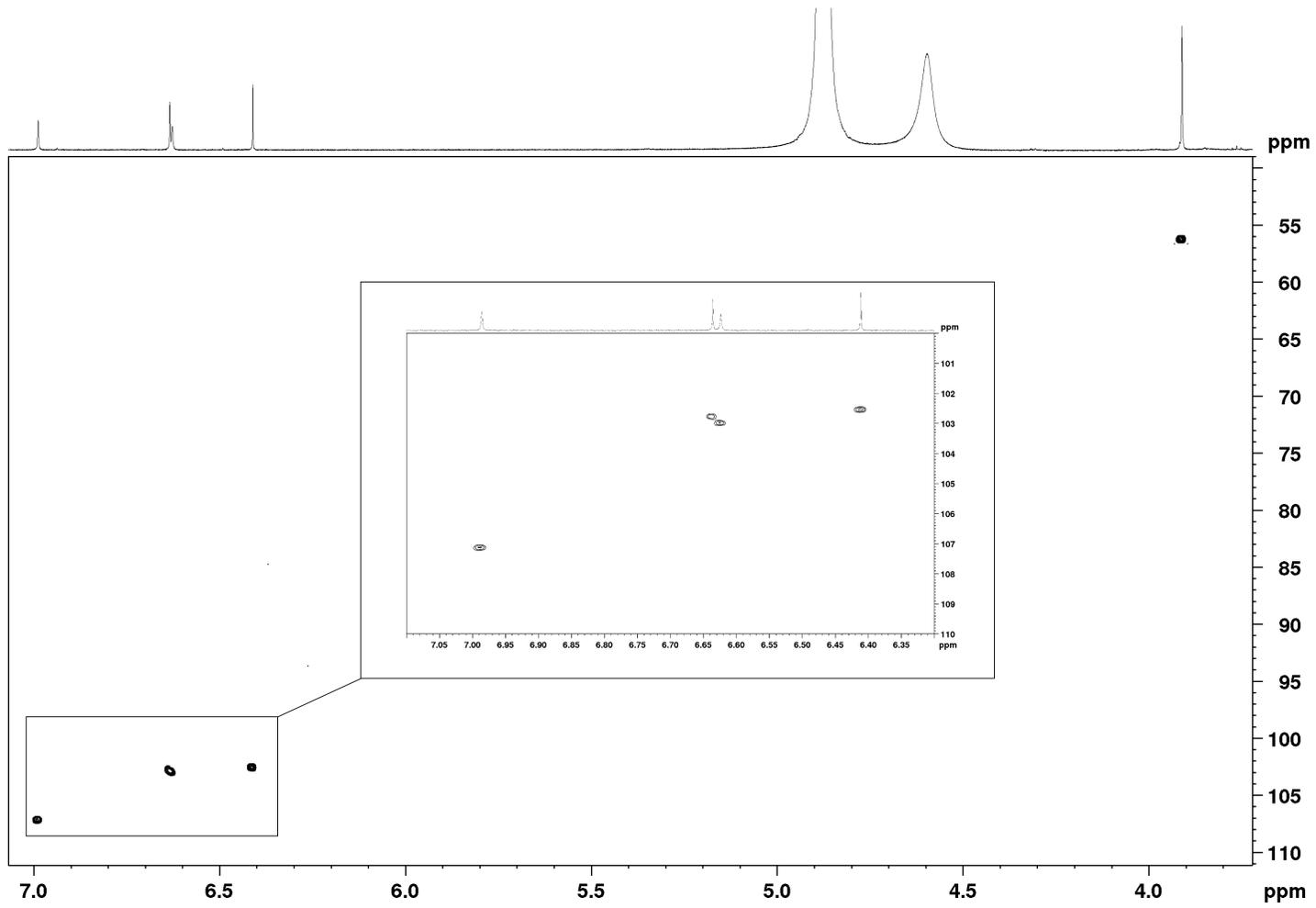


Figure M.2 – Spectre RMN 2D HSQC du composé X2 dans CD₃OD

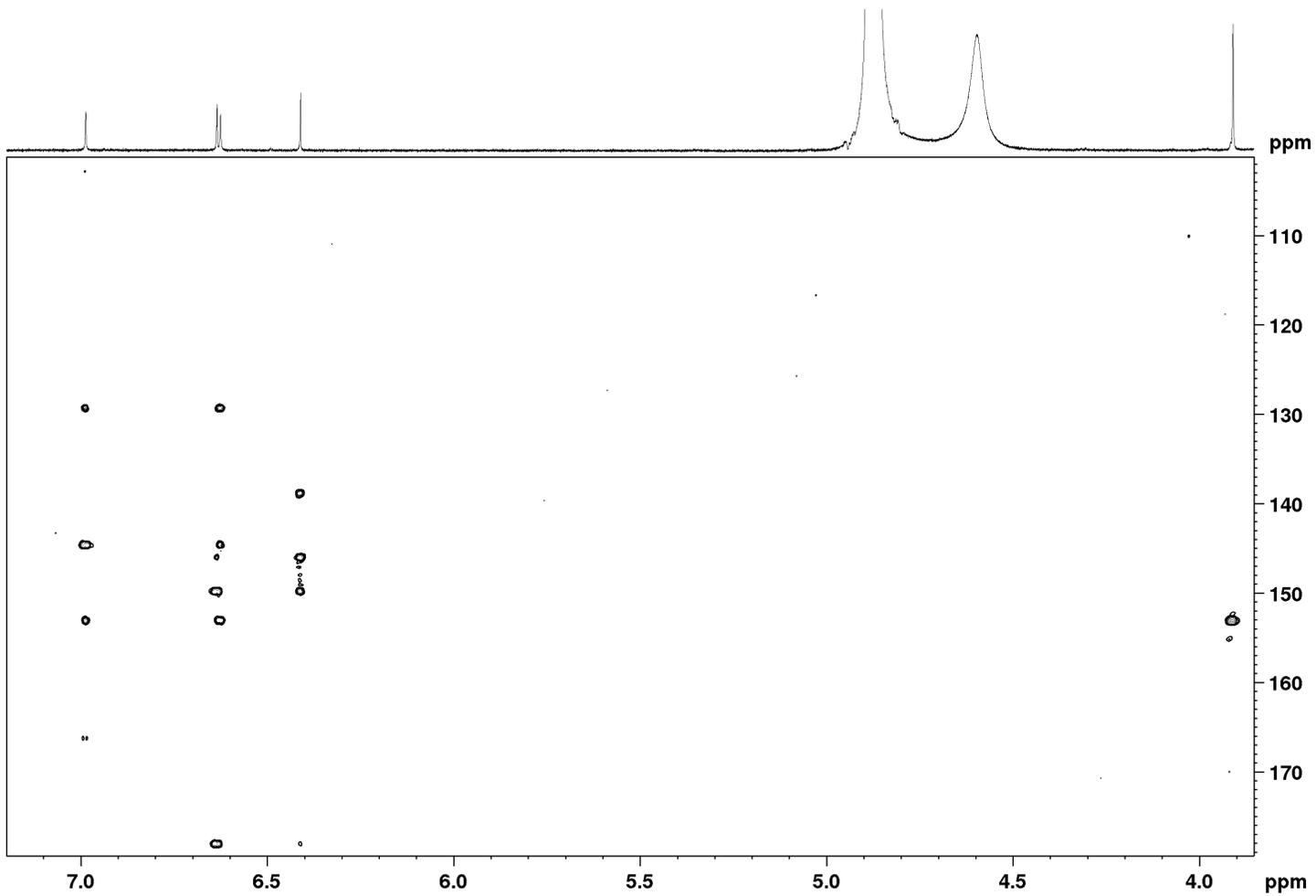


Figure M.3 – Spectre RMN 2D HMBC du composé X2 dans CD₃OD

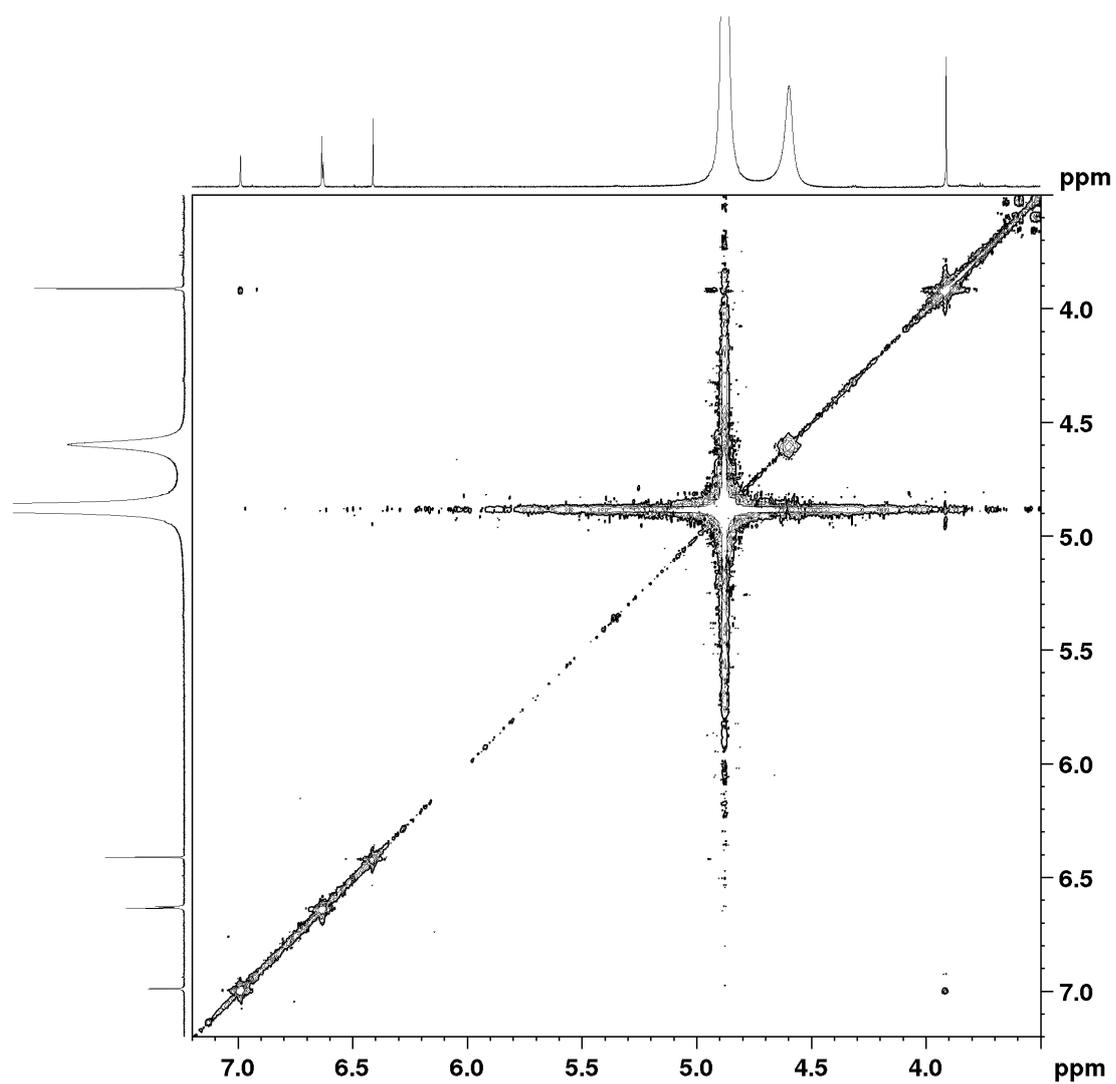
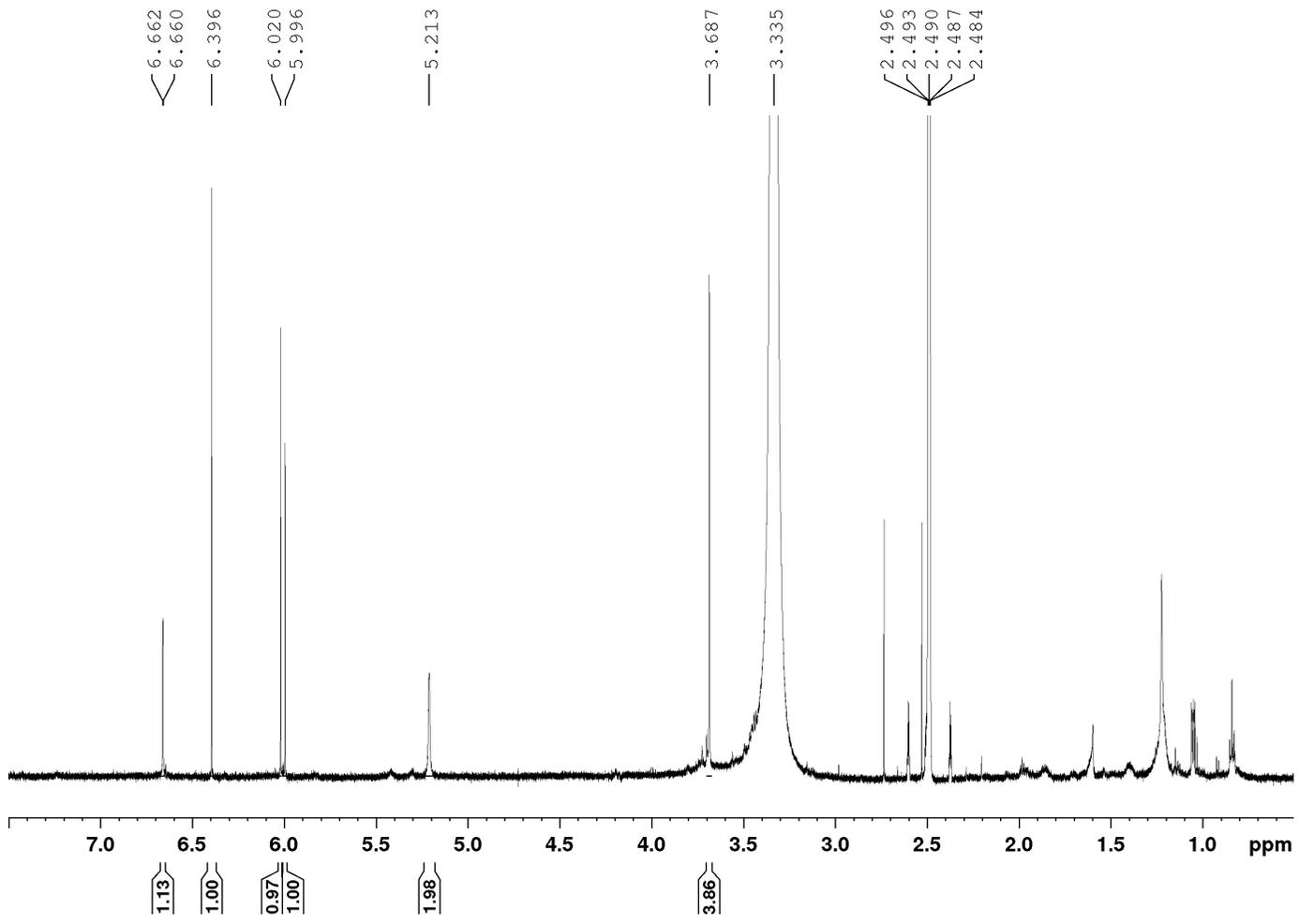
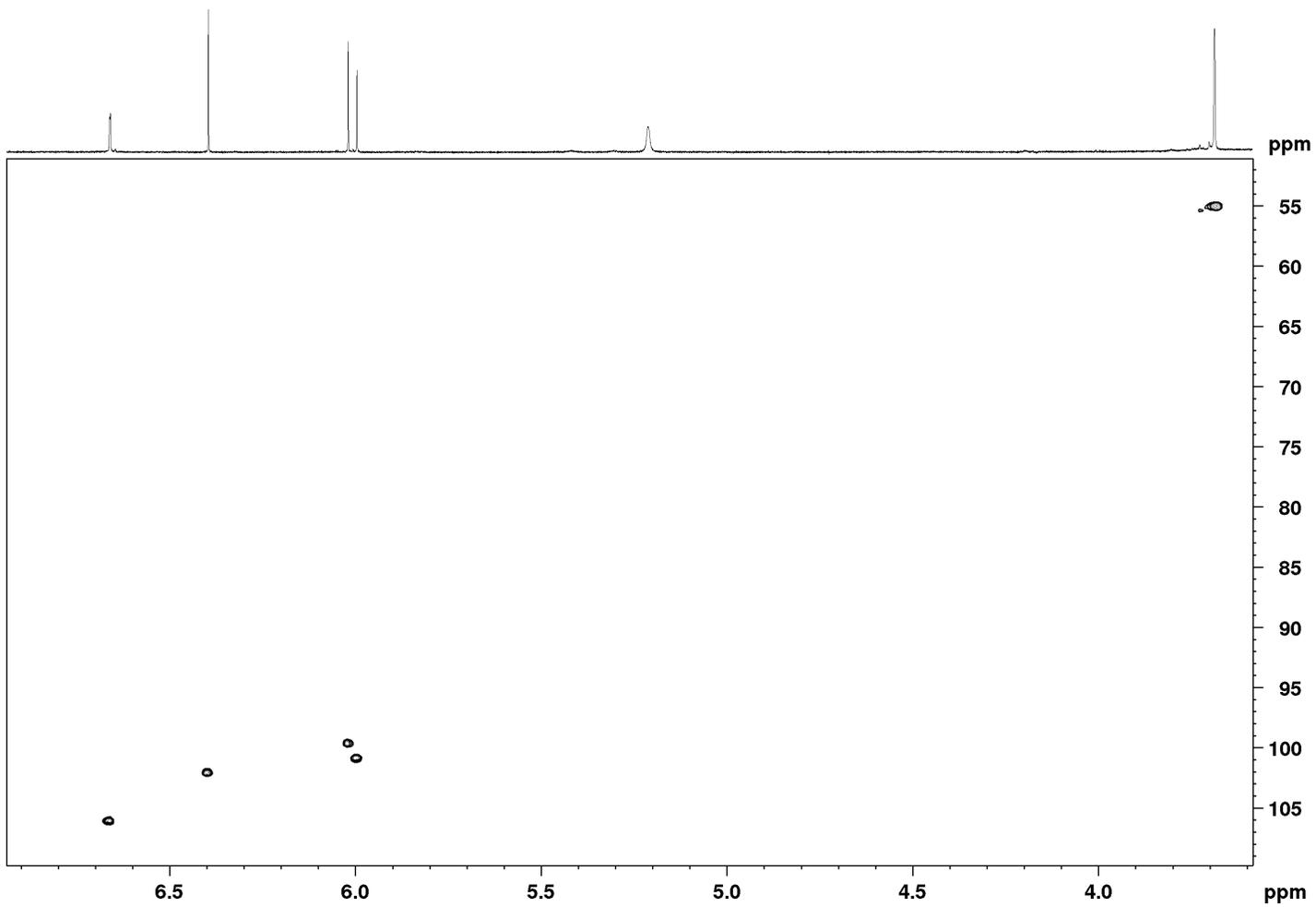


Figure M.4 - Spectre RMN 2D COSY du composé X2 dans CD₃OD

Figure M.5 - Spectre RMN ^1H du composé X2 dans DMSO-d_6

Figure M.6 – Spectre RMN 2D HSQC du composé X2 dans DMSO-d_6

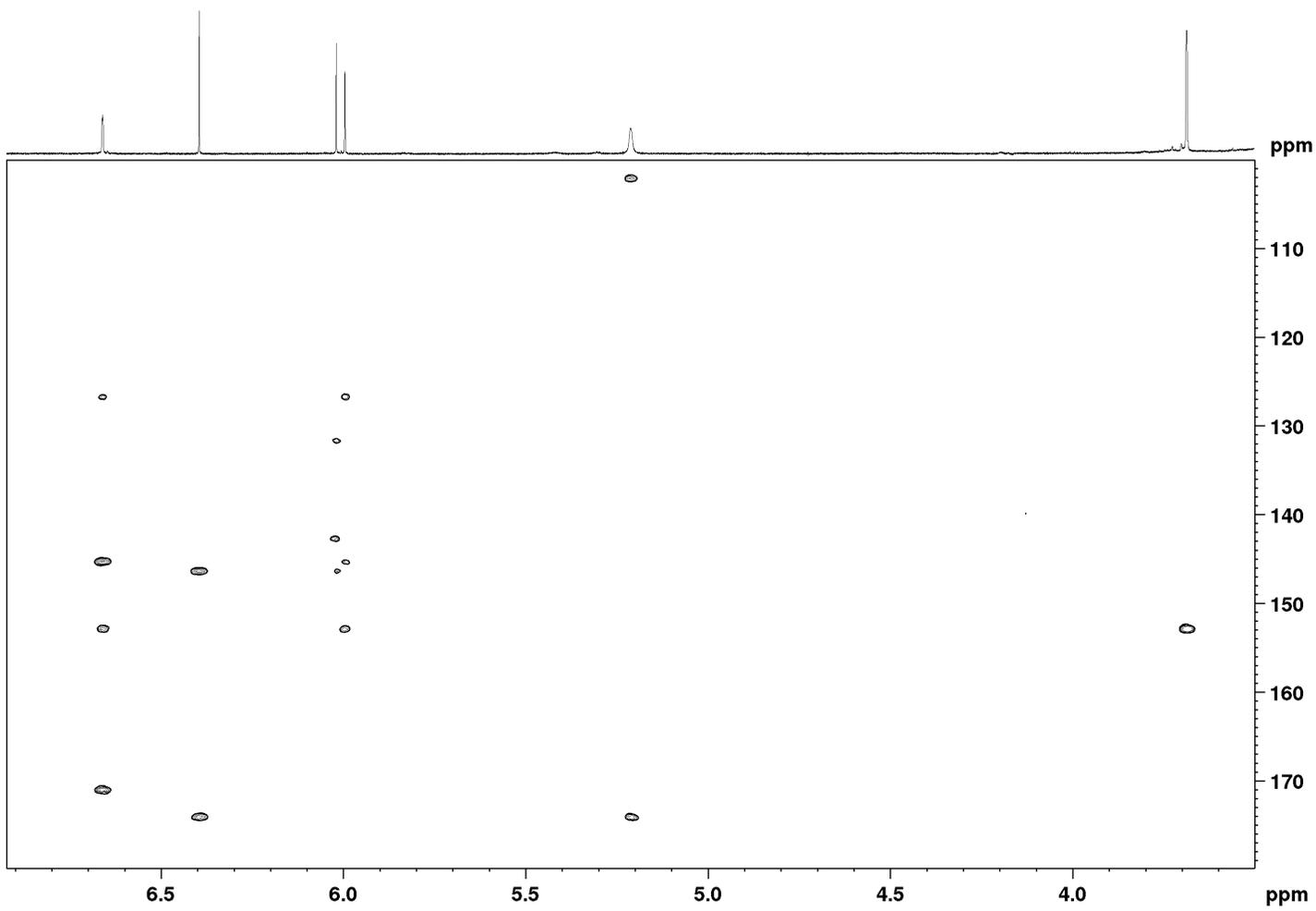


Figure M.7 - Spectre RMN 2D HMBC du composé X2 dans DMSO-d₆

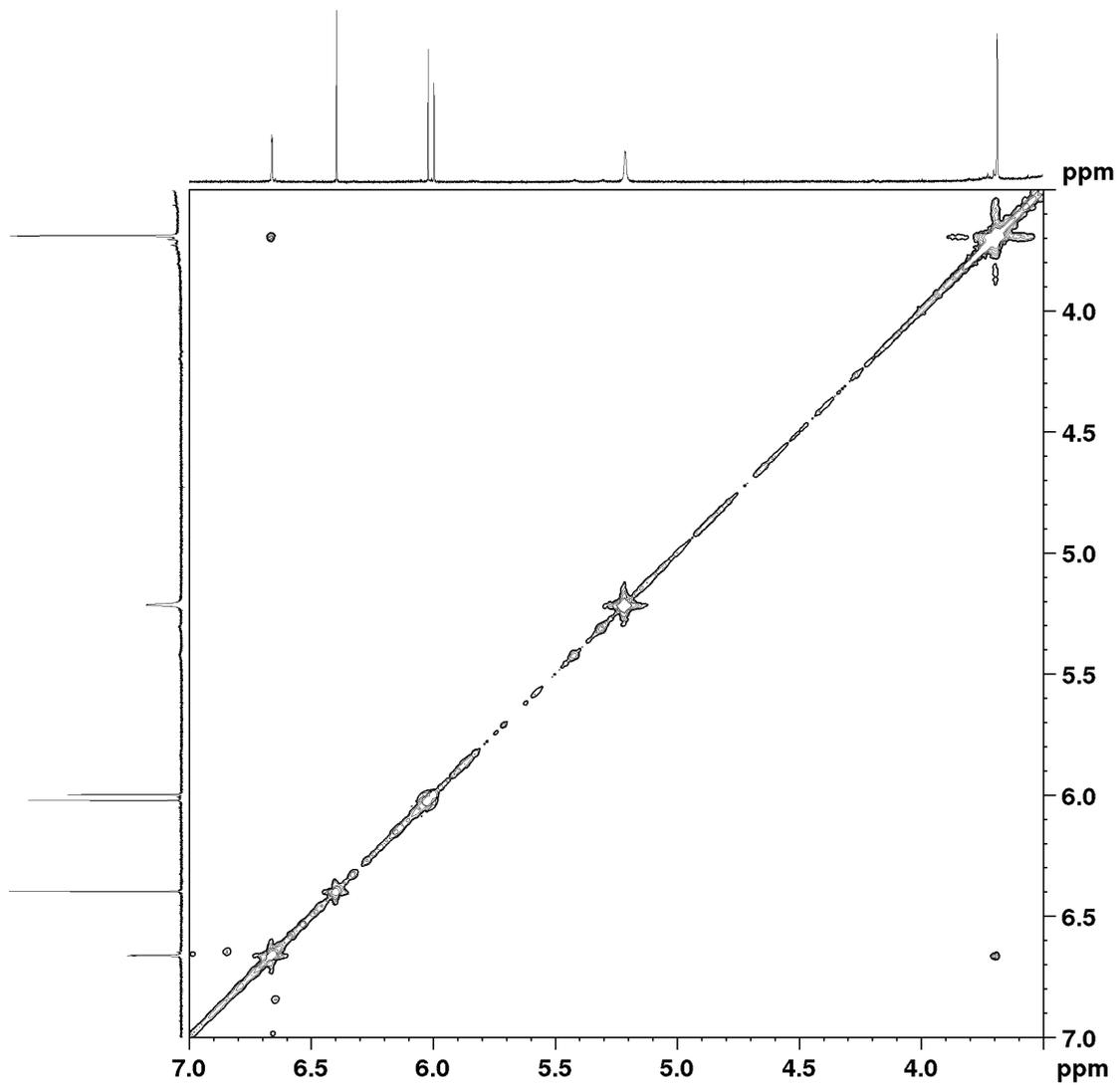


Figure M.8 - Spectre RMN 2D COSY du composé X2 dans DMSO-d₆

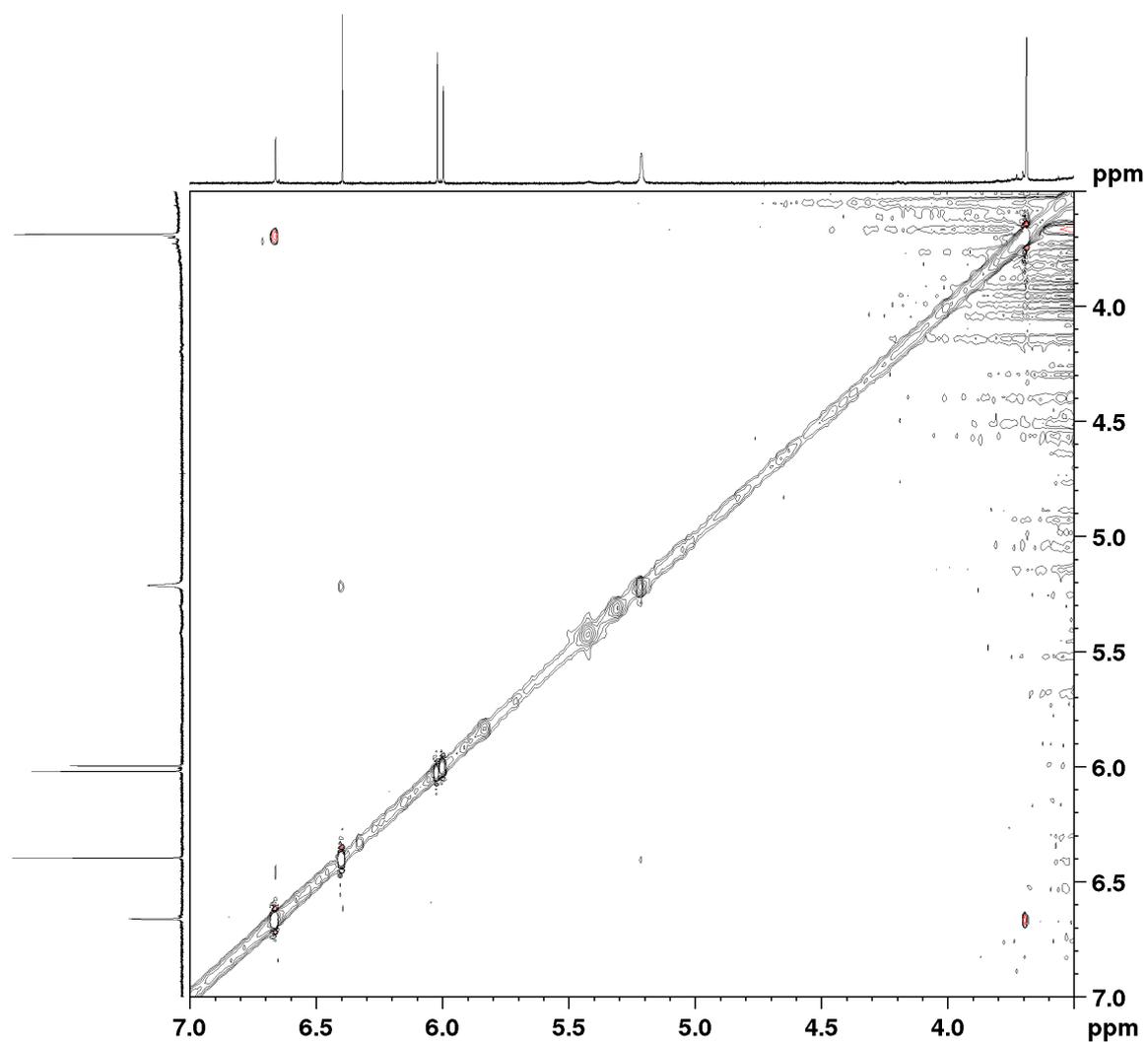


Figure M.9 – Spectre RMN 2D NOESY du composé X2 dans DMSO-d₆

2 Composé X1

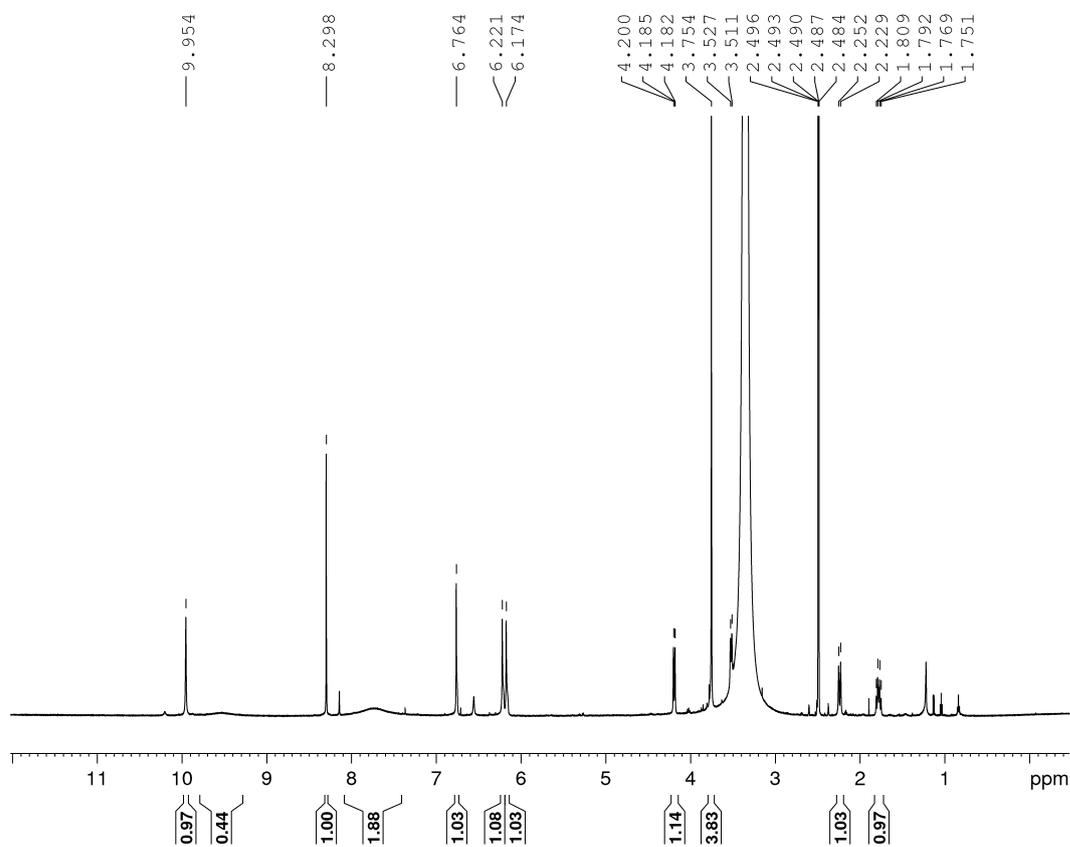


Figure M.10 - Spectre RMN ^1H du composé X1 dans DMSO-d_6

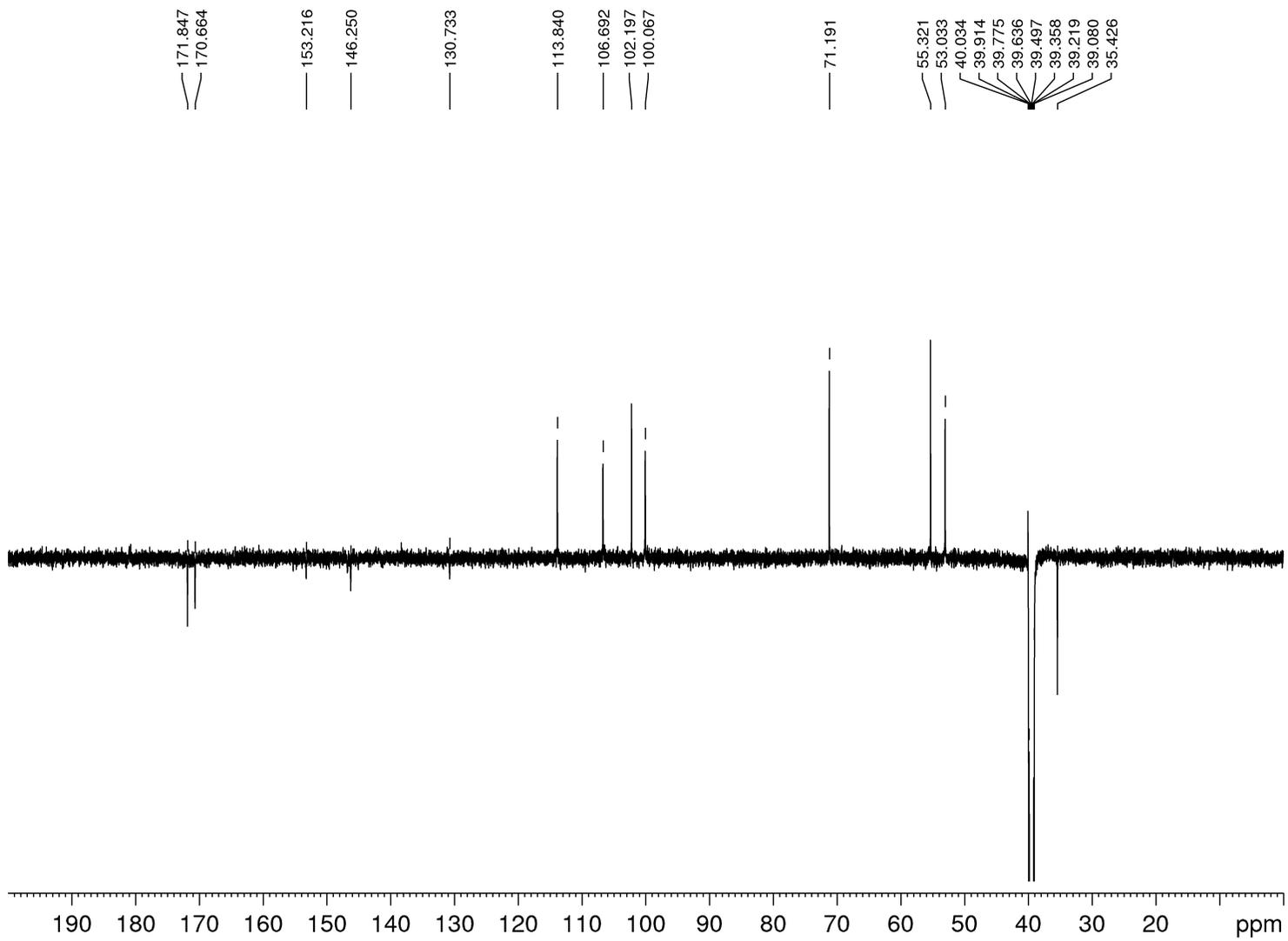


Figure M.11 – Spectre RMN ^{13}C DEPTQ du composé X1 dans DMSO-d_6

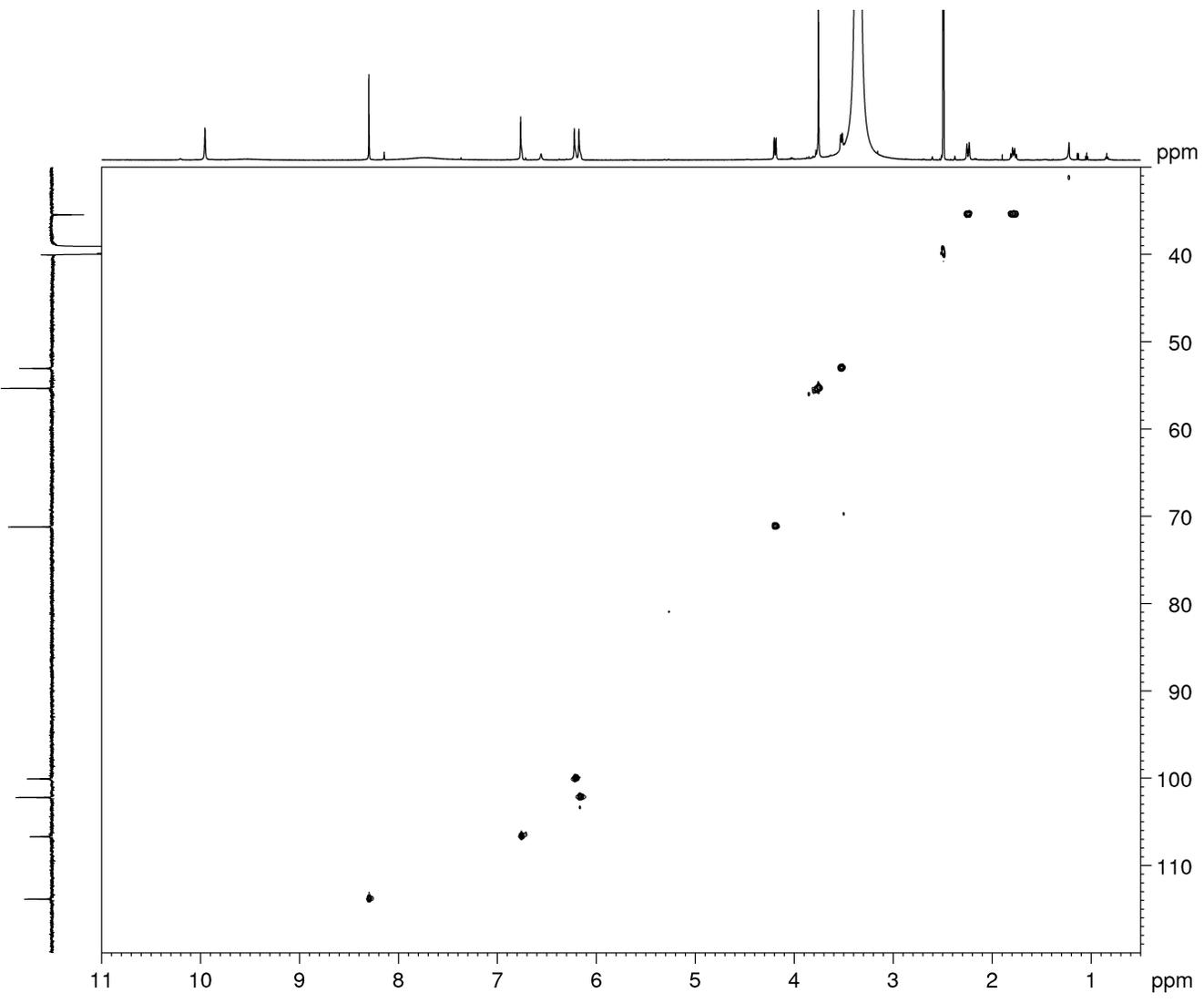
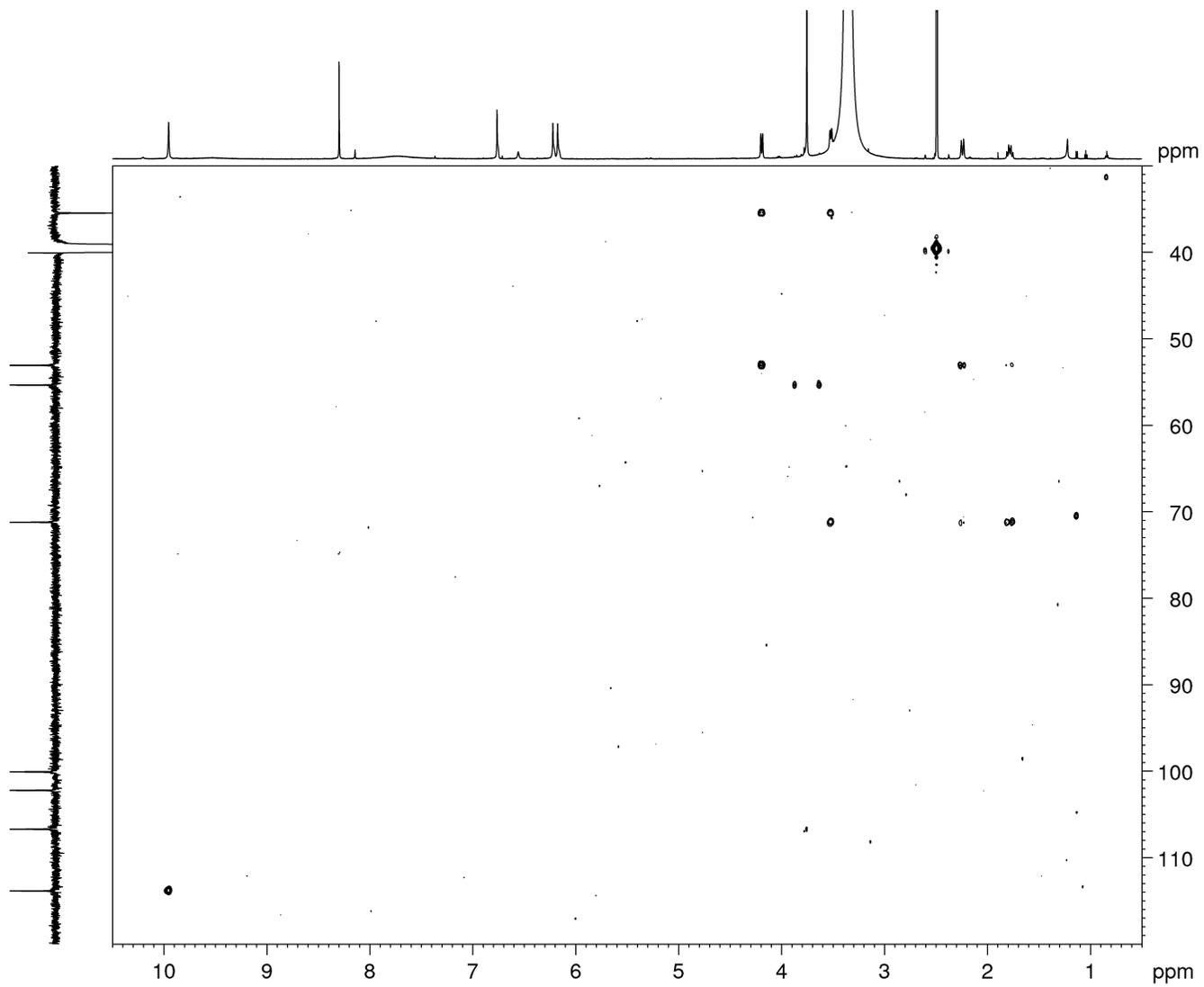


Figure M.12 - Spectre RMN 2D HSQC du composé X1 dans DMSO-d₆

Figure M.13 - Spectre RMN 2D HMBC (30 à 120 ppm) du composé X1 dans DMSO-d₆

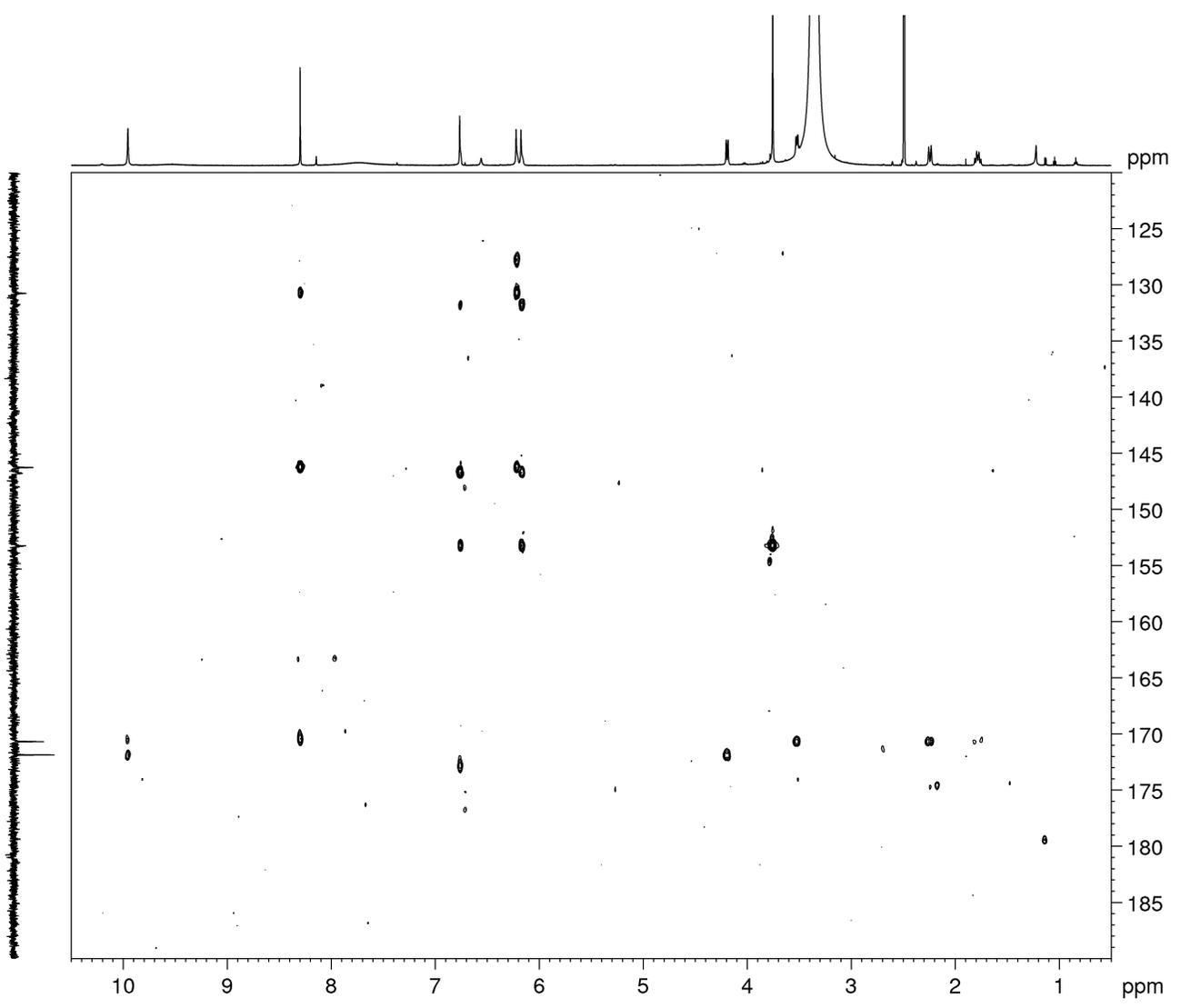


Figure M.14 - Spectre RMN 2D HMBC (120 à 190 ppm) du composé X1 dans DMSO-d₆

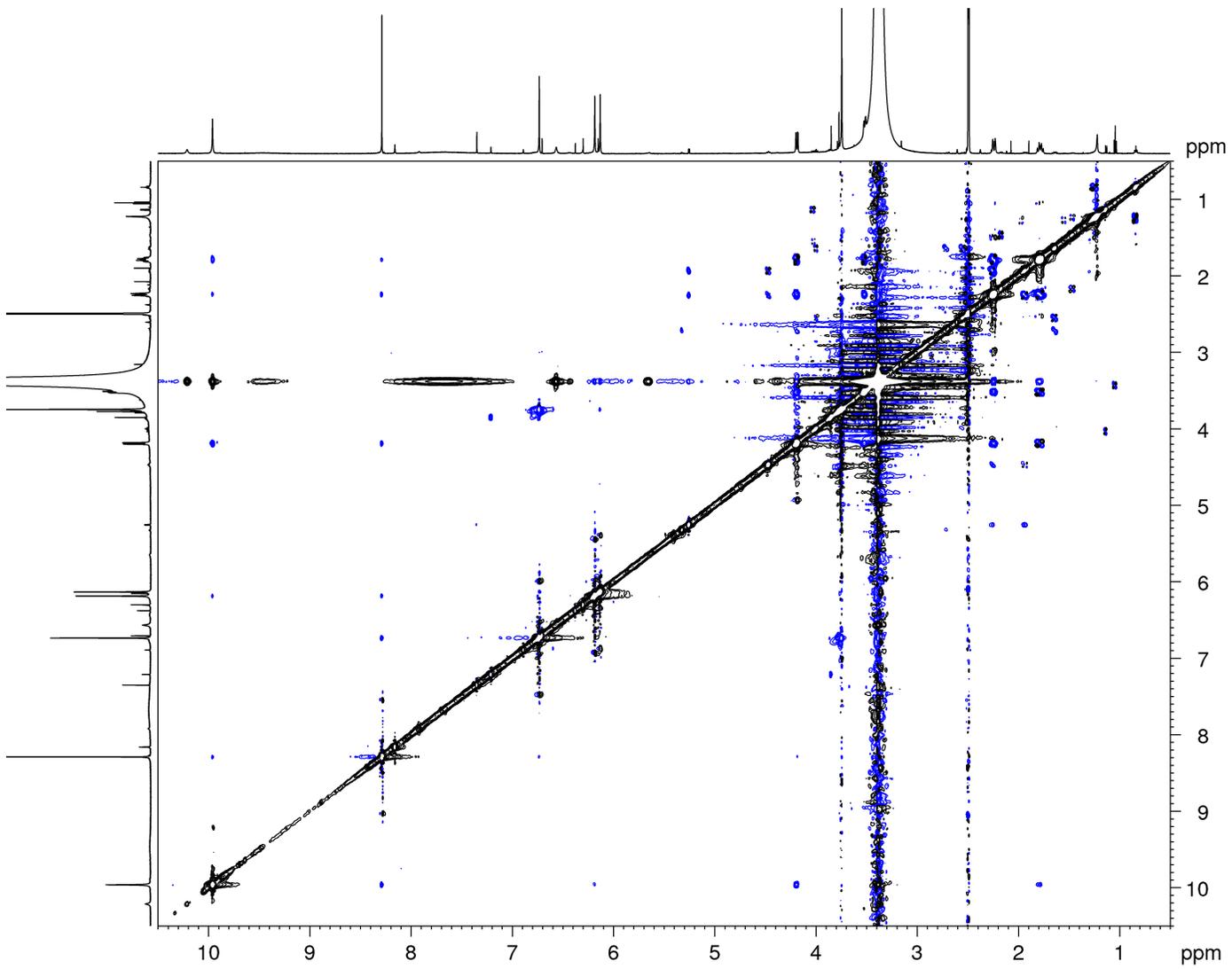


Figure M.15 – Spectre RMN 2D ROESY (0 à 10 ppm) du composé X1 dans DMSO-d₆

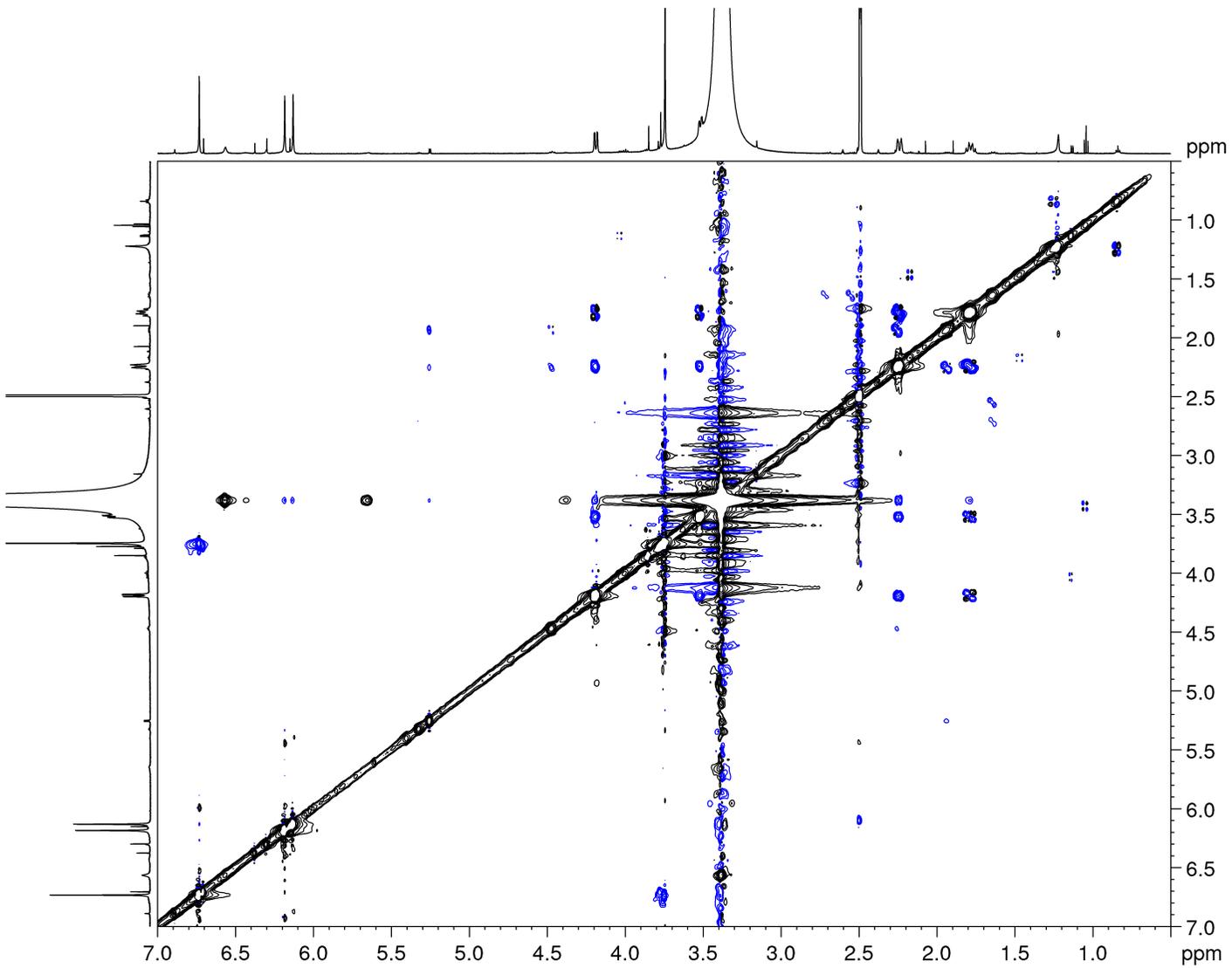


Figure M.16 – Spectre RMN 2D ROESY (zoom : 0 à 7 ppm) du composé X1 dans DMSO-d₆

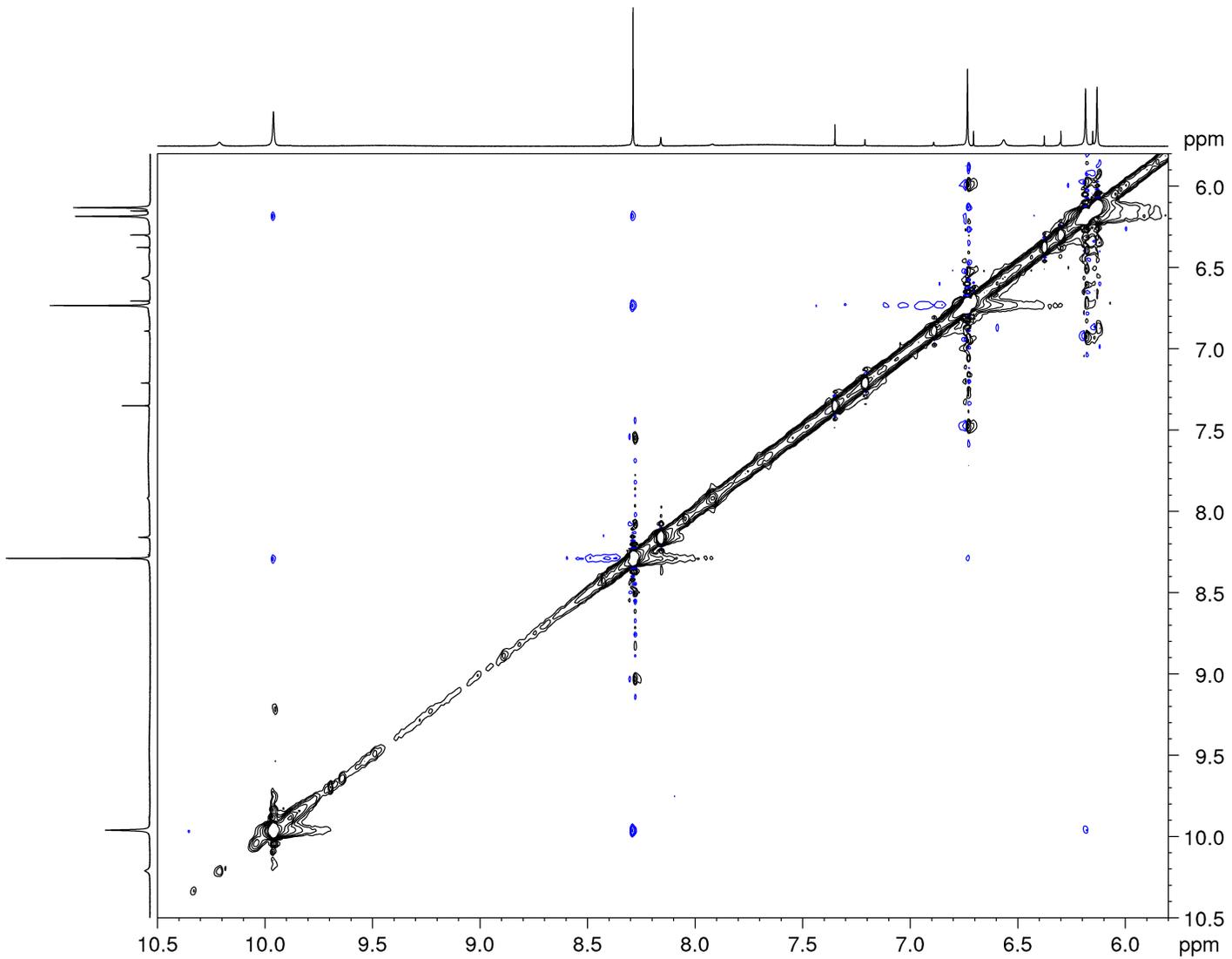


Figure M.17 - Spectre RMN 2D ROESY (zoom : 7 à 10 ppm) du composé X1 dans DMSO-d₆

Annexe N Attribution des déplacements chimiques en RMN pour des dérivés de péristrophine

Les attributions précédemment faites pour le composé identifié comme la périsbivalvine B par [Thuy *et al.*, 2012c] et de [Pérez-Vásquez *et al.*, 2022] présentent des incohérences et incertitudes qui nous font légitimement remettre en cause la structure proposée dans ces publications.

Thuy et collaborateurs ont identifié les structures de la périsbivalvine A et B à partir de celle de la péristrophine. L'attribution des signaux RMN pour la péristrophine [Thuy *et al.*, 2012a] (Tableau N.1) semble pertinente et cohérente avec celle faite pour d'autres phénoxazones [Maskey *et al.*, 2003, Bezerra-Gomes *et al.*, 2010, Abdelfattah, 2013, Ren *et al.*, 2013, Dey et Mukherjee, 2015, Umetsu *et al.*, 2019]. C'est-à-dire que le déplacement chimique du carbone C-6 est inférieur au déplacement chimique du carbone C-9 et que le déplacement du carbone C-5a est supérieur au déplacement du carbone C-9a.

Les attributions faites pour les périsbivalvines A et B présentent quant à elles des incohérences dans les déplacements chimiques δ_c des carbones C-6 et C-9, qui se retrouvent dans des positions inversées par rapport à ceux de la péristrophine [Thuy *et al.*, 2012b, Thuy *et al.*, 2012c] (Tableau N.1).

Les corrélations HMBC qu'ils observent ne suffisent pas à justifier les attributions des carbones du cycle C (C-5a, C-6, C-7, C-8, C-9 et C-9a) et une inversion des attributions de ces carbones serait tout aussi cohérente avec les corrélations expérimentales enregistrées. L'attribution de ces carbones est pourtant ensuite utilisée pour justifier la position du méthoxy en C-7 grâce à la corrélation HMBC entre les protons du méthoxy et le carbone C-7. L'attribution des carbones du cycle C manquant de certitude, la substitution du méthoxy en C-7 est donc contestable.

[Pérez-Vásquez *et al.*, 2022] obtiennent pour la périsbivalvine B des déplacements similaires à ceux obtenus par [Thuy *et al.*, 2012c] (Tableau N.1) et proposent la même attribution, mais sans redémontrer la démarche à partir des différentes corrélations

Annexe N. Attribution des déplacements chimiques en RMN pour des dérivés de péristrophine

pour confirmer la structure (Tableau N.1).

Ils identifient également un dérivé de la périsbivalvine A : la 2-N-(p-coumaroyl)-3H-phénoxazin-3-one. Lors de l'attribution des signaux, ils remettent en cause les déplacements des C-5a et C-9a identifiés par [Thuy *et al.*, 2012a, Thuy *et al.*, 2012c] pour la périsbivalvine A : le déplacement le plus grand est attribué au carbone C-5a, voisin de l'oxygène et non au carbone C-9a. Cependant, ils ne contestent pas la position des carbones C-6 et C-9 et conservent une attribution opposée à celle que l'on peut rencontrer dans diverses phénoxazones. La position du méthoxy en C-7 est ensuite justifiée grâce à la corrélation NOESY entre le proton H-6 et les protons du méthoxy. À nouveau, le manque de certitudes dans la position relative des carbones du cycle C, nous fait douter des structures proposées.

Tableau N.1 – Déplacements chimiques δ_C en RMN pour des dérivés de péristrophine.

Molécule [Référence]	DMSO-d ₆	CD ₃ OD
Péristrophine [Thuy <i>et al.</i> , 2012a, Thuy <i>et al.</i> , 2012b]		
Périsbivalvine A [Thuy <i>et al.</i> , 2012b, Thuy <i>et al.</i> , 2012c]		
Périsbivalvine B [Thuy <i>et al.</i> , 2012c]		
Périsbivalvine B [Pérez-Vásquez <i>et al.</i> , 2022]		
2-N-(p-coumaroyl)- 3H-phénoxazin-3- one [Pérez-Vásquez <i>et al.</i> , 2022]		

Annexe O Correction de l'auto-absorption (effet de filtre interne)

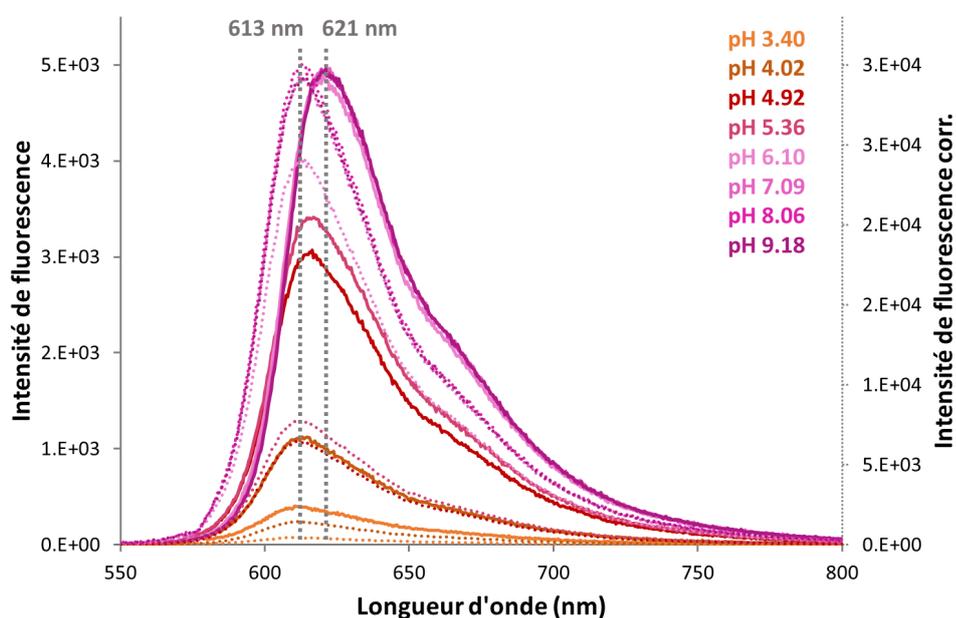


Figure O.1 – Spectre d'émission de fluorescence UV-Vis du composé X1 selon le pH.
Longueur d'onde excitatrice 575 nm.
Traits pleins pour les spectres bruts; traits pointillés pour les spectres corrigés pour l'effet de filtre interne.

Annexe P Compléments de spectroscopie infrarouge des phénoxazones

Les principales vibrations caractéristiques du cœur phénoxazin-3-one sont attendues dans la zone 1500-1660 cm^{-1} , correspondant aux liaisons doubles conjuguées C=C, C=O et C=N [Musso et Döpp, 1966, Musso *et al.*, 1967, Afanas'eva *et al.*, 1971]. Elles ont été désignées dans ces travaux comme bandes 1 à 5 et sont rassemblées dans le Tableau P.1. À cause de l'effet de la conjugaison des multiples liaisons doubles, il est difficile d'isoler les vibrations liées à une liaison spécifique et l'attribution de ces bandes est ainsi assez hasardeuse [Afanas'eva *et al.*, 1971]. Peu de références récentes à ce sujet sont disponibles; seuls les travaux précédemment cités datant des années 1960 s'y sont intéressés précisément.

Dans les premières attributions faites notamment par [Musso et Matthies, 1957] ou [Corbett, 1965], l'intense bande à 1660-1630 cm^{-1} est attribuée à la vibration de valence de la liaison carbonyle C=O, celle à 1620-1595 cm^{-1} à la vibration d'élongation de la liaison C=N puis plusieurs bandes à 1595-1450 cm^{-1} aux vibrations des liaisons C=C dans les cycles aromatiques et quinoïde [Stužka *et al.*, 1967, Afanas'eva *et al.*, 1971].

Cette attribution est ensuite remise en cause par des travaux menés par [Musso *et al.*, 1967] grâce à l'introduction d'isotopes ^{18}O dans la liaison carbonyle et ^{15}N dans le cycle central du cœur phénoxazin-3-one et à l'étude des décalages induits dans les spectres infrarouge. La première bande entre 1642 et 1657 cm^{-1} serait liée à la vibration d'étirement de la liaison C=C du noyau quinoïde; son intensité dépend de la substitution en C-2. Une deuxième bande entre 1614 et 1636 cm^{-1} correspondrait à la vibration de la liaison C=O de la quinone-imine. Se trouvent ensuite des bandes (une à trois) entre 1564 et 1606 cm^{-1} associées aux vibrations des liaisons C=C des cycles aromatiques et quinoïdes. Puis enfin une bande entre 1493 et 1516 cm^{-1} serait attribuée à la vibration de la liaison C=N.

Tableau P.1 – Principales bandes d'absorption infrarouge caractéristiques des phénoxazin-3-ones.

N°	Gamme (cm ⁻¹)	Description	[Musso et Mathies, 1957] [Corbett, 1965]	[Musso <i>et al.</i> , 1967]
1	1660-1630	Bande fine et peu intense, parfois seulement épaulement de la suivante, intensité sensible à la position des substituants sur le cycle quinoïde	ν C=O	ν C=C
2	1620-1595	Fine et intense	ν C=N	ν C=O
3	1595-1545	Plusieurs bandes, moins intenses que la précédente, variables en intensité, parfois épaulement de la précédente	ν C=C	ν C=C
4	1535-1485	Intensité moyenne à faible, variable en position	ν C=C	ν C=N
5	1490-1450	Intensité moyenne à faible, variable en position	ν C=C	ν C=C
6	1415-1350	Parfois plusieurs bandes, fines, intensités moyennes à faibles, variables en position	ν C-C, ν C-N	ν C-C?
7	1340-1290	Parfois plusieurs bandes, fines, intensités moyennes à faibles, variables en position	ν C-C, ν C-N	
8	1290-1240	Parfois plusieurs bandes, fines, intensités moyennes à faibles, variables en position	ν C-C, ν C-N	
9	1260-1210	Assez faible	ν C-C, ν C-N	ν N-Phényl
10	1215-1155	Au moins une, parfois plusieurs bandes, intenses	ν C-O-C	ν C-O?