



HAL
open science

Etude chimique et caractérisation de principes colorants historiquement employés dans l'impression des indiennes en Provence

Guillaume Cuoco

► **To cite this version:**

Guillaume Cuoco. Etude chimique et caractérisation de principes colorants historiquement employés dans l'impression des indiennes en Provence. Autre. Université d'Avignon, 2009. Français. NNT : 2009AVIG0232 . tel-00672533

HAL Id: tel-00672533

<https://theses.hal.science/tel-00672533>

Submitted on 21 Feb 2012

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.



ACADEMIE D'AIX-MARSEILLE
UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

THÈSE

présentée pour obtenir le grade de Docteur en Sciences
de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

SPÉCIALITÉ : CHIMIE

**ÉTUDE CHIMIQUE ET CARACTÉRISATION DE PRINCIPES
COLORANTS HISTORIQUEMENT EMPLOYÉS DANS
L'IMPRESSION DES INDIENNES EN PROVENCE**

par

Guillaume CUOCO

soutenue le vendredi 27 novembre 2009 devant un jury composé de :

M. Mohamed El Maâtaoui	Professeur Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse	Président du jury
Mme Martine Regert	Directrice de Recherche CNRS Université de Nice Sophia-Antipolis	Rapporteur
Mme Evangelia Varella	Professeur Aristotle University of Thessaloniki, Grèce	Rapporteur
Mme Catherine Vieillescazes	Professeur Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse	Directrice de thèse
M. Paul Archier	Maître de Conférences Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse	Invité
M. Jean-François Boudin	Directeur Général Les Olivades [®]	Invité

*A Fanny,
à mes parents,
à ma famille.*

Avant Propos

Une partie des travaux relatés dans ce manuscrit de thèse a donné lieu à la publication de deux articles scientifiques dans des journaux internationaux à comité de lecture. Ces travaux ont également été valorisés par trois communications orales et cinq communications par affiche.

- Publications

1/ G. Cuoco, C. Mathe, P. Archier, M. El Maâtaoui, C. Vieillescazes. Biochemical and cytohistological evidences for optimization of dye extraction from madder (*Rubia tinctorum* L.) tissues by ultrasounds.

Phytochemical Analysis 20 (2009), p 484-490.

2/ G. Cuoco, C. Mathe, P. Archier, F. Chemat, C. Vieillescazes. A multivariate study of the performance of an ultrasound-assisted madder dyes extraction and characterization by liquid chromatography-photodiode array detection.

Ultrasonics Sonochemistry, 16 (2009) p 75-82.

- Communications orales scientifiques

1/ G. Cuoco, C. Mathe, C. Vieillescazes. Garance et nano-particules. 2^{èmes} Journées Scientifiques du C'Nano PACA, 25-27 mai 2009. Porquerolles.

2/ G. Cuoco, C. Mathe, P. Archier, C. Vieillescazes. Chromatographic study of *Rhamnus* species used to prepare stil de grain. 4^{èmes} Journées Franco-Italiennes de Chimie, 17-18 avril 2008. Nice.

3/ C. Mathe, G. Cuoco et C. Vieillescazes. Analytical study of ancient Moroccan carpets from Batha museum (Fez). *Med Colour Tech - Workshop - Technology & conservation of ancient Artworks*, 26-27 novembre 2008. Fez (Morocco).

- Communications par affiche

1/ G. Cuoco, C. Mathe, C. Vieillescazes. Etude de flavonols et d'anthraquinones de divers *Rhamnus* spp. par SPE/CLHP/UV-Visible. *Sep'09 Techniques Séparatives et Couplages*, décembre 2009. Marseille.

2/ G. Cuoco, C. Mathe, P. Archier, M. El Maataoui, C. Vieillescazes. Ultrasound process for the extraction of anthraquinones in madder roots. *4^{èmes} Journées Franco-Italiennes de Chimie*, 17-18 avril 2008. Nice.

3/ G. Cuoco, C. Mathe, P. Archier, C. Vieillescazes. Flavonol compounds of *Rhamnus* species used in stil de grain dye. *4^{èmes} Journées Franco-Italiennes de Chimie*, 17-18 avril 2008. Nice.

4/ G. Cuoco, C. Mathe, P. Archier, C. Vieillescazes. Étude chromatographique de la garance et optimisation de son protocole d'extraction. *20^{ème} journée de la chimie SFC PACA*, mai 2007. Avignon.

5/ G. Cuoco, C. Mathe, P. Archier, C. Vieillescazes. Etude des marqueurs chimiques de colorants rouges ; application au milieu muséal. *GdR 2114 Chimart 2*, Janvier 2007. Paris.

Remerciements

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

Madame Martine REGERT

Directrice de Recherche CNRS à l'Université de Nice Sophia-Antipolis, France

Madame Evangelia VARELLA

Professeur à Aristotle University of Thessaloniki, Grèce

Monsieur Mohamed EL MAÂTAOUI

Professeur à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, France

Madame Catherine VIEILLESZAZES

Professeur à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, France

Monsieur Paul ARCHIER

Maître de Conférences à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, France

Monsieur Jean-François BOUDIN

Directeur Général de la société Les Olivades®

Je profite maintenant de l'occasion qui m'est offerte pour remercier les personnes sans lesquelles ce travail de thèse n'aurait pu se concrétiser.

Je remercie tout d'abord le Professeur Bernard PUCCI, Directeur du Laboratoire de Chimie Bioorganique et des Systèmes Moléculaires Vectoriels, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir offert l'opportunité de travailler sur de nouvelles techniques.

Je remercie également le Professeur Catherine VIEILLESZAZES, Responsable de l'Équipe de Chimie appliquée à l'Art et à l'Archéologie, de son accueil, de sa confiance ainsi que de son professionnalisme tout au long de ces trois ans.

Je remercie vivement Paul ARCHIER, Maître de Conférences à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, de son encadrement, de ses conseils toujours pertinents, de son savoir et de ses inégalables connaissances en chimie.

Je remercie très chaleureusement Carole MATHE de SOUZA, Maître de Conférences à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, de son aide, de son efficacité et surtout de son soutien et de son amitié dans les moments difficiles. Ses compétences en chimie analytique m'ont permis de parfaire ma formation dans ce domaine.

Je remercie également Céline JOLIOT, Technicienne recherche et ACMO hygiène et sécurité à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, de sa gentillesse, de sa disponibilité et de sa bonne humeur.

Je souhaite remercier Mohamed EL MAÂTAOUI, Professeur à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, de m'avoir permis de réaliser les analyses cytohistologiques ainsi que de m'avoir initié à la biologie végétale. Son aide a également été précieuse lors de l'identification de diverses espèces botaniques.

Je remercie également Eric JENSEL de l'Office National des Forêts (ONF) pour ses compétences en botanique et pour sa contribution lors de l'identification des espèces de *Rhamnus*.

Je remercie Gérald CULIOLI, Maître de Conférence à l'Université du Sud Toulon-Var, pour ses conseils et surtout de m'avoir permis d'effectuer les analyses par CLHP/SM.

Je remercie le Professeur Farid CHEMAT, Responsable de l'UMR 408 INRA-Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, pour ses connaissances en plan d'expérience et en ultrasons, ainsi que Charles GANTZ, Directeur de la société R.E.U.S., d'avoir mis à ma disposition l'appareil à ultrasons.

Je remercie sincèrement Mme Sandrine BERNICAUD, Conservatrice au Palais du Roure (Avignon), Ghislaine VALLEE, Responsable de l'Unité Gestion des Collections du Museon Arlaten (Arles), ainsi que Dominique SERENA, Conservatrice en Chef du Museon Arlaten (Arles), d'avoir permis le prélèvement des échantillons.

Je remercie enfin Jean François BOUDIN de la société Les Olivades[®] ainsi que la Région Provence Alpes Côte d'Azur (PACA) pour le cofinancement de ces travaux.

Cette liste de personnes n'est pas exhaustive, aussi afin de n'oublier personne, je remercie l'ensemble du département de Chimie de l'UFR Sciences Exactes et Naturelles de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	11
ABRÉVIATIONS	14
INTRODUCTION GÉNÉRALE ET PROBLÉMATIQUE	15
ORGANISATION DES TRAVAUX	20
PARTIE 1 : LES COLORANTS ROUGES DE LA GARANCE	22
Chapitre I. Étude bibliographique	23
I.1. <u>Historique</u>	23
I.2. <u>Caractères botaniques</u>	24
I.3. <u>Composition chimique</u>	27
I.4. <u>Les ultrasons : généralités et principes</u>	31
I.5. <u>Propriétés et utilisations</u>	35
I.5.1. Dans le domaine de la couleur	35
I.5.2. Dans le domaine pharmacologique, agroalimentaire et sanitaire	39
I.5.3. Activités mutagène et cancérigène de la garance	39
Chapitre II. Résultats et discussion	41
II.1. <u>Étude des colorants de la garance</u>	41
II.1.1. Les anthraquinones de la garance	41
II.1.2. Structures chimiques et propriétés spectroscopiques	42
II.1.3. Comparaison de diverses espèces de garance ; cas de la garancine	43
II.2. <u>Extraction des colorants par ultrasons</u>	46
II.2.1. Optimisation des conditions d'extraction	46
II.2.1.1. <i>Études préliminaires</i>	46
II.2.1.2. <i>Résultats du plan d'expérience</i>	49
II.2.1.3. <i>Conditions optimales</i>	54
II.2.1.4. <i>Composition chimique</i>	54
II.2.2. Comparaison entre l'extraction par ultrasons et les méthodes traditionnelles	59

II.2.2.1. Rendement en colorant	59
II.2.2.2. Composition chimique	60
II.2.2.3. Étude cytohistologique	63
II.3. <u>Application à des échantillons provenant du Palais du Roure</u>	66
II.3.1. Analyse chromatographique	66
II.3.2. Analyse colorimétrique	69
II.4. <u>Conclusion</u>	71
PARTIE 2 LES COLORANTS JAUNES	73
Chapitre I. Étude bibliographique	74
I.1. <u>Historique</u>	74
I.2. <u>Caractères botaniques</u>	75
I.2.1. Les espèces du genre <i>Rhamnus</i>	75
I.2.2. L'espèce <i>Reseda luteola</i>	77
I.3. <u>Composition chimique</u>	79
I.3.1. Les flavonoïdes	79
I.3.2. Les anthraquinones	86
I.4. <u>Propriétés et utilisations</u>	89
I.4.1. Dans le domaine de la couleur	89
I.4.2. Dans le domaine pharmacologique	90
Chapitre II. Résultats et discussion	91
II.1. <u>Étude des colorants de <i>Rhamnus</i></u>	91
II.1.1. Identification des flavonols	91
II.1.1.1. Les aglycones	91
II.1.1.2. Les glycosides	92
II.1.2. Identification des anthraquinones	97
II.1.2.1. Mise en place des conditions d'extraction par SPE	97
II.1.2.2. Caractérisation de molécules	98
II.1.3. Analyse des extraits de <i>Rhamnus</i>	108
II.1.3.1. Comparaison chimique de trois espèces de <i>Rhamnus</i>	108
II.1.3.2. Comparaison chimique de divers <i>Rhamnus</i> matures	117
II.1.4. Application à un échantillon d'une pharmacie du XVIII ^{ème} siècle	128
II.2. <u>Étude des colorants de <i>Reseda luteola</i></u>	132

II.2.1. Identification des flavones	132
II.2.2. Etude par chromatographie liquide	132
II.2.3. Etude par électrophorèse capillaire	133
II.3. <u>Conclusion</u>	135
PARTIE 3 APPLICATIONS	137
Chapitre I. Étude de fibres textiles anciennes	138
I.1. <u>Extraction des colorants à partir d'une laque et d'un textile</u>	138
I.2. <u>Identification des colorants de textiles anciens</u>	146
I.2.1. Le Palais du Roure	146
I.2.1.1. Indienne N°7	146
I.2.1.2. Indienne N°102	148
I.2.2. Le Museon Arlaten	149
I.2.2.1. Les indiennes	149
I.2.2.1. Les droulets et les jupons	155
Chapitre II. Essais de teinture en collaboration avec la société	
textile Les Olivades®	156
II.1. <u>La société Les Olivades</u>	156
II.1.1. Historique	156
II.1.2. L'impression sur tissu	156
II.2. <u>Essais de teinture</u>	159
BILAN ET PERSPECTIVES	162
PARTIE EXPÉRIMENTALE	166
1. <u>Généralités</u>	167
2. <u>Étude de la garance</u>	168
3. <u>Étude des colorants jaunes</u>	178
4. <u>Extraction des colorants à partir de fibres textiles</u>	184
5. <u>Essais de coloration</u>	185
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	188
ANNEXES	203
ANNEXE I : SPECTRES UV/VISIBLE DES MOLÉCULES	
ÉTUDIÉES	204

ANNEXE II : SPECTRES DE MASSE DES FLAVONOLS	
PRÉSENTS DANS LES NERPRUNS	210
ANNEXE III : SPECTRES DE MASSE DES ANTHRAQUINONES	
PRÉSENTES DANS LES NERPRUNS	230
ANNEXES IV : SPECTRES RMN D'ANTHRAQUINONES	
PRÉSENTES DANS LES NERPRUNS	241
ANNEXES V : POURCENTAGES RELATIFS DES	
COMPOSÉS PRÉSENTS DANS LES NERPRUNS	262
ANNEXES VI : HISTOIRE DES INDIENNES ET DESCRIPTIF DES	
ÉCHANTILLONS ANCIENS	265
ANNEXES VII : CHROMATOGRAMMES DES TISSUS ANCIENS	271

Liste des Figures

Partie 1

Figure 1.1. Représentation des espèces <i>Rubia tinctorum</i> (a), <i>R. peregrina</i> (b) et <i>R. cordifolia</i> (c) (Cardon et du Chatenet, 1990).	25
Figure 1.2. Répartition géographique des différentes espèces du genre <i>Rubia</i> (Hovaneissian, 2005).	26
Figure 1.3. Structure du noyau anthraquinone (Burnett et Thomson, 1968).	27
Figure 1.4. Structures des principales anthraquinones aglycones rencontrées dans les racines de garance (Derksen et al., 1998.).	28
Figure 1.5. Structures des principaux O- β -D-primevérosides d'anthraquinones (Boldizsár et al., 2006).	29
Figure 1.6. Dégradation de la galiosine en purpurine (Hovaneissian 2005).	30
Figure 1.7. Structures d'anthraquinones aglycones substituées sur les cycles A et C (Kawasaki et al., 1992 b ; El-Emary et Backheet, 1998).	31
Figure 1.8. Gamme des fréquences sonores (Mason, 1989).	32
Figure 1.9. Phénomène de cavitation initié par les ondes ultrasonores (Mason, 199).	33
Figure 1.10. Implosion d'une bulle de cavitation à la surface d'un solide (Mason, 1990).	34
Figure 1.11. Sites de complexation "céto-phénolate" (a) et "diphénolate" (b) de l'alizarine.	36
Figure 1.12. Structure du complexe de coordination alizarine-aluminium (Soubayrol et al., 1996 b).	37
Figure 1.13. Formation et structures des adduits lucidine-bases nucléiques (Kawasaki et al., 1994).	40
Figure 1.14. Structure chimique de composés aglycones.	43
Figure 1.15. Chromatogramme à 450 nm des extraits de <i>R. tinctorum</i> (a), <i>R. peregrina</i> (b) et de garancine (c).	45
Figure 1.16. Détermination de la puissance absorbée dans le système ultrasons par l'augmentation de la température dans le solvant d'extraction.	47
Figure 1.17. Effet de la taille des racines de garance sur le rendement d'extraction.	48
Figure 1.18. Diagramme de Pareto.	51
Figure 1.19. Surfaces de réponses obtenues à partir du PCC du temps et de la température (a), du temps et du solvant (b), de la température et du solvant (c) obtenus pour le rendement en colorant.	53
Figure 1.20. Chromatogramme à 450 nm des colorants extraits dans les conditions optimales.	57

Figure 1.21. Chromatogramme à 450 nm des extraits de garance obtenus par les trois procédés d'extraction : reflux (a), agitation (b) et ultrasons (c).	60
Figure 1.22. Comparaison de l'aire de pics des anthraquinones en fonction du procédé d'extraction.	62
Figure 1.23. Sections longitudinales d'une racine fraîche de <i>R. tinctorum</i>	63
Figure 1.24. Sections longitudinales montrant le comportement des tissus de racines de <i>R. tinctorum</i> après extraction : témoin (a), agitation (b), reflux (c) et ultrasons (d).	65
Figure 1.25. Représentation des objets prélevés au Palais du Roure.	66
Figure 1.26. Chromatogrammes à 450 nm, des échantillons anciens : échantillons 1 à 6.	67

Partie 2

Figure 2.1. Juifs portant la rouelle et le chapeau pointu (Cardon 2003).	74
Figure 2.2. Représentation des espèces <i>R. saxatilis</i> (a), <i>R. alaternus</i> (b) et <i>R. catharticus</i> (c) (Cardon et du Chatenet, 1990).	76
Figure 2.3. Répartition géographique des trois espèces de <i>Rhamnus</i>	77
Figure 2.4. Représentation de l'espèce <i>R. luteola</i> (Cardon et du Chatenet, 1990).	78
Figure 2.5. Répartition géographique de <i>R. luteola</i>	78
Figure 2.6. Structure du noyau flavonoïde (Schweppe 1993).	79
Figure 2.7. Structures des principaux flavonols aglycones rencontrés dans les fruits de <i>Rhamnus</i> (Harborne, 1994).	80
Figure 2.8. Structure chimique du rhamninoïde (Marzouk et al., 1999).	81
Figure 2.9. Structure chimique de l'acétyl-rhamninoïde (Satake et al., 1993).	82
Figure 2.10. Structure chimique du 3-O-(3''-O-coumaroyl)-rhamninoïde de rhamnétine (Özipek et al., 1994).	82
Figure 2.11. Structure chimique de la quercitrine (Özipek et al., 1994).	83
Figure 2.12. Structures des principales flavones aglycones rencontrées dans <i>Reseda luteola</i> (Peggie et al., 2007).	83
Figure 2.13. Structures chimiques des flavones glucosylées (Cristea et al., 2003).	84
Figure 2.14. Structures des principaux anthocyanes aglycones rencontrés dans les fruits de <i>R. alaternus</i> (Longo et al., 2005).	85
Figure 2.15. Structures des principales anthraquinones aglycones rencontrées dans les fruits de <i>Rhamnus</i> (Schweppe, 1993 ; Rafaëly et al., 2008).	86
Figure 2.16. Structures des principales anthraquinones rhamninoïdes rencontrées dans les fruits de <i>Rhamnus</i> (Coşkun et al., 2001 ; Mai et al., 2001).	87
Figure 2.17. Structure de la franguline B (Lin et al., 1990).	88

Figure 2.18. Structures de l'émodinanthrone et de diverses bianthrones présentes dans le genre <i>Rhamnus</i> (Mai et al., 2001).	89
Figure 2.19. Rétrocyclisation observée lors de la fragmentation des flavonols aglycones et en particulier la rhamnétine (Tsimogiannis et al., 2007).	92
Figure 2.20. Liaisons hydrogène présentes dans la quercétine (a) et dans la rhamnazine (b).	93
Figure 2.21. Comparaison des spectres UV-Visible du 3-O-glucoside de quercétine (a), de le 4'-O-glucoside de quercétine (b) et de la quercétine (c).	94
Figure 2.22. Schéma de fragmentation et spectre de masse, en mode positif (a) et négatif (b), du 3-O-rhamninoside de rhamnétine.	96
Figure 2.23. Chromatogramme à 250 nm des fruits matures de <i>Rhamnus purshianus</i>	98
Figure 2.24. Structure des composés caractérisés par RMN.	99
Figure 2.25. Chromatogrammes CLHP/UV-Visible, à 350 nm, des fruits immatures de <i>Rhamnus saxatilis</i> (a), <i>catharticus</i> (b) et <i>alaternus</i> (c).	109
Figure 2.26. Agrandissement des chromatogrammes CLHP/UV-Visible à 350 nm des fruits immatures de <i>Rhamnus hydrolysés</i> : <i>R. saxatilis</i> (a), <i>R. catharticus</i> (b) et <i>R. alaternus</i> (c).	113
Figure 2.27. Agrandissement des chromatogrammes à 450 nm des anthraquinones de <i>R. saxatilis</i> (a), <i>R. catharticus</i> (b) et <i>R. alaternus</i> (c).	115
Figure 2.28. Dendrogramme des 16 espèces de <i>Rhamnus</i> construit à partir du pourcentage relatif en flavonols.	120
Figure 2.29. Dendrogramme des 16 espèces de <i>Rhamnus</i> construit à partir du pourcentage relatif en anthraquinones.	124
Figure 2.30. Échantillon "Stil de grain" de la pharmacie.	128
Figure 2.31. Agrandissement des chromatogrammes des flavonols à 350 nm (a) et des anthraquinones à 450 nm de l'échantillon de la pharmacie.	129
Figure 2.32. Dendrogrammes des 16 espèces de <i>Rhamnus</i> et de l'échantillon ancien construits à partir du pourcentage relatif des flavonols (a) et des anthraquinones (b).	132
Figure 2.33. Chromatogramme CLHP/UV à 350 nm de la gaude.	133
Figure 2.34. Électrophérogramme EC/UV-Visible à 350 nm de la gaude.	134

Partie 3

Figure 3.1. Structure chimique de l'aluminon.	140
Figure 3.2. Chromatogrammes à 350 nm de l'extrait coloré après extraction par le tampon acétique (a) et par HCl à chaud (b).	141

Figure 3.3. Courbes de distribution des espèces libres et complexées de l'acétate et de Al(III) en fonction du pH (Persson et al., 1998).	142
Figure 3.4. Chromatogramme à 450 nm de la laque de garance après décomplexation par le tampon acétique.	143
Figure 3.5. Chromatogramme à 350 nm des colorants extraits à partir d'un tissu après décomplexation par le tampon acétique.	144
Figure 3.6. Représentation de l'Indienne N° 7.	146
Figure 3.7. Représentation de l'Indienne N° 102.	148
Figure 3.8. Représentation de l'Indienne N° 1997.14.1.	149
Figure 3.9. Représentation de l'Indienne N° 2002.0.610.	150
Figure 3.10. Représentation de l'Indienne N° 2003.0.777.	151
Figure 3.11. Représentation de l'Indienne N° 2002.0.1458.	152
Figure 3.12. Représentation de l'Indienne N° 2002.0.120.	153
Figure 3.13. Représentation de l'Indienne N° 2002.0.1452.	154
Figure 3.14. Représentation d'un droulet (à gauche) et d'un jupon (à droite).	155
Figure 3.15. Cadre métallique pour l'impression.	157
Figure 3.16. Colorants (à gauche) et table (à droite) utilisés pour l'impression des tissus.	158
Figure 3.17. Motifs commercialisés par Les Olivades.	159
Figure 3.18. Réduction de l'indigo en sel de leuco-indigo et régénération par oxydation. ...	160
Figure 3.19. Essais de teinture sur coton.	161

Partie Expérimentale

Figure E.1. Schéma du prototype SOLEX.	169
Figure E.2. Schéma du PEX 3.	171
Figure E.3. Représentation graphique des points expérimentaux intervenant dans le PCC.	172
Figure E.4. Espace $L^*a^*b^*$	177

Annexes

Figure A.1. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-acétyl-rhamninoside de kaempférol.	211
Figure A.2. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-acétyl-rhamninoside de rhamnazine.	212

Figure A.3. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-acétyl-rhamninoside de rhamnocitrine.	213
Figure A.4. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-rhamninoside d'isorhamnétine.	214
Figure A.5. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-rhamninoside de kaempférol.	215
Figure A.6. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-rhamninoside de quercétine.	216
Figure A.7. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-rhamninoside de rhamnazine.	217
Figure A.8. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-rhamninoside de rhamnétine.	218
Figure A.9. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-rhamninoside de rhamnocitrine. ...	219
Figure A.10. Spectres de masse, en mode positif, du 4'-O-rhamninoside de kaempférol.	220
Figure A.11. Spectres de masse, en mode positif, du 4'-O-rhamninoside de quercétine.	221
Figure A.12. Spectres de masse, en mode positif, du 4'-O-rhamninoside de rhamnétine.	222
Figure A.13. Spectres de masse, en mode positif, du 4'-O-rhamninoside de rhamnocitrine.	223
Figure A.14. Spectres de masse, en mode positif, de l'isorhamnétine.	224
Figure A.15. Spectres de masse, en mode positif, du kaempférol.	225
Figure A.16. Spectres de masse, en mode positif, de la quercétine.	226
Figure A.17. Spectres de masse, en mode positif, de la rhamnazine.	227
Figure A.18. Spectres de masse, en mode positif, de la rhamnétine.	228
Figure A.19. Spectres de masse, en mode positif, de la rhamnocitrine.	229
Figure A.20. Spectres de masse, en mode positif, du 6-O-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émodyne.	231
Figure A.21. Spectres de masse, en mode positif, du 6-O-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne.	232
Figure A.22. Spectres de masse, en mode positif, du 6-O-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne.	233
Figure A.23. Spectres de masse, en mode positif, du 6-O-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émodyne.	234
Figure A.24. Spectres de masse, en mode positif, du 6-O-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émodyne.	235
Figure A.25. Spectres de masse, en mode positif, de l'aloé-émodyne.	236
Figure A.26. Spectres de masse, en mode positif, du chrysophanol.	237
Figure A.27. Spectres de masse, en mode positif, de l'émodyne.	238
Figure A.28. Spectres de masse, en mode positif, de la franguline A.	239
Figure A.29. Spectres de masse, en mode positif, de la franguline B.	240
Figure A.30. Spectre RMN ¹ H de l'émodyne.	242
Figure A.31. Spectre RMN ¹ H du 6-O-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émodyne.	243

Figure A.32. Spectre RMN COSY du 6-O-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émidine.	244
Figure A.33. Spectre RMN NOESY du 6-O-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émidine.	245
Figure A.34. Spectre RMN ¹ H du 6-O-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émidine.	246
Figure A.35. Spectre COSY du 6-O-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émidine.	247
Figure A.36. Spectre NOESY du 6-O-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émidine.	248
Figure A.37. Spectre RMN HSQC du 6-O-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émidine. ...	249
Figure A.38. Spectre RMN HMBC du 6-O-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émidine.	250
Figure A.39. Spectre RMN ¹ H du 6-O-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émidine.	251
Figure A.40. Spectre RMN COSY du 6-O-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émidine.	252
Figure A.41. Spectre RMN HSQC du 6-O-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émidine.	253
Figure A.42. Spectre RMN HMBC du 6-O-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émidine.	254
Figure A.43. Spectre RMN ¹ H du 6-O-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émidine.	255
Figure A.44. Spectre RMN COSY du 6-O-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émidine. ...	256
Figure A.45. Spectre RMN NOESY du 6-O-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émidine.	257
Figure A.46. Spectre RMN HSQC du 6-O-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émidine. ...	258
Figure A.47. Spectre RMN ¹ H du 6-O-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émidine.	259
Figure A.48. Spectre RMN COSY du 6-O-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émidine.....	260
Figure A.49. Spectre RMN NOESY du 6-O-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émidine.	261
Figure A.50. Chromatogrammes de l'indienne N°7.	272
Figure A.51. Chromatogrammes de l'indienne N°102.	273
Figure A.52. Chromatogrammes de l'indienne N°1997.14.1.	274
Figure A.53. Chromatogrammes de l'indienne N°2002.0.610.	275
Figure A.54. Chromatogrammes de l'indienne N°2003.0.777.	276
Figure A.55. Chromatogrammes de l'indienne N°2002.0.1458.	278
Figure A.56. Chromatogrammes de l'indienne N°2002.0.120.	280
Figure A.57. Chromatogrammes de l'indienne N°2002.0.1452.	282
Figure A.58. Chromatogrammes des fils prélevés sur le jupon N°2003.0.835.	283
Figure A.59. Chromatogrammes des fils prélevés sur le jupon N°2003.0.802.	283
Figure A.60. Chromatogrammes des fils prélevés sur le droulet N°2003.0.113.	284
Figure A.61. Chromatogrammes des fils prélevés sur le jupon N°2003.0.812.	284

Liste des tableaux

Partie 1

Tableau 1.1. <i>Données chromatographiques des anthraquinones de la garance.</i>	42
Tableau 1.2. <i>Valeurs réelles du PCC et leur rendement en colorant correspondant.</i>	49
Tableau 1.3. <i>Résumé de l'analyse de la variance du modèle statistique.</i>	50
Tableau 1.4. <i>Proportion relative en anthraquinones dans les extraits de garance.</i>	55
Tableau 1.5. <i>Effets des différents paramètres sur l'extraction de chaque composé.</i>	56
Tableau 1.6. <i>Rapport de dégradation ($R_{dég}$) pour chaque expérience.</i>	58
Tableau 1.7. <i>Comparaison du rendement pour les trois procédés d'extraction.</i>	59
Tableau 1.8. <i>Pourcentage relatif en anthraquinones pour les extraits de garance obtenus par les trois procédés d'extraction.</i>	61
Tableau 1.9. <i>Proportion relative en anthraquinone pour chaque échantillon ancien.</i>	69
Tableau 1.10. <i>Valeurs de $L^*a^*b^*$, de saturation (S^*) et de teinte (H°) pour les échantillons anciens de garance.</i>	70

Partie 2

Tableau 2.1. <i>Données chromatographiques des flavonols aglycones.</i>	92
Tableau 2.2. <i>Données chromatographiques des flavonols glycosylés.</i>	95
Tableau 2.3. <i>Données RMN de l'émodine et du 6-O-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émodine.</i>	101
Tableau 2.4. <i>Données RMN du 6-O-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émodine.</i>	104
Tableau 2.5. <i>Données RMN du 6-O-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émodine.</i>	105
Tableau 2.6. <i>Données RMN 6-O-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émodine.</i>	106
Tableau 2.7. <i>Données RMN du 6-O-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émodine.</i>	107
Tableau 2.8. <i>Données chromatographiques des anthraquinones présents dans les Rhamnus.</i>	108
Tableau 2.9. <i>Composition et pourcentage relatif en flavonols pour les différents Rhamnus.</i>	111
Tableau 2.10. <i>Description des espèces de Rhamnus étudiées pour les fruits matures.</i>	117
Tableau 2.11. <i>Composition chimique en flavonols des différents Rhamnus matures.</i>	118
Tableau 2.12. <i>Composition chimique en anthraquinones des différents Rhamnus matures.</i>	122

Tableau 2.13. <i>Données de régression linéaire, limite de détection et limite de quantification pour les composés étudiés.</i>	125
Tableau 2.14. <i>Masse (mg) des composés étalons par g de Rhamnus.</i>	125
Tableau 2.15. <i>Composition chimique en flavonols et en anthraquinones des différents Rhamnus matures.</i>	127
Tableau 2.16. <i>Caractérisation des colorants de la gaude.</i>	132

Partie 3

Tableau 3.1. <i>Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 7.</i>	147
Tableau 3.2. <i>Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 102.</i>	148
Tableau 3.3. <i>Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 1997.14.1.</i>	149
Tableau 3.4. <i>Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 2002.0.610.</i>	150
Tableau 3.5. <i>Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 2003.0.777.</i>	151
Tableau 3.6. <i>Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 2002.0.1458.</i>	152
Tableau 3.7. <i>Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 2002.0.120.</i>	153
Tableau 3.8. <i>Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 2002.0.1452.</i>	154
Tableau 3.9. <i>Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 2002.0.1452.</i>	155

Partie Expérimentale

Tableau E.1. <i>Réactifs utilisés.</i>	167
Tableau E.2. <i>Anthraquinones utilisées pour identifier les molécules extraites à partir de garance.</i>	168
Tableau E.3. <i>Gradient CLHP pour l'analyse des colorants anthraquinoniques de la garance.</i>	170
Tableau E.4. <i>Description des 20 expériences intervenant dans le PCC.</i>	173
Tableau E.5. <i>Valeurs des variables aux 5 niveaux utilisées lors du PCC.</i>	175

Tableau E.6. <i>Flavonols utilisés pour identifier les molécules extraites à partir de Rhamnus.</i>	178
Tableau E.7. <i>Description des espèces de Rhamnus étudiées pour les fruits immatures.</i>	178
Tableau E.8. <i>Gradient CLHP pour l'analyse des flavonoïdes présents dans le genre Rhamnus.</i>	179
Tableau E.9. <i>Les molécules standards d'anthraquinones.</i>	180
Tableau E.10. <i>Gradient CLHP pour l'analyse des anthraquinones présentes dans le genre Rhamnus.</i>	181
Tableau E.11. <i>Flavones utilisées pour identifier les molécules extraites à partir de la gaude.</i>	183

Annexes

Tableau A.1. <i>Spectres UV/Visible des anthraquinones de la garance.</i>	205
Tableau A.2. <i>Spectres UV/Visible des flavonols des Rhamnus.</i>	206
Tableau A.3. <i>Spectres UV/Visible des anthraquinones des Rhamnus.</i>	208
Tableau A.4. <i>Spectres UV/Visible des flavones de la gaude.</i>	209
Tableau A.5. <i>Pourcentages relatifs en flavonols.</i>	263
Tableau A.6. <i>Pourcentages relatifs en anthraquinones.</i>	264
Tableau A.7. <i>Description des indiennes.</i>	270
Tableau A.8. <i>Description des jupons et droulets.</i>	270

Abréviations

λ_{\max} : Longueur d'onde d'absorption maximale
AcOEt : Acétate d'éthyle
AcOH : Acide acétique
CLHP : Chromatographie liquide haute performance
COSY : Correlation spectroscopy
 δ : Déplacement chimique (RMN)
d : Doublet (RMN)
dd : Doublet de doublet (RMN)
DMF : Diméthylformamide
ECZ : Électrophorèse capillaire de zone
ESI : Ionisation par électrospray
HMBC : Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC : Heteronuclear single quantum correlation
J : constante de couplage (RMN)
m : multiplet (RMN)
MeCN : Acétonitrile
MeOH : Méthanol
m/z : Rapport masse sur charge (SM)
NOESY : Nuclear Overhauser effect spectroscopy
RMN : Résonance magnétique nucléaire
s : Singulet (RMN)
S : Solvant
SM : Spectrométrie de masse
SPE : Extraction sur phase solide
T : Température
TFA : Acide trifluoroacétique
 t_R : Temps de rétention (CLHP)
UA : Unité d'absorbance
UV : Ultra-violet

INTRODUCTION GÉNÉRALE ET PROBLÉMATIQUE

Depuis plusieurs années, l'équipe de chimie appliquée à l'art et à l'archéologie du laboratoire de chimie bioorganique et des systèmes moléculaires vectoriels de l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse est spécialisée dans l'étude des pigments et des colorants naturels. Ces derniers interviennent dans les œuvres d'art (peintures de chevalet, peintures murales, icônes...) ainsi que dans la teinture de tissus. Leur identification présente un grand intérêt aussi bien pour l'historien, que pour le restaurateur ou encore l'archéologue.

Les plantes tinctoriales ont toujours tenu une place importante dans les échanges commerciaux internationaux ; elles ont été l'une des raisons principales des voyages et des explorations. Depuis l'antiquité, elles constituaient la matière première pour la fabrication de pigments et pour la teinture des textiles. À partir de la fin du XVIII^{ème} siècle, la culture de nombreuses plantes tinctoriales a été largement présente en Provence, et plus précisément dans le Vaucluse. C'est le cas de la garance, autour des Sorgues, ainsi que les plantes à indigo comme le pastel et la renouée dans la région de Cavaillon. De plus, la ville d'Avignon constituait un lieu de commerce important de baies de différents nerpruns, dont un colorant jaune était extrait. Ces baies étaient commercialisées sous l'appellation "graines d'Avignon".

Ces colorants naturels ont été à la base de l'impression de tissus apparus en Provence au début du XVII^{ème} siècle, appelés "indiennes" et ancêtres de nos actuels tissus provençaux. Ces textiles, dont les techniques d'impression proviennent des Indes, ont connu un vif succès pendant près de deux siècles où les industries d'indiennes se développèrent. Leur apogée se situa vers 1840-1850 où l'on compte, notamment, près de onze établissements dans le Vaucluse. Mais, vers la fin du XIX^{ème} siècle, la plupart des ateliers fermèrent leur porte à cause de la guerre de 1870 et du changement de mode, qui porteront un coup fatal à cette industrie ainsi qu'à la culture des plantes tinctoriales. La culture de la garance sera frappée elle aussi quelques années plus tard, concurrencée par la synthèse industrielle de son principal colorant, l'alizarine.

La Provence, terre d'histoire et d'art, renferme de nombreux musées où sont conservés objets, documents, témoignages caractérisant cette région. C'est le cas du Palais du Roure et du Museon Arlaten. Le Palais du Roure, musée situé en Avignon, était tout d'abord un hôtel créé par Pierre Baroncelli. Cet établissement devint un foyer du félibrige et l'une de ses principales fréquentations était le poète Frédéric Mistral. En 1918, Jeanne de Flandreysy racheta le bâtiment pour y créer un lieu consacré à la culture méditerranéenne. Ce musée conserve aujourd'hui de nombreux objets liés à l'industrie des indiennes.

Le Museon Arlaten (musée arlésien) est situé au cœur de la ville d'Arles et a été créé, en 1899, à l'initiative de Frédéric Mistral. C'est ce dernier qui initia, dès la fin du XIX^{ème} siècle, la collecte d'objets et documents issus du quotidien (costumes, mobilier, outils de travail, livres...) qui constitue un fond estimé aujourd'hui à 30 000 pièces.

Enfin, la pharmacie de l'ancien hôpital dédié à Sainte-Marthe, dont l'activité s'est échelonnée du XVIII^{ème} au XX^{ème} siècle et qui est localisée sur le site actuel de l'Université d'Avignon offre un ensemble de matériaux naturels parfaitement conservés, tels que diverses substances pharmacologiques mais aussi des pigments et des colorants que les peintres de l'époque pouvaient acquérir.

Nous avons eu l'opportunité d'avoir accès à ces trois lieux de conservation et à leurs prestigieuses collections : colorants naturels d'époque, indiennes et costumes du XIX^{ème} siècle que nous avons pu étudier et analyser.

Par ailleurs, la rencontre avec la société Les Olivades[®] nous a permis de connaître les techniques modernes d'impression, de les comparer aux méthodes utilisées dans le passé et de voir l'importance et le renouveau des colorants naturels dans l'industrie textile.

Une collaboration scientifique, dans le cadre d'une bourse Région/Entreprise, a ainsi permis la réalisation de ce sujet de thèse portant sur les colorants naturels historiquement employés lors de la teinture des indiennes dans le but de les appliquer à la fabrication d'une collection de tissus. À partir d'un ouvrage relatant les différentes techniques de teinture ainsi que les nombreuses plantes tinctoriales utilisées autrefois en Provence (Delormois, 1770), deux couleurs ont été choisies dans le cadre de ce doctorat, en liaison directe avec les objectifs de l'entreprise :

- le rouge obtenu à partir de la garance (famille des *Rubiaceae*, genre *Rubia*),
- Le jaune extrait de plusieurs nerpruns (famille des *Rhamnaceae*, genre *Rhamnus*) ainsi que de la gaude (famille des *Resedaceae*, genre *Reseda*).

La garance (*Rubia tinctorum*) est une plante tinctoriale appartenant à la famille des *Rubiaceae*. Elle a été largement employée depuis l'Antiquité pour la teinture (coton, laine et soie) ainsi qu'en peinture. Les racines de garance contiennent des colorants anthraquinoniques correspondant à des molécules glycosylées et/ou aglycones, dont la plus connue est l'alizarine. Cette plante a déjà fait l'objet d'une étude approfondie dans notre équipe de recherche. Quelques améliorations et compléments ont été réalisés au niveau de l'analyse,

mais la partie innovante se situe au niveau de l'extraction de ses colorants à l'aide des ultrasons. En effet, l'extraction des substances naturelles à partir des matières végétales tient une place importante dans la chimie actuelle que ce soit au laboratoire, lors de la préparation de l'échantillon ou dans l'industrie. Les propriétés des ondes ultrasonores, représentées essentiellement par le phénomène de cavitation, sont appliquées depuis plusieurs années aux matrices végétales dans le but d'améliorer les protocoles d'extraction en comparaison des techniques traditionnelles comme l'agitation, le chauffage à reflux ou bien l'extraction par soxhlet. Un protocole optimum a été élaboré pour extraire les colorants rouges des racines de garance *via* l'utilisation d'ultrasons. De plus, ce procédé pourrait être employé à plus grande échelle tel que dans l'industrie du textile.

Quant aux colorants jaunes, ils appartiennent à différentes familles chimiques. C'est le cas des caroténoïdes (*Crocus* spp., *Iridaceae*), des curcuminoïdes (*Curcuma* spp., *Zingiberaceae*) ou des berbérines (*Berberis* spp., *Berberidaceae*). Mais ce sont les flavonoïdes qui sont représentés dans la majorité des plantes tinctoriales jaunes. Les fruits immatures des différents nerpruns (*Rhamnus* spp., *Rhamnaceae*) employés lors de la fabrication du jaune d'Avignon, contiennent des flavonols tandis que la gaude (*Reseda luteola*, *Resedaceae*) est composée de flavones. Ces plantes tinctoriales étaient largement utilisées en Provence tant en teinture qu'en peinture. Les baies de nerpruns, à l'état mature, contiennent également des anthraquinones ainsi que des anthocyanes. Cette étude a été effectuée sur des plantes tinctoriales dont certaines ont été certifiées botaniquement. Elles peuvent être commerciales, récoltées par nos soins ou encore gracieusement fournies par des botanistes ou des jardins botaniques. Cet échantillonnage a pour but (i) de mieux connaître les espèces utilisées pour la fabrication des jaunes, (ii) de comparer les divers échantillons entre eux en fonction de leur lieu géographique de récolte et (iii) de caractériser chimiquement chacune des espèces botaniques.

En ce qui concerne les études de cas, plusieurs échantillons ont été étudiés. Le premier, étiqueté "Stil de grain", provient de la pharmacie de l'ancien hôpital dédié à Sainte-Marthe. D'autres échantillons datant du XIX^{ème} siècle ont été prélevés au Palais du Roure, représentant un ensemble de pots contenant des racines de garance, de la laque de celle-ci et divers colorants rouges. Ces pots proviennent de la maison Foulc qui était alors l'atelier d'indiennes le plus important et le plus prospère d'Avignon (1822-1882).

De plus, notre laboratoire a eu l'opportunité d'avoir accès aux collections d'indiennes du Palais du Roure ainsi que du Museon Arlaten. Ces échantillons ont été prélevés à partir d'indiennes, de jupons et de droulets.

L'analyse de l'ensemble de ces échantillons constitue un bon moyen de connaître les sources d'approvisionnement de l'époque, les techniques employées ainsi que d'évaluer l'état de conservation des échantillons vieilliss.

Ce manuscrit s'articule autour de trois parties correspondant respectivement à l'étude de la garance, à celle du jaune d'Avignon ainsi qu'à la gaude et enfin, une application à l'analyse d'échantillons anciens est présentée. La première partie sur la garance présente l'extraction des colorants anthraquinoniques à l'aide de divers procédés. Dans la seconde partie, une étude sur la composition chimique de la gaude et de différentes espèces de nerprun a été développée dans le but d'avoir une meilleure connaissance de ces plantes tinctoriales. Enfin, l'ensemble des résultats précédemment obtenus est appliqué à l'analyse d'objets historiques provenant du patrimoine culturel. Des essais de teinture ont également été réalisés, en collaboration avec Les Olivades[®], dans le but de commercialiser une collection de tissus à base de colorants naturels.

ORGANISATION DES TRAVAUX

Lors de l'étude fondamentale, nos objectifs se sont concentrés autour de l'extraction, l'analyse et la différenciation, entre espèces botaniques, des colorants naturels précédemment évoqués. Dans ce contexte, les travaux ont été développés suivant plusieurs points :

- Optimisation d'un procédé d'extraction, assisté par ultrasons, des colorants anthraquinoniques de la garance.
- Mise au point de conditions chromatographiques nécessaires à l'étude des composés présents dans les matériaux colorés.
- Recherche et caractérisation des marqueurs chimiques spécifiques des espèces botaniques étudiées.
- Comparaison de la composition chimique des différentes espèces en fonction de leur stade de maturité et de leur répartition géographique.
- Application des principaux résultats obtenus à l'identification d'échantillons historiques.

Les diverses techniques analytiques employées pour la séparation et l'identification des composés correspondent à la Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à une détection UV-Visible (CLHP/UV-Visible) et à une double détection UV-Visible/Spectrométrie de masse (CLHP/UV/SM). Les colorants jaunes de la gaude ont pu également être étudiés par Électrophorèse Capillaire de Zone (ECZ/UV-Visible).

La caractérisation de certains composés non commerciaux nécessite de les isoler et de les purifier avant leur analyse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) monodimensionnelle (^1H et ^{13}C) et bidimensionnelle homonucléaire (COSY ^1H - ^1H et NOESY ^1H - ^1H) ou hétéronucléaire (HMBC ^{13}C - ^1H et HSQC ^{13}C - ^1H).

Enfin, lors de l'analyse d'échantillons anciens (laques et indiennes), une étape préalable de décomplexation doit être réalisée dans le but de solubiliser les colorants "impliqués" dans le complexe métallique. Pour effectuer ce prétraitement, une méthode d'extraction non dénaturante a été élaborée et comparée au protocole traditionnel utilisant de l'acide chlorhydrique.

PARTIE 1

LES COLORANTS ROUGES DE LA GARANCE

Chapitre I. Étude bibliographique

I.1. HISTORIQUE (Cardon, 2003)

La garance est l'une des plantes tinctoriales dont les utilisations comptent parmi les plus anciennes que ce soit sur des étoffes de coton retrouvées à Mohenjo-Daro, en Inde (3250 à 2750 av. J.-C.), ou sur du lin dans des tombes de la vallée du Nil (1350 av. J.-C.). On la retrouva également mentionnée dans les premiers écrits sumériens ainsi que dans la Bible.

Sa culture était très répandue en Syrie ainsi qu'en Mésopotamie mais les deux principales régions exportatrices étaient l'Arménie et l'Asie centrale. Jusqu'au début du XVIII^{ème} siècle, l'Inde détient la suprématie dans le domaine de la teinture sur coton. En Europe, c'est la Hollande qui a détenu le monopole de la culture de la garance durant de nombreuses décennies.

La culture de la garance, qui présentait un grand intérêt économique, avait été encouragée sous le règne de Louis XIV. Un édit exonérait de l'impôt toute personne qui la cultiverait dans les anciens marais asséchés. Malheureusement, toutes les tentatives de culture de la plante tinctoriale restaient vaines et à la fin du XVII^{ème} siècle plus aucune garancière n'était présente en France. La Hollande gardait donc le monopole de cette culture.

La garance a été réintroduite en France vers 1760 en Alsace, par Frauzen, et dans le Comtat Venaissin, par un réfugié arménien, Johannis Althonian dit Jean Althen. Ce dernier relança donc la culture de la garance, avec notamment l'appui du marquis de Caumont. Dans un premier temps, son essor ne fût pas significatif car la concurrence régnait avec les importations provenant du Levant. Mais après la révolution française, les cultivateurs se lancèrent dans cette culture qui se développa pendant près d'un siècle. Durant cette période, le Vaucluse comptait une cinquantaine de moulins à garance et générait jusqu'à pratiquement 65% de la garance au niveau mondial avec pour client l'armée française et ses fantassins en pantalons "rouge garance".

Une première crise, en 1861, venait ternir cette période faste avec pour cause une baisse significative des importations de coton d'Amérique due à la guerre, d'où un moindre besoin de matières colorantes. Mais le réel déclin apparut à partir de 1868 avec la mise au point de la synthèse de l'alizarine, le principal colorant de la garance, par deux chimistes allemands Graebe et Liebermann.

Outre la garance des teinturiers, la garance des voyageurs a pu être également récoltée pour la teinture (Wouters, 2001). En France, avant la réintroduction de la garance des teinturiers au XVIII^{ème} siècle, la garance voyageuse a été cultivée dans le Gard à la fin du XVII^{ème} siècle.

I.2. CARACTÈRES BOTANIQUES

Les différentes espèces de garance (genre *Rubia*) appartiennent à la vaste famille des *Rubiaceae* qui comprend plus de 10 000 espèces et 637 genres. Elle se compose d'arbres, d'arbustes, de lianes et de plantes herbacées répandues dans les régions tempérées, tropicales et sub-tropicales. Le genre *Rubia*, comme *Galium* et *Asperula* appartient à la tribu Rubieae de la sous-famille des Rubioideae (Mongrand, 2005 ; Derksen, 2001).

La garance des teinturiers (*Rubia tinctorum* L.) est une plante herbacée vert-clair dont les tiges, d'environ 1 m à section carrée, couchées ou grimpantes, sont munies d'aiguillons crochus. Elle possède une longue tige souterraine ainsi que des racines ramifiées. Les feuilles sont lancéolées et portent sur la face inférieure des nervures secondaires très saillantes (**Figure 1.1a**).

La garance des voyageurs (*Rubia peregrina* L.) est une plante traînante-rampante qui se distingue de la garance des teinturiers par la consistance d'un vert très foncé de ses feuilles et de ses tiges. En comparaison à l'espèce *R. tinctorum*, ses tiges (aériennes et souterraines) sont plus petites comme ses feuilles dont les nervures secondaires ne sont pas saillantes sur la face inférieure (**Figure 1.1b**).

La garance du Munjeet (*Rubia cordifolia* L.), également appelée garance en cœur, est une plante grimpante à tiges robustes souvent garnies d'aiguillons crochus. Ses feuilles ont

des nervures très saillantes et sont en forme de cœur plus ou moins pointu (**Figure 1.1c**). La garance du Sikkim (*Rubia sikkimensis* K.) est également une plante grimpante, mais contrairement à la Munjeet, ses feuilles sont ovales, allongées, pointues au bout et hérissées de poils rudes sur les deux faces. La garance japonaise (*Rubia akane* N.) possède également des feuilles en forme de cœur mais est cependant plus grêle que la Munjeet et constitue depuis 1937 une espèce distincte de la *R. cordifolia*.



Figure 1.1. Représentation des espèces *R. tinctorum* (a), *R. peregrina* (b) et *R. cordifolia* (c) (Cardon et du Chatenet, 1990).

Les différentes espèces de garance se localisent dans deux principales zones. L'Europe occidentale, le pourtour du Bassin Méditerranéen et une grande partie de l'Asie pour la garance des teinturiers (*R. tinctorum* L.) et la garance des voyageurs (*R. peregrina* L.). L'Asie et plus précisément sur les pentes de l'Himalaya où poussent les garances dites indiennes : la garance du Munjeet (*R. cordifolia* L.) et la garance du Sikkim (*R. sikkimensis* K.). Enfin, une espèce est endémique au Japon (*R. akane* N.) (Cardon, 2003) (**Figure 1.2**).

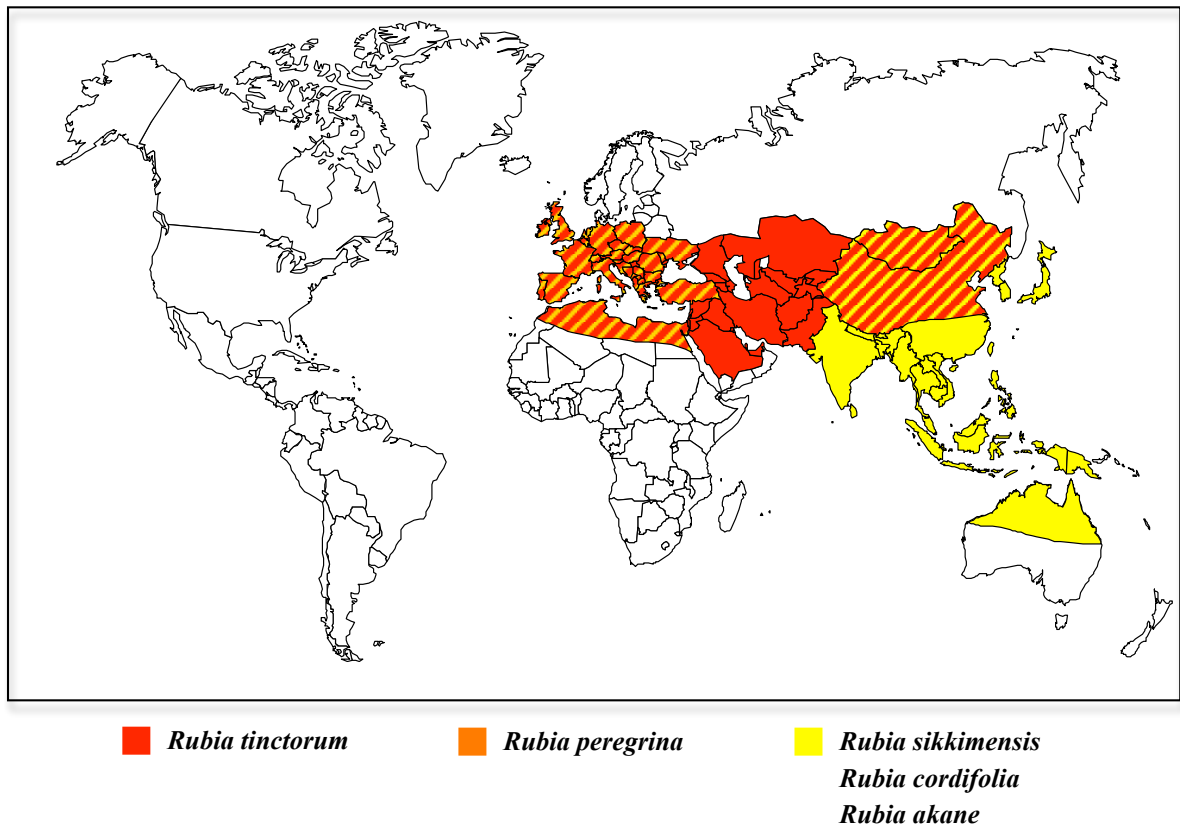


Figure 1.2. Répartition géographique des différentes espèces de garance (Hovaneissian, 2005).

Les colorants ne sont pas répartis uniformément dans la racine. Ils se trouvent en plus grande quantité sous l'écorce, dans le parenchyme cortical et dans la partie phloème. De nombreuses recherches ont également montré que l'alizarine se trouve surtout dans le parenchyme tandis que la pseudopurpurine et la rubiadine sont plutôt dans le phloème. L'écorce contient des quantités plus faibles en colorant, avec beaucoup de tanins, ce qui rend les couleurs obtenues plus foncées. D'une manière générale, dans la plupart des Rubiacées, l'alizarine ne se trouve pas dans les jeunes plants et dans les tiges fines, au contraire de la galiosine (précurseur de la pseudopurpurine) présente en abondance (Hill et Richter, 1937).

I.3. COMPOSITION CHIMIQUE

Les colorants rouges présents dans le parenchyme des racines de garance ont une origine biosynthétique commune. Ils sont constitués d'une structure chimique de base correspondant au noyau anthracène-9,10-dione ou anthraquinone (**Figure 1.3**).

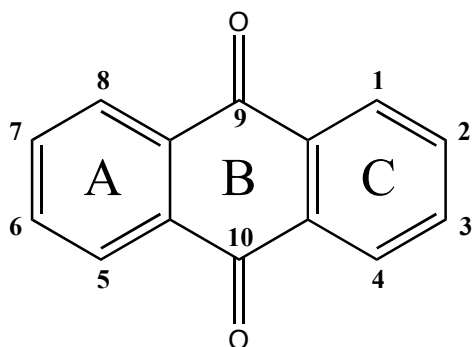


Figure 1.3. Structure du noyau anthraquinone (Burnett et Thomson, 1968).

La biosynthèse des anthraquinones chez les *Rubiaceae* est constituée de deux principaux schémas : celui de l'acide shikimique, formant les noyau A et B, ainsi que celui dit "terpénique" *via* l'acide mévalonique (Leistner et Zenk, 1967 ; Burnett et Thomson, 1968 ; Han et al., 2002).

Les structures anthraquinoniques dites "aglycones", présentes dans la garance, diffèrent selon la nature et le positionnement des substituants sur le noyau C de la structure de base. La plante biosynthétise principalement l'alizarine (1,2-dihydroxyanthraquinone), la lucidine (1,3-dihydroxy-2-hydroxyméthylanthraquinone), la purpurine (1,2,4-trihydroxyanthraquinone) et la rubiadine (1,3-dihydroxy-2-méthylanthraquinone). D'autres anthraquinones ont été identifiées comme l'antragallol (1,2,3-trihydroxyanthraquinone), la munjistine (2-carboxy-1,3-dihydroxyanthraquinone), le nordamnacanthol (2-formyl-1,3-dihydroxyanthraquinone), la pseudopurpurine (3-carboxy-1,2,4-trihydroxyanthraquinone), la quinizarine (1,4-dihydroxyanthraquinone) et la xanthopurpurine ou purpuroxanthine (1,3-dihydroxyanthraquinone) (Schweppe, 1992 ; Derksen et al., 1998 ; Novotná et al., 1999 ; De Santis et Moresi, 2007). Les structures chimiques de ces anthraquinones sont détaillées dans la **figure 1.4**.

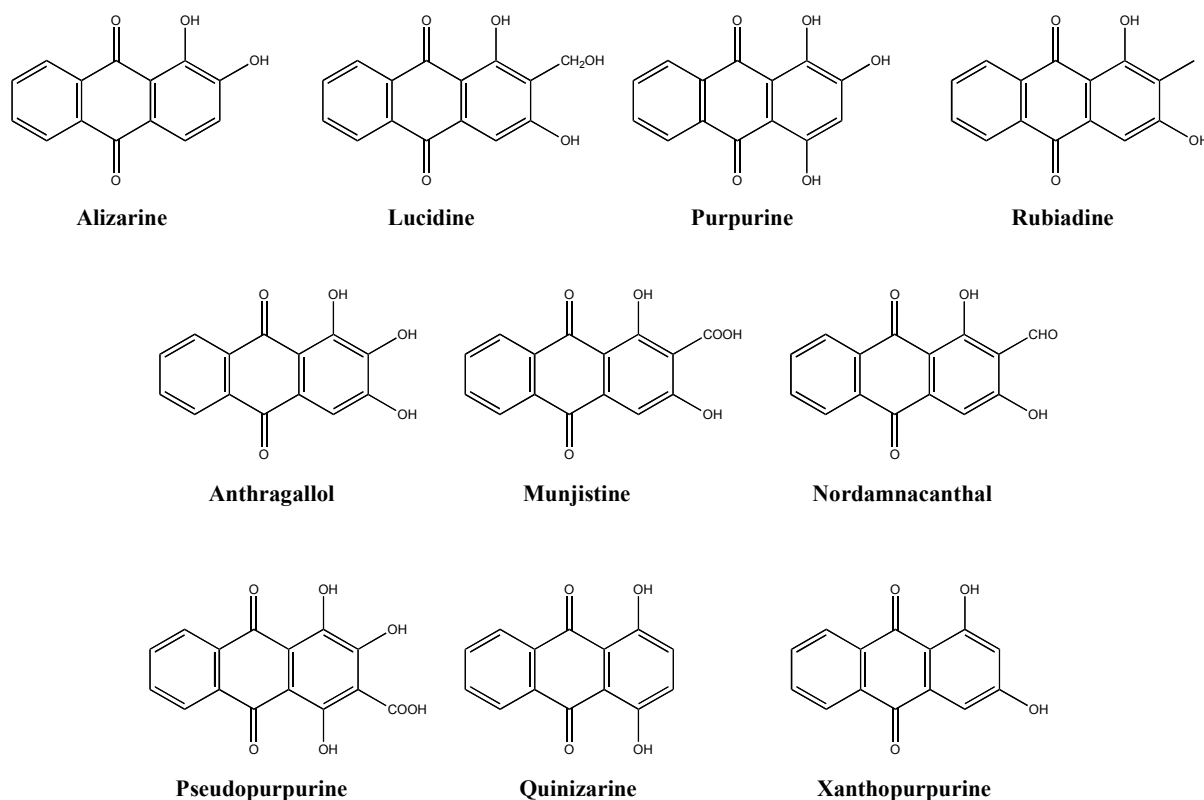


Figure 1.4. Structures des principales anthraquinones aglycones rencontrées dans les racines de garance (Derksen et al., 1998).

L'alizarine est la plus connue des anthraquinones de la garance. En 1826, elle fût isolée pour la première fois de l'espèce *R. tinctorum* (Colin et Robiquet, 1827). En revanche, l'alizarine, sous formes libre et glycosylées, est totalement absente de l'espèce *R. peregrina* (Wouters, 2001).

D'autres structures anthraquinoniques ont également été identifiées dans l'espèce *R. tinctorum* (Kawasaki et al., 1988 ; Kawasaki et al., 1990). Elles correspondent à : la 2-hydroxyméthylquinizarine, la 2-carboxyquinizarine, la 2-hydroxyanthraquinone, la 1-hydroxy-2-méthylantraquinone et la 1-hydroxy-2-hydroxyméthylantraquinone.

Par ailleurs, les anthraquinones présentes dans les racines de garance se rencontrent généralement à l'état d'hétéroside. Le principal groupement osidique entrant dans la composition des anthraquinones glycosylées est un disaccharide constitué de glucose et de xylose : le β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranose ou primevérose.

Les principales anthraquinones glycosylées accumulées dans les racines sont l'acide rubérythrique (2-*O*-β-D-primevéroside d'alizarine) et le 3-*O*-β-D-primevéroside de lucidine. Néanmoins, le 3-*O*-β-D-primevéroside de rubiadine ainsi que la galiosine (1-*O*-β-D-primevéroside de pseudopurpurine) ont également été identifiés (Derksen et al., 1998 ; Derksen et al., 2002; Boldizsár et al., 2006). Les structures chimiques de ces composés hétérosidiques sont présentées dans la **figure 1.5**.

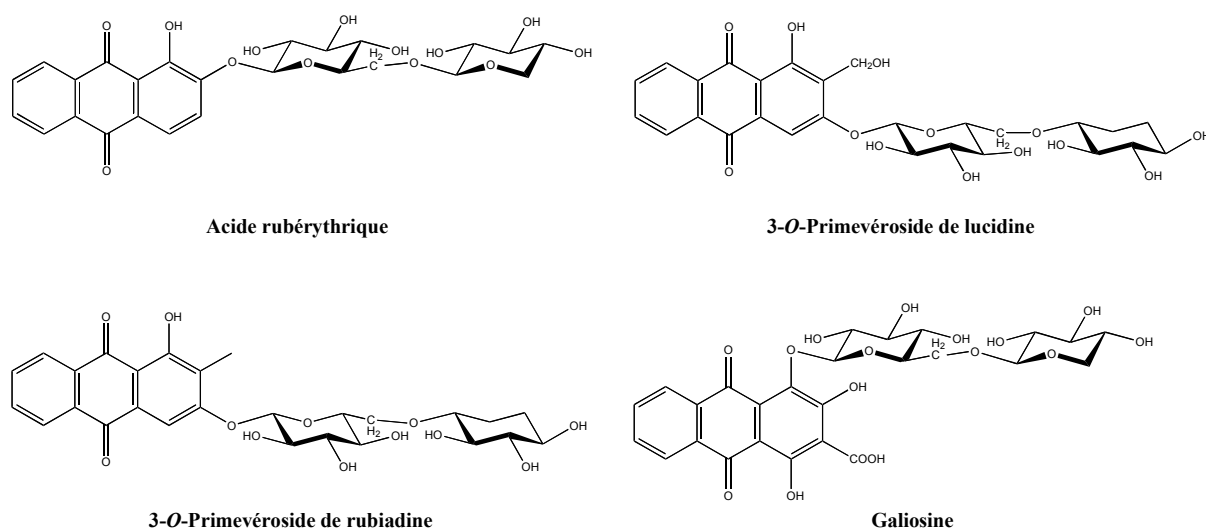


Figure 1.5. Structures des principaux *O*-β-*D*-primevéroside d'anthraquinones (Boldizsár et al., 2006).

Lors de la voie biosynthétique, la plante biosynthétise tout d'abord des composés glycosylés. Ensuite, entre la troisième et la cinquième année de culture, la plante effectue une hydrolyse enzymatique de ces composés glycosylés afin de produire les anthraquinones aglycones (Derksen et al., 2003 ; Nakanishi et al., 2005). La **figure 1.6** représente la formation de la purpurine par double dégradation de la galiosine.

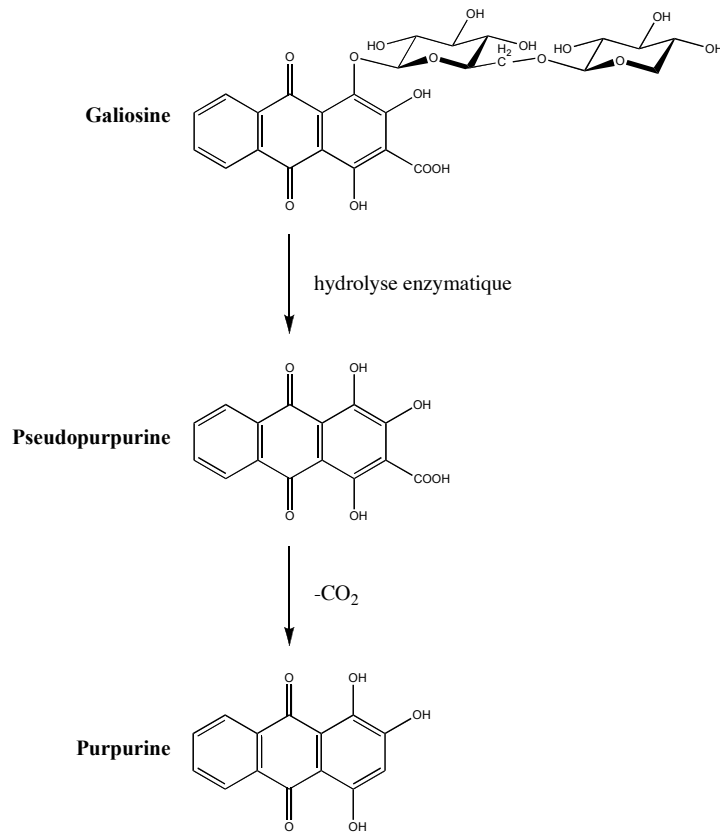


Figure 1.6. Dégradation de la galiosine en purpurine (Hovaneissian 2005).

Les composés aglycones donnent une couleur rouge contrairement aux précurseurs qui sont jaune-orangés. C'est pour cette raison qu'il était recommandé d'attendre trois années au minimum avant de pouvoir utiliser la garance. Jean-Henry Fabre a décrit une expérience permettant aux artisans d'éviter cette attente (Fabre, 1860). En effet, il s'agissait d'imiter l'hydrolyse enzymatique effectuée par la plante en réalisant une hydrolyse acide, qui permettait, selon l'auteur, de "concentrer" la coloration par la libération des composés aglycones. Il appela le produit issu de cette hydrolyse "garancine".

De manière plus secondaire, on peut noter la présence de 3-O-β-D-glucoside de lucidine, de rubiadine et de 2-hydroxyméthylantraquinone mais également celle du 2-C-β-D-glucoside de 1-hydroxyanthraquinone appelé rubianine (Vaidyanathan, 1985 ; El-Emary et al., 1998).

Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, la grande majorité des dérivés anthraquinoniques présents dans les racines de garance sont substitués uniquement sur le noyau C. Néanmoins, plusieurs composés substitués à la fois sur le cycle A et C ont été caractérisés (Kawasaki et al., 1992 b ; El-Emary et Backheet, 1998). Il s'agit de la 2-méthyl-7-hydroxyanthraquinone ou 7-hydroxytectoquinone et de la 3,8-dihydroxy-2-hydroxyméthylanthraquinone (**Figure 1.7**). Ce dernier composé se présente aussi bien sous forme libre que sous forme de 3-O- β -D-glucoside.

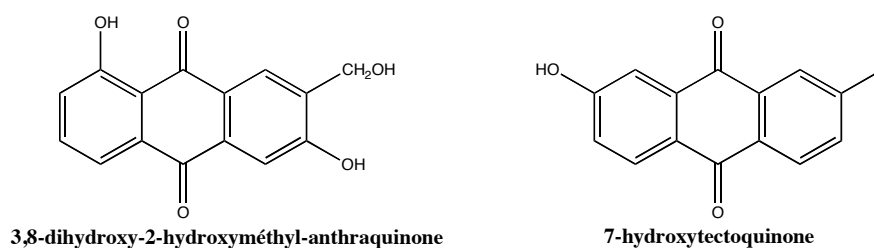


Figure 1.7. Structures d'anthraquinones aglycones substituées sur les cycles A et C (Kawasaki et al., 1992 b ; El-Emary et Backheet, 1998).

I.4. LES ULTRASONS : GÉNÉRALITÉS ET PRINCIPE

Les ultrasons correspondent à un phénomène physique particulier. Ils sont communément rencontrés dans les communications animales, les diagnostics médicaux ou dans la télémétrie sous-marine.

Jusqu'il y a peu, la chaleur, la pression ou bien l'utilisation d'un catalyseur étaient les principaux paramètres employés pour l'accélération d'une réaction chimique. Cependant, le bruit peut être considéré comme source potentielle de perfectionnement de la réactivité chimique.

L'histoire des ultrasons remonte à plus d'une centaine d'années où les travaux de F. Galton, scientifique britannique, s'est intéressé à la fréquence de seuil de l'audition humaine et animale (Galton, 1883). Pour cela il développa un sifflement qui devint la première forme

d'initiateur ultrasonique. La première application commerciale des ultrasons est apparue en 1917 avec le premier "écho-sondeur" inventé et développé par P. Langevin, qui est devenu par la suite le premier SONAR sous-marin pour la détection de sous-marin pendant la deuxième guerre mondiale.

En 1895, J. Thornycroft et S. Barnaby reportèrent pour la première fois le phénomène de cavitation. À partir de là, de nombreuses recherches ont été effectuées sur ce phénomène et une expansion rapide de la commercialisation d'appareil à ultrasons a permis leur application à de nombreux procédés chimiques.

Les ultrasons sont des ondes acoustiques pouvant être diffusées par les gaz, les liquides ainsi que par les solides. Ils ont une fréquence sonore qui va au-delà du seuil de perception de l'oreille humaine, c'est-à-dire au-dessus de 16 kHz (**Figure 1.8**).

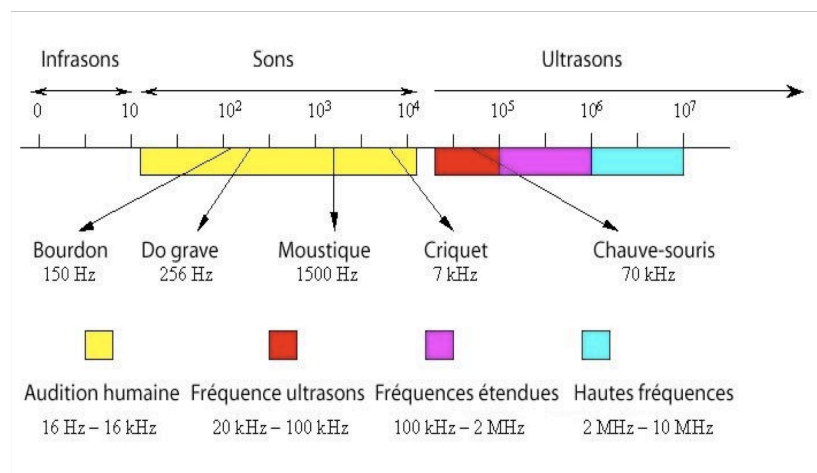


Figure 1.8. Gamme des fréquences sonores (Mason, 1989).

La large classification des ultrasons se situe donc entre 20 kHz et 100 MHz et peut être divisée en deux régions distinctes selon leur utilisation. Des fréquences comprises entre 20 et 40 kHz, favorisant la cavitation, sont normalement utilisées pour propager les ultrasons dans un milieu. De plus hautes fréquences (au-dessus de 5 MHz) sont employées pour le diagnostic comme par exemple l'imagerie médicale (Mason, 1989). Les ultrasons sont générés par l'oscillation de transducteurs, le plus souvent piézoélectriques, transformant l'énergie électrique en énergie mécanique.

L'action des ultrasons dans les milieux liquides donne lieu à la génération, suivie de la destruction, des bulles de cavitation. Comme n'importe quelle onde sonore, l'ultrason est

propagé par l'intermédiaire d'une série de vagues de compression et de raréfaction induites dans les molécules du milieu traversé. Les bulles se développent au cours de quelques cycles successifs jusqu'à atteindre une taille d'équilibre. C'est l'implosion de ces bulles au cours des cycles de compression qui génère de l'énergie dans le milieu (**Figure 1.9**). L'implosion des bulles de cavitation est un phénomène qui s'étend à tout le liquide et qui constitue un lien direct avec la puissance du son (Mason, 1990).

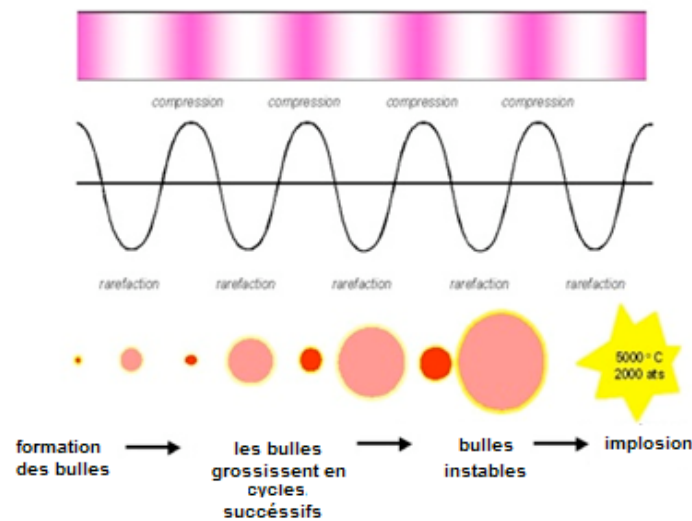


Figure 1.9. Phénomène de cavitation initié par les ondes ultrasonores (Mason, 1990).

A 30kHz, on pourra par exemple créer des vagues de pression qui compriment et décompressent la bulle de cavitation plus de 30 000 fois par seconde. Les études théoriques sont encore très controversées, mais lors de leur implosion, ces bulles éclateraient à plus de 400 km.h⁻¹ à une pression de plusieurs milliers de bars et pourraient générer ponctuellement des températures de plusieurs milliers de degrés (Mason, 1990).

Connus, depuis de nombreuses décennies, les ultrasons ne cessent de trouver de nouveaux débouchés. L'emploi de ces ondes peut être en effet appliqué à de nombreux domaines : pharmaceutique, informatique, médical, chimique, alimentaire, physique ...

Les exemples d'utilisations dans le domaine de la chimie sont variés : nettoyage, dégraissage, décontamination, dégazage, sonochimie, extraction, synthèse, dispersion de particules, fabrication d'émulsion, détartage, agitation, production d'aérosols, séchage,

tamissage, ... Les ultrasons tiennent une place importante dans la chimie de l'extraction avec une augmentation de leur utilisation que ce soit au laboratoire ou dans l'industrie.

Les bulles de cavitation ont une série d'effets dans un milieu liquide selon le type de système dans lequel elles sont produites. Les différents systèmes peuvent être divisés en liquides homogènes ou hétérogènes et solide/liquide. Ce dernier système est le plus fréquemment rencontré dans le domaine de l'extraction.

À la différence d'une phase liquide, l'implosion d'une bulle de cavitation sur ou à proximité de la surface d'un solide est asymétrique parce que la surface fournit une résistance à l'écoulement du liquide. Cette résistance entraîne une éruption du liquide sur la face de la bulle qui se trouve du côté opposé à la surface du solide. Il en découle la formation d'un micro jet liquide puissant dirigé vers le solide (**Figure 1.10**). L'effet est équivalent au nettoyage à l'aide d'un jet à haute pression (Neppiras, 1984). C'est la raison pour laquelle les ultrasons sont notamment employés dans les domaines du décapage ou du nettoyage.

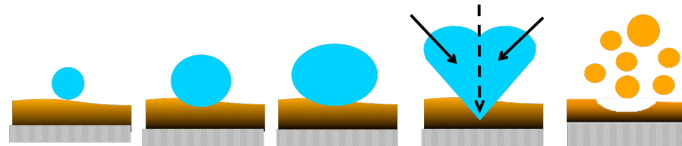


Figure 1.10. Implosion d'une bulle de cavitation à la surface d'un solide (Mason, 1990).

Le phénomène de cavitation peut également produire des effets importants sur des poudres ou de fines particules en suspension dans un liquide. Les imperfections extérieures ou le gaz emprisonné peuvent favoriser la formation de bulles de cavitation à la surface de la particule. L'implosion des bulles de cavitation, dans la phase liquide, sur une particule accompagnée de collisions inter-particulaires peut mener à l'érosion des particules et donc à la réduction de leur dimension (Mason, 1990).

Grâce à l'implosion de ces bulles de cavitation, l'extraction de substances naturelles à partir de matières végétales ou animales va être optimisée en comparaison avec des techniques conventionnelles (macération, chauffage au reflux, soxhlet, ...). En effet, le rendement en principes actifs est largement augmenté tout en réduisant le temps de traitement

(Hagenson et Doraiswamy, 1998 ; Hemwimol et al., 2006 ; Jacques et al., 2007). L'efficacité des ultrasons est désormais appliquée à l'extraction des colorants, arômes, polyphénols, ainsi qu'à de nombreuses substances à visée pharmacologique (Vila et al., 1999 ; Shotipruk et al., 2001 ; Rodrigues et Pinto, 2007 ; Vilku et al., 2008 ; Wang et al., 2008 ; Zang et al., 2008).

I.5. PROPRIÉTÉS ET UTILISATIONS

I.5.1. Dans le domaine de la couleur

Les colorants anthraquinones de la garance, comme de nombreuses molécules colorantes extraites à partir de matières végétales et animales, ont fait l'objet d'un emploi extrêmement ancien en teinture notamment pour le coton, la laine et la soie (Wouters et Rosario-Chirinos, 1992 ; Trojanowicz et al., 2004 ; Surowiec et al., 2006 ; Clementi et al., 2007), ainsi qu'en peinture (Miliari et al., 1998 ; Cuoco et al., 2008). Néanmoins, l'utilisation de tels matériaux nécessitait des savoir-faire particuliers, permettant l'obtention d'une couleur rouge, stable et durable dans le temps : formation de laque en peinture et mordantage en teinture.

I.5.1.1. Les laques de garance

Dans le but d'imiter voire d'enrichir la palette de couleurs offerte par les pigments minéraux, les artistes ont su très tôt fabriquer des pigments laqués (ou laques) par précipitation des colorants organiques sur un support minéral inerte ou charge. Les laques, mises en suspension dans un liant, pouvaient ensuite constituer des peintures d'excellente qualité.

Le terme "laque" ne fait ici nullement allusion à un aspect de surface et pour mieux comprendre son sens, il faut remonter à une ancienne légende indienne. En effet, selon celle-ci, le Bouddha aurait reçu l'illumination sous un figuier-banien. Arrivé au terme du cycle des réincarnations, il pouvait percevoir les cent mille avatars qu'il avait été dans ses multiples vies antérieures, tout comme le bourdonnement des minuscules cochenilles qui pullulent sur les branches de cet arbre. Ces insectes, dont l'une des particularités est de concentrer des

colorants rouges très intenses, furent nommés *lak* (les cent mille en sanskrit). Ces colorants servirent à fabriquer un pigment qu'on appela laque. Ce terme désigna ensuite non seulement les pigments rouges mais aussi tout pigment obtenu à partir d'une solution de colorant organique (Garcia, 2005).

L'artiste voit dans le mot laque un pigment organique utilisé en peinture, alors que pour le chimiste, il s'agit d'un complexe de coordination entre les colorants (ici les dérivés anthraquinoniques) et un cation métallique (le plus souvent l'aluminium). Les scientifiques ont voulu comprendre comment se formait le complexe de coordination. Les sites de complexation de l'alizarine ont longtemps été controversés. Il pouvait s'agir soit du site appelé "céto-phénolate" constitué par le carbonyle en C-9 et l'hydroxyle (déprotoné) le plus proche en C-1, soit du site "diphénolate" composé des deux hydroxyles en C-1 et C-2 (déprotonés) (**Figure 1.11**).

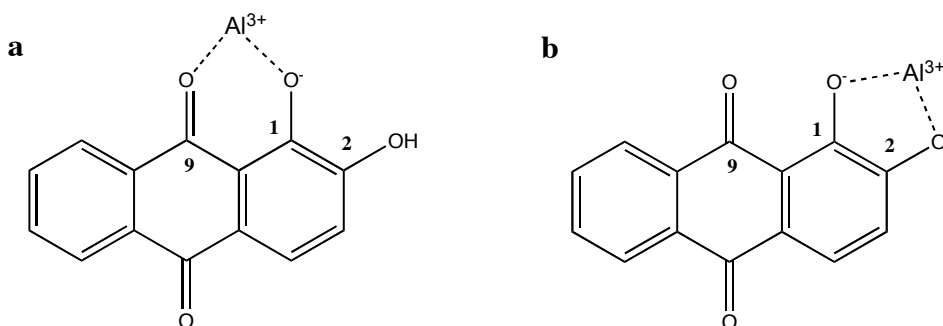


Figure 1.11. Sites de complexation "céto-phénolate" (a) et "diphénolate" (b) de l'alizarine.

Parmi de nombreuses réflexions, Soubayrol propose une structure (**Figure 1.12**) où chaque ion aluminium est lié à deux dianions d'alizarine par leurs sites "céto-phénolates" et chaque molécule d'alizarine est liée à une molécule de l'autre complexe (Al(aliz)₂)⁻ par des liaisons carbonyle (en C-10)-eau-phénolate (en C-2) (Soubayrol, 1996 a ; Soubayrol et al., 1996 b).

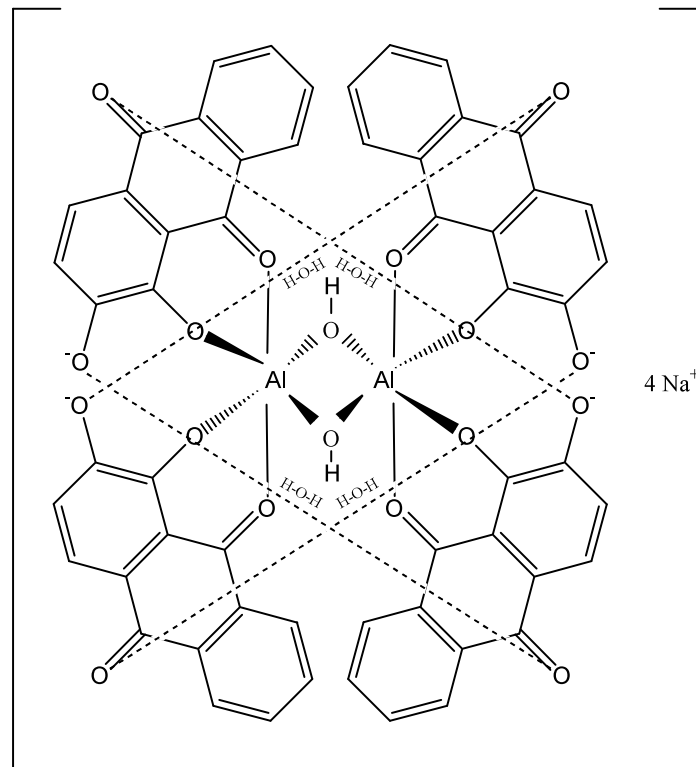
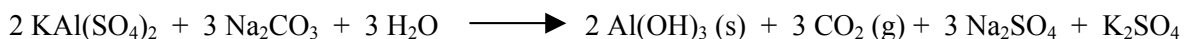


Figure 1.12. Structure du complexe de coordination alizarine-aluminium (Soubayrol et al., 1996 b).

Les recettes de préparation de laques à partir de racines de garance sont variées, souvent anciennes et peu précises. De récents travaux (Sanyova, 2001) montrent que la composition mais également l'aspect des laques dépendent de nombreux facteurs. En effet, le choix de la plante, les paramètres d'extraction (température, durée, pH) ainsi que la nature du précipitant basique (K_2CO_3 , Na_2CO_3 , $CaCO_3$) peuvent faire varier la composition et l'aspect de la laque.

De plus, la quantité de charge par rapport à celle du colorant joue un rôle sur la couleur finale de la laque. Une faible quantité de charge va donner une laque rouge, tandis qu'un excès de charge conduit à une laque plutôt rose (couleur très prisée autrefois). En effet, la base ajoutée va non seulement précipiter les complexes colorés mais aussi réagir sur la charge qui n'a pas servi lors de la complexation et qui se trouve, par conséquent, en excès :



Enfin, on peut remplacer le sel d'aluminium par d'autres, comme par exemple le sel d'étain (IV), de baryum, de fer (III), de plomb, de magnésium, de calcium ou de cuivre. On obtient alors des laques de différentes couleurs : rose (Sn), pourpre (Ca, Ba, Pb), brun-noir (Fe), violet (Mg) ou jaune (Cu) (Pratt, 1947 ; Soubayrol 1996 a).

I.5.1.2. La teinture

Pour l'utilisation de certains colorants comme la garance, les teinturiers devaient également effectuer un mordantage de la fibre textile. Cette opération est basée sur l'utilisation d'un sel métallique appelé "mordant", augmentant l'affinité des fibres textiles pour les colorants et donc la capacité des matériaux fibreux à fixer les molécules colorantes. Parmi les éléments métalliques les plus employés, l'aluminium, du fait de son abondance naturelle, occupe une place majeure. Mais d'autres métaux pouvaient être également utilisés comme le cuivre, le fer ou l'étain, augmentant la gamme de couleurs.

Une hypothèse quant à la structure du complexe de coordination alizarine-aluminium-cellobiose a été proposée par Soubayrol (1996 b). Deux atomes d'aluminium sont liés à quatre molécules d'alizarine, comme lors de la formation de la laque, et les O- libres de ces dernières s'accrochent aux deux unités de cellobiose représentant la fibre cellulosique. Le colorant est véritablement prit en "sandwich" dans la fibre cellulosique d'où le nom de mordant.

Enfin, on peut noter que des protocoles de teinture assistés par ultrasons ont été mis en place principalement dans le but de réduire le temps de traitement ainsi que d'augmenter la qualité de la teinture (Sivakurma et Rao, 2003 ; Kamel et al., 2007).

I.5.2. Dans le domaine pharmacologique, agroalimentaire et sanitaire

Les constituants anthraquinoniques présents dans les racines de garance s'illustrent également par leurs propriétés pharmacologiques. En effet, l'acide rubérythrique a permis à la plante d'occuper une place importante en médecine notamment dans la prévention et l'élimination des calculs rénaux de type oxalate et phosphate de calcium (Richter, 1936 ; Masawaki et al., 1996). Par ailleurs, l'alizarine ainsi que la pseudopurpurine constituent de véritables marqueurs de la croissance (Dixon et Hoyte, 1963 ; Norton, 1998).

L'alizarine a également été employée comme colorant alimentaire naturel, notamment au Japon. Sa couleur vire au violet après complexation avec les protéines présentes dans les aliments (Kawasaki et al., 1992 a).

Enfin, les anthraquinones de la garance possèdent des propriétés antibactériennes et antifongiques (Rath et al., 1995).

I.5.3. Activités mutagène et cancérigène de la garance

Du fait de ses emplois en phytothérapie et en agroalimentaire, la garance a fait l'objet de nombreuses études médicales qui ont mis en évidence ses propriétés mutagène et cancérigène (Yasui et Takeda, 1983 ; Poginsky et al., 1987 ; Westendorf et al., 1990 ; Kawasaki et al., 1992 b). Plus particulièrement, les dérivés les plus toxiques correspondent aux composés de type 1,3-dihydroxyanthraquinone possédant un groupement méthyle ou hydroxyméthyle en position 2 sur le cycle C du noyau anthraquinonique. Par conséquent, la lucidine (1,3-dihydroxy-2-hydroxyméthylantraquinone) ainsi que ses éthers méthyliques et éthyliques tout comme la rubiadine (1,3-dihydroxy-2-méthylantraquinone) sont des agents mutagènes.

Sous certaines conditions physiologiques, la lucidine est métabolisée par l'organisme en un composé disposant d'une fonction méthylénique exocyclique. Du fait de son importante réactivité, cet intermédiaire va pouvoir former des adduits avec les bases puriques adénine et guanine de l'ADN (Poginsky et al, 1991 ; Kawasaki et al., 1994) (**Figure 1.13**).

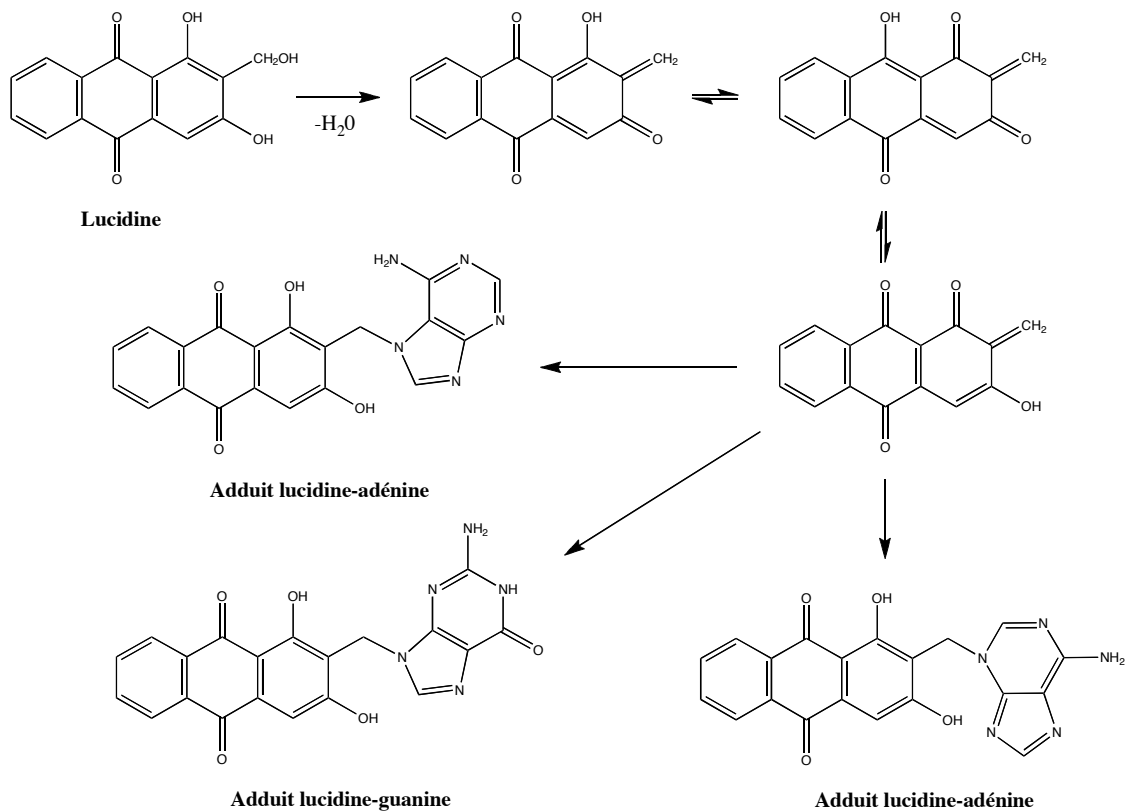


Figure 1.13. Formation et structures des adduits lucidine-bases nucléiques (Kawasaki et al., 1994).

L'emploi des colorants rouges issus de racines de garance, que ce soit en agroalimentaire ou pour la teinture de tissus, devra donc présenter une quantité de lucidine minimale afin d'éviter ces risques. Pour cela, différentes voies peuvent être approfondies :

- utiliser des garances dont la provenance présente peu ou pas de lucidine,
- mettre au point un protocole d'extraction limitant la libération de ce composé,
- oxyder la lucidine en nordamnacanthal (non mutagène et présent naturellement dans la plante) par voie enzymatique (oxydase) ou par voie chimique.

Chapitre II Résultats et discussion

Ce chapitre regroupe les résultats obtenus sur les colorants anthraquinoniques de la garance. Dans un premier temps une étude fondamentale a été réalisée sur la composition chimique de deux espèces de garance, *R. tinctorum* et *R. peregrina*, ainsi que sur celle d'une garance chimiquement modifiée appelée garancine. Ensuite, une optimisation des conditions d'extraction des colorants assistée par ultrasons a été effectuée en utilisant un modèle statistique. Ce procédé a été comparé à deux autres techniques d'extraction utilisées traditionnellement. Enfin, différents échantillons prélevés sur des objets anciens provenant du Palais du Roure ont été analysés par chromatographie et colorimétrie afin d'identifier les colorants historiquement employés.

II.1. ÉTUDE DES COLORANTS DE LA GARANCE

II.1.1. Les anthraquinones de la garance

La garance des teinturiers (*R. tinctorum*) possède des colorants rouges situés dans le parenchyme cortical de ses racines. Ces molécules correspondent à des dérivés anthraquinoniques de nature différente : elles peuvent être soit de nature aglycones soit glycosylées. Les principaux composés aglycones sont la lucidine, l'alizarine et la purpurine. Les molécules glycosylées sont composées d'une partie anthraquinonique (aglycone) et d'un primevérose (6-*O*- β -D-xylopyranosyl- β -D-glucose). Les composés glycosylés identifiés sont le primevéroside de lucidine, l'acide rubérythrique, la galiosine et le primevéroside de rubiadine. Ces molécules sont également les précurseurs des composés aglycones. En effet, lors de l'évolution de la maturité de la plante, ces précurseurs hétérosidiques subissent une hydrolyse enzymatique, correspondant à la rupture de la liaison entre le primevérose et l'anthraquinone, formant ainsi les aglycones. Le **tableau 1.1** regroupe les composés anthraquinoniques identifiés par CLHP selon leur ordre d'élution et décrit les maxima d'absorption de chacune de ces molécules. A noter que ces colorants sont séparés à l'aide d'une colonne chromatographique possédant une phase stationnaire C18 et sont donc élués par ordre de polarité décroissante.

Tableau 1.1. Données chromatographiques des anthraquinones de la garance.

Composé	Numéro de pic	Temps de rétention (min)	λ_{\max} (nm)
Prim. lucidine	A	5,4	203, 265, 406
Ac. rubérythrique	B	6,0	199, 261, 334, 418
Galiosine	C	10,1	201, 255, 288, 434
Prim. rubiadine	D	12,3	203, 269, 412
Anthragallol	E	18,0	208, 245, 283, 414
Lucidine	F	18,6	203, 245, 280, 414
Alizarine	G	19,8	199, 248, 428
Xanthopurpurine	H	21,6	200, 245, 281, 416
Purpurine	I	22,7	203, 256, 294, 481
Rubiadine	J	26,9	203, 244, 278, 410

II.1.2. Structures chimiques et propriétés spectroscopiques

Les composés anthraquinoniques de la garance montrent un maximum d'absorption dans le domaine du visible à une longueur d'onde supérieure à 400 nm, mais la présence de substituant volumineux sur ces molécules, comme les primevéroses dans le cas des précurseurs glycosylés, peuvent perturber le déplacement électronique et modifier ainsi cette valeur. Le maximum d'absorption des composés glycosylés est en général plus faible que celui de leurs aglycones respectifs. Par exemple, l'acide rubérythrique (primevéroside d'alizarine) présente un maximum à 418 nm alors que celui de l'alizarine est à 428 nm. Cet effet hypsochrome a donc un impact direct sur la couleur de chaque constituant. Par contre, cet effet n'est pas observé entre le primevéroside de rubiadine et la rubiadine. Pour expliquer cette différence de longueur d'onde maximale d'absorption entre le composé glycosylé et son aglycone, nous allons observer l'impact des liaisons hydrogène intramoléculaires et plus précisément la perturbation de ces dernières due à un groupement glycosyle. Ces liaisons hydrogène présentes sur les anthraquinones de la garance ont déjà été étudiées, en particulier pour ce qui concerne leur influence sur l'ordre d'élution en chromatographie (Hovaneissian et al., 2007). Nous présentons ici un autre aspect, avec l'impact de ces liaisons hydrogène sur les propriétés spectroscopique UV/Visible des différentes molécules. La **figure 1.14** montre les structures moléculaires des principales anthraquinones aglycones présentes dans la garance. La présence d'un primevérose en position 3 sur la lucidine et en position 2 pour l'alizarine pour former respectivement le primevéroside de lucidine et l'acide rubérythrique va

incontestablement perturber, voire inhiber ces liaisons hydrogène, car ces deux positions sont en ortho de fonction(s) hydroxyle(s). En revanche, la présence d'un primevérose en position 3 sur la rubiadine, constituant le primevéroside de rubiadine, ne perturbe aucune liaison intramoléculaire. C'est la raison pour laquelle aucun effet hypsochrome n'est observé pour cette molécule.

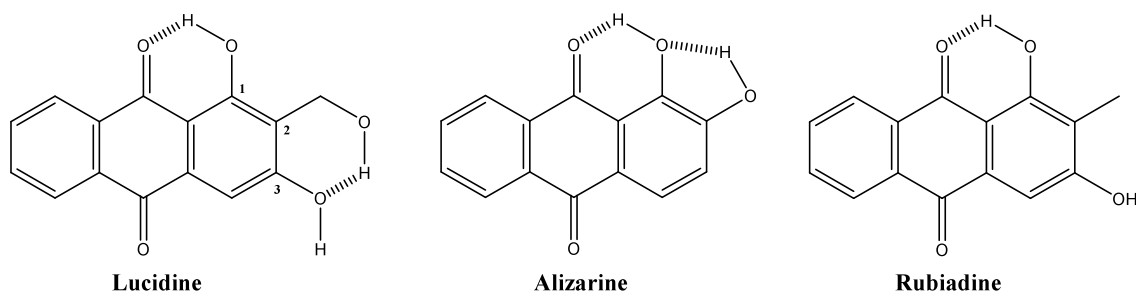


Figure 1.14. Structure chimique de composés aglycones.

II.1.3. Comparaison de diverses espèces de garance ; cas de la garancine

Deux espèces de garance, *R. tinctorum* (Okhra, Roussillon, France) et *R. peregrina* (récoltée dans la région de Toulon), ont été analysées par chromatographie liquide. La composition chimique de la garancine, préparée au laboratoire à partir du précédent échantillon de *R. tinctorum*, a également été étudiée dans les mêmes conditions analytiques. Cette dernière a été obtenue par hydrolyse acide des précurseurs anthraquinoniques glycosylés, en accord avec le protocole breveté par J.H. Fabre (Fabre, 1860). La modification de la garance par hydrolyse des précurseurs glycosylés pour former la garancine était très utilisée à l'époque. Elle se traduit par l'absence totale de ces précurseurs au profit des composés aglycones. En effectuant cette hydrolyse acide, il reproduisait l'hydrolyse enzymatique de la plante.

Les principales molécules présentes dans les racines de *R. tinctorum* (**Figure 1.15a**) sont des précurseurs glycosylés comme le primevéroside de lucidine (**A**), l'acide rubérythrique (**B**), la galiosine (**C**) et le primevéroside de rubiadine (**D**). Cet extrait contient

également des composés aglycones en plus faibles quantités : la lucidine (**F**), l'alizarine (**G**) et la purpurine (**I**) ont été identifiées.

L'échantillon de *R. peregrina* (**Figure 1.15b**) contient aussi des composés glycosylés en grandes proportions comme le primevéroside de lucidine (**A**), la galiosine (**C**), le primevéroside de rubiadine (**D**) et un composé aglycone, la lucidine (**F**). En accord avec la littérature (Wouters, 2001), on peut noter dans cette espèce l'absence totale du noyau alizarine, que ce soit le précurseur glycosylés (acide rubérythrique) ou l'aglycone (alizarine). Si on compare les deux espèces présentes dans le bassin méditerranéen (*R. tinctorum* et *R. peregrina*), le noyau alizarine est bien le biomarqueur chimique de l'espèce *R. tinctorum*. Enfin, l'importante proportion de composés glycosylés présents dans les deux espèces, 80% pour *R. tinctorum* et 77% pour *R. peregrina*, démontre la jeunesse des plants.

Le chromatogramme de l'échantillon de garancine (**Figure 1.15c**) montre la seule présence de composés aglycones : la lucidine (**F**), l'alizarine (**G**), la purpurine (**I**) et la rubiadine (**J**). Tout d'abord, en comparaison avec l'espèce *R. tinctorum*, on peut noter la disparition des précurseurs glycosylés au profit de l'augmentation de l'aire des pics des aglycones. On peut également remarquer qu'aucun nouvel aglycone n'est apparu et qu'initialement, *R. tinctorum* contient à la fois les formes aglycones et hétérosidiques des mêmes composés. Le but de la fabrication de la garancine permet donc de concentrer la coloration de l'extrait c'est-à-dire d'augmenter la proportion des composés aglycones (de couleur rouge), comme l'alizarine et la purpurine, au détriment des précurseurs glycosylés (de couleur jaune). L'hydrolyse des ces composés peut être plus ou moins poussée afin d'obtenir différentes couleurs de garancine.

Ces observations seront utilisées lors de l'analyse des échantillons anciens prélevés au Palais du Roure et au Museon Arlaten.

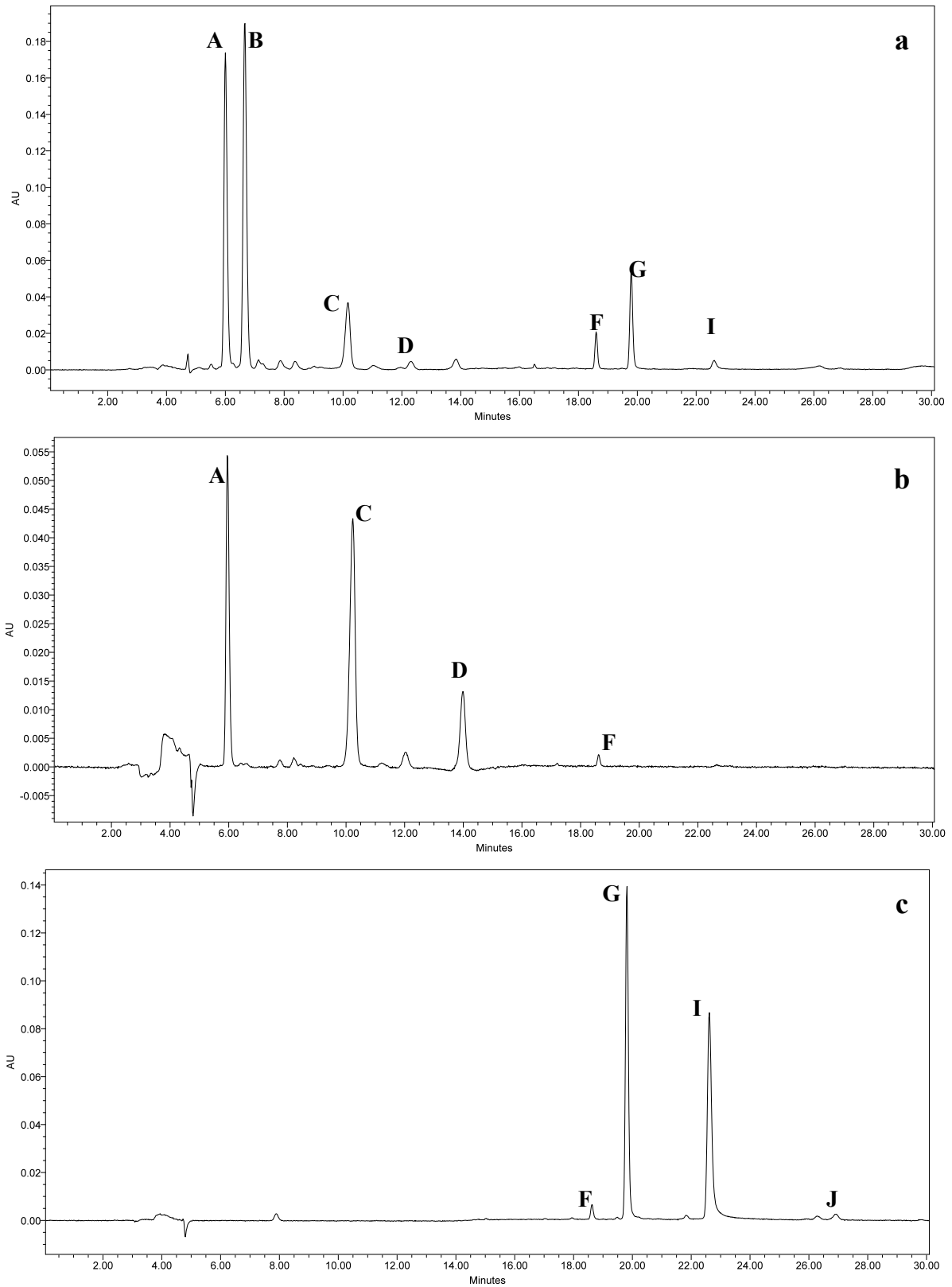


Figure 1.15. Chromatogramme à 450 nm des extraits de *R. tinctorum* (a), *R. peregrina* (b) et de garancine (c).

II.2. EXTRACTION DES COLORANTS PAR ULTRASONS

Une étude sur l'extraction des colorants anthraquinoniques présents dans les racines de la garance des teinturiers a été réalisée en utilisant les ultrasons. Ce travail a pour but l'élaboration d'un procédé d'extraction simple, rapide et efficace pouvant être employé à fin analytique et industrielle. Un plan Box-Wilson, plus communément appelé plan composite centré, a été réalisé afin de définir un modèle mathématique permettant l'optimisation des conditions d'extraction. L'extraction assistée par ultrasons utilisant les conditions optimales a été comparée, en matière de rendement et de composition chimique, à la méthode traditionnelle, par chauffage au reflux (Derksen et al., 2002 ; Boldizsár et al. 2006), ainsi qu'à une méthode employant l'agitation magnétique. Enfin, les racines de garance ont été étudiées d'un point de vue cytohistologique, afin d'examiner les effets des différents procédés d'extraction.

II.2.1. Optimisation des conditions d'extraction

II.2.1.1. Études préliminaires

II.2.1.1.1 Mesure de la puissance des ultrasons

Dans la littérature sur les ultrasons, la puissance du matériel est mentionnée mais pas la puissance absorbée (P_{abs}) dans le solvant d'extraction. La méthode la plus employée pour mesurer P_{abs} est l'utilisation de l'équation suivante :

$$P_{abs} = \frac{dT}{dt} \sum m_i C_{p_i}$$

où m_i et C_{p_i} sont respectivement la masse ainsi que la capacité calorifique du solvant, et dT/dt correspond la pente du graphe représentant la température du solvant d'extraction en fonction du temps d'exposition aux ultrasons (**Figure 1.16**). Cette équation est basée sur l'utilisation de la calorimétrie et suppose que toute la puissance entrant dans le mélange d'extraction est absorbée sous forme de chaleur.

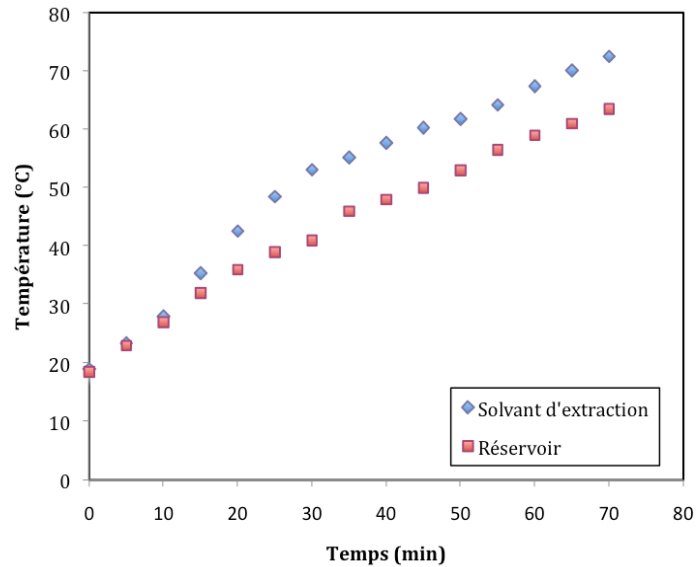


Figure 1.16. Détermination de la puissance absorbée dans le système par l'augmentation de la température dans le solvant d'extraction.

La puissance absorbée a été calculée pour l'appareil à ultrasons PEX 3. Elle est de 42 W, considérant que la puissance maximale des ultrasons mentionnée par le fabricant est de 150 W.

II.2.1.1.2 Détermination des paramètres d'extraction

Une étude préliminaire mettant en jeu différentes expériences a été réalisée afin de déterminer le rôle des paramètres expérimentaux influençant l'extraction des colorants rouges de la garance par ultrasons. Les principaux facteurs sont la granulométrie des fragments de racines de garance, le temps d'extraction, la température et la composition du solvant.

La granulométrie des morceaux de racines de garance, après broyage, est un paramètre important pour l'extraction par ultrasons, car l'efficacité de l'extraction dépend de la taille de la matrice utilisée. Plus la taille de la matrice augmente, plus la surface de contact diminue par rapport à la masse. Au contraire, plus la taille de la matrice diminue, plus elle se localise à la surface du solvant durant l'extraction. Il est donc nécessaire, pour réaliser la meilleure extraction, de déterminer la taille idéale de la matrice afin d'utiliser de manière optimale l'effet des ultrasons. Dans le but d'optimiser ce paramètre, une étude a été réalisée en extrayant les colorants de six tailles différentes de racine de garance, avec l'appareil à ultrasons PEX 3, dans les mêmes conditions expérimentales déterminées arbitrairement (15 min, 25°C et 80:20 MeOH-H₂O). Le rendement en colorant, pour chaque taille, a été

déterminé. Après broyage, les fragments de racines de garances ont été séparés en fonction de leur granulométrie. Différents tamis ont été utilisés correspondant aux ouvertures de mailles 0,125-0,25-0,5-0,8-1 et 1,25 mm. Les résultats obtenus montrent que le meilleur rendement correspond à l'ouverture de maille de 0,5 mm (**Figure 1.17**). Cette taille de racine a donc été utilisée tout au long de l'étude.

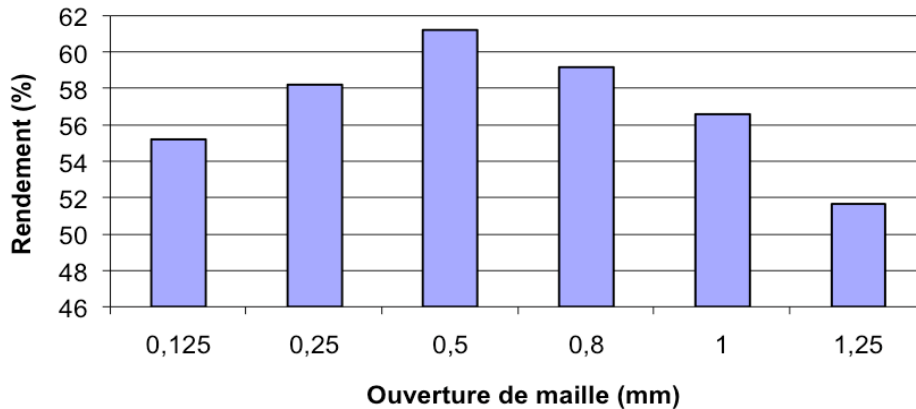


Figure 1.17. Effet de la taille des racines de garance sur le rendement d'extraction. Les valeurs en abscisse (X) représentent les différentes tailles de racines de garance et les valeurs en ordonnée (Y) expriment le rendement en colorant obtenu.

L'extraction des colorants de la garance a été effectuée dans un mélange méthanol-eau correspondant aux solvants de référence pour l'extraction de substances naturelles polaires (Cristea et al., 2003 ; Xiao et al., 2008). De plus, des tests d'extraction utilisant le mélange éthanol-eau ont été réalisés mais ils se sont révélés de moindre efficacité. La proportion du mélange méthanol-eau doit être optimisée pour obtenir les meilleurs rendements d'extraction et contenant la plus grande population de composés. La température est également un paramètre important lors de l'extraction des colorants de la garance. En effet, la grande sensibilité de ces colorants, notamment des composés glycosylés, ne permet pas de réaliser une extraction à haute température. De plus, il est important de noter que l'augmentation de la température atténue l'effet des ultrasons. Une température élevée abaisse la viscosité ainsi que la tension superficielle du solvant, paramètres indispensables à la formation des bulles de cavitation (Mason, 1989). Toutes les expériences ont donc été réalisées à des températures modérées ($10^{\circ}\text{C} \leq T \leq 50^{\circ}\text{C}$). Enfin, le temps d'extraction doit être optimisé afin d'obtenir de meilleurs rendements sans affecter la structure chimique des colorants. Le protocole d'extraction par reflux habituellement employé est de 60 min (Derksen et al., 2002 ; Boldizsár et al. 2006), nous allons essayer de le réduire en utilisant un appareil à ultrasons.

II.2.1.2. Résultats du plan d'expérience

Une procédure expérimentale Box-Wilson (Box et Wilson, 1951) ou Plan Composite Centré (PCC), comprenant trois paramètres et cinq niveaux différents d'expérience, a été mise en place pour étudier la performance des ultrasons sur l'extraction des colorants de la garance et pour identifier les interactions entre les différentes variables. Cette étude multivariable, présentant 20 expériences (cf. Partie Exp., 2.2.5.), permet de réduire considérablement le nombre d'expériences en comparaison avec une méthode d'optimisation traditionnelle qui, pour trois facteurs testés à cinq niveaux différents, en comprendrait 5^3 (=125).

L'étude préliminaire nous a donc permis de déterminer trois facteurs influençant l'extraction des colorants et ont été introduits dans le plan composite centré. Ainsi, le temps d'extraction (minutes), la température (°C) et le solvant d'extraction (% de méthanol) ont été étudiés. Les paramètres des 20 expériences réalisées dans le cadre du plan expérimental ainsi que les rendements obtenus pour chaque expérience sont représentés dans le **tableau 1.2**. Les expériences ont été menées de façon aléatoire afin d'éviter toute influence de l'expérimentateur sur les rendements.

Tableau 1.2. Valeurs réelles du PCC et leur rendement en colorant correspondant.

No	Temps (min)	Température (°C)	Solvant (% MeOH)	Rendement (%)
1	25	42	80	56,3
2	10	18	80	57,8
3	18	30	0	58,4
4	10	42	80	58,4
5	18	10	50	57,4
6	25	18	20	61,6
7	10	18	20	58,9
8	25	18	80	64,0
9	18	30	50	62,4
10	25	42	20	59,6
11	18	50	50	59,7
12	18	30	50	60,1
13	5	30	50	58,1
14	10	42	20	58,3
15	18	30	50	60,9
16	18	30	50	60,1
17	18	30	100	38,1
18	18	30	50	60,0
19	30	30	50	58,0
20	18	30	50	60,6

Les réponses sont exprimées en pourcentage de colorants extraits, correspondant à la masse de l'extrait sec rapporté à la masse des racines sèches. Il peut être observé une variation des réponses en fonction des paramètres impliqués dans l'expérience. Les rendements des 20 expériences apparaissent entre 56,3% et 64,0%, sauf pour l'expérience n° 17 (38,1%).

L'analyse de la variance a été réalisée sur les résultats obtenus (**Tableau 1.3**). Cette analyse permet de tester la pertinence des variables impliquées dans le plan expérimental et de représenter graphiquement l'importance de chaque paramètre sur la réponse obtenue (rendement en colorants extraits). Le principe de l'analyse consiste à comparer la variance des expériences réalisées entre elles de manière à évaluer si elles diffèrent ou non de la moyenne. Il faut alors comparer la variance de diverses répétitions d'un échantillon à la variance des moyennes entre tous les échantillons (García-Ayuso et al., 1999 ; Lazic, 2004). Le rapport entre ces deux variances est appelé "ratio-*F*". Ainsi, la pertinence statistique de chaque facteur est déterminée et peut être représentée dans le **tableau 1.3**.

La valeur "ratio-*F*" dépend du nombre de degrés de liberté (Ddl) impliqués dans le modèle et représentée dans la colonne valeur-*P* à un niveau de confiance de 95% par référence à une table statistique. De ce fait, les effets inférieurs à 0,05 dans cette colonne sont considérés comme significatifs. Seul l'effet quadratique du facteur solvant d'extraction (CC), représentant le double effet du facteur solvant d'extraction, est ici jugé comme étant significatif, mais son effet simple (C), dont la valeur se rapproche de la limite (0,0589), peut être également considéré comme influençant l'extraction des colorants.

Tableau 1.3. Résumé de l'analyse de la variance du modèle statistique.

Effet	Somme des carrés	Ddl	Carrés moyens	Ratio- <i>F</i>	Valeur- <i>P</i>
A: temps	4,607	1	4,607	0,22	0,6491
B: température	2,490	1	2,490	0,12	0,7373
C: solvant	95,110	1	95,110	4,54	0,0589
AA	0,078	1	0,078	0,00	0,9526
AB	11,761	1	11,761	0,56	0,4708
AC	0,001	1	0,001	0,00	0,9940
BB	0,903	1	0,903	0,04	0,8397
BC	2,531	1	2,531	0,12	0,7353
CC	165,744	1	165,744	7,92	0,0184
Erreur totale	209,372	10	20,937		
Total	498,505	19			

Suite à cette étude statistique, un diagramme de Pareto (**Figure 1.18**) représentant les différents effets de manière standardisée, a pu être dressé afin de mettre en évidence les effets les plus significatifs par ordre d'importance pour chaque variable (effets linéaires, interactions entre facteurs et effets quadratiques). La barre transversale représente l'amplitude minimale à partir de laquelle les effets seront considérés comme étant statistiquement significatifs pour la réponse étudiée, considérant un niveau de confiance de 95%. Il peut être remarqué sur ce diagramme que l'effet quadratique du solvant d'extraction (CC) est la variable présentant l'influence la plus importante. Comme décrit précédemment, son effet linéaire (C) présente également une influence importante. Le solvant d'extraction est bien le facteur qui influence le plus l'extraction quantitative des colorants de la garance.

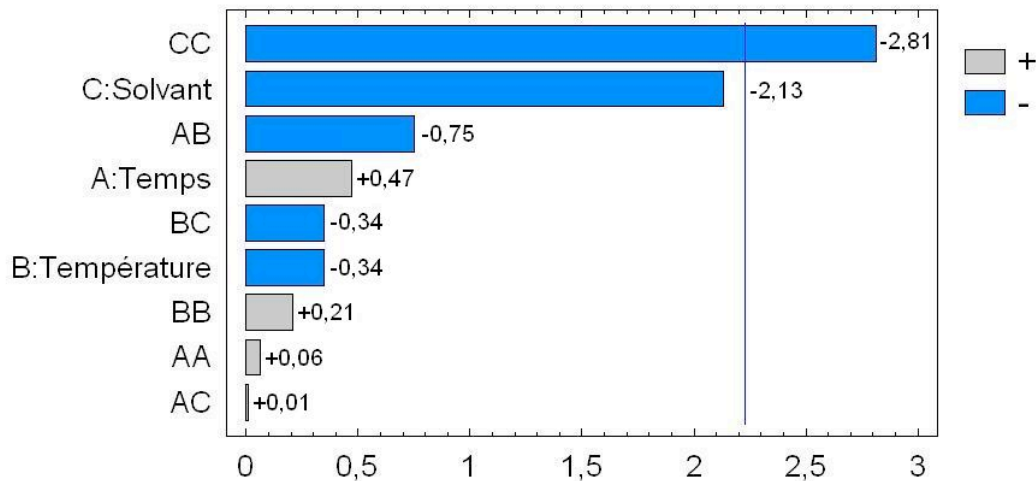


Figure 1.18. Diagramme de Pareto.

Les autres effets constatés, comme le temps d'extraction (A), la température (B) et leurs effets quadratiques (AA et BB), ont une importance beaucoup moins significative sur l'extraction quantitative. On peut également noter le manque d'influence des effets des produits croisés (AB, BC et AC) suggérant la faible influence des interactions entre les variables dans le domaine expérimental étudié.

L'extraction quantitative des colorants rouges de la garance assistée par ultrasons (rendement en colorants) peut être représentée sous la forme d'une équation polynomiale du second degré dont les coefficients exprimés sont directement corrélés aux effets standardisés

caractérisés lors de l'examen du diagramme de Pareto (**Figure 1.18**). L'équation impliquant les trois paramètres étudiés est représentée ci-dessous :

$$\text{Rendement en colorant (\%)} = 60,530 + 0,581t - 0,427T - 2,639S - 1,213tT + 0,012tS - 0,562TS + 0,073t^2 + 0,250T^2 - 3,391S^2$$

où t représente le temps d'extraction (min), T la température (°C) et S le solvant d'extraction (%MeOH).

Cette équation nous permet de représenter l'extraction des colorants rouges de la garance assistée par ultrasons sous la forme de surfaces de réponses en trois dimensions (**Figure 1.19**). Ces surfaces sont des représentations graphiques qui nous aident à visualiser l'évolution de la variable réponse étudiée en fonction des paramètres de deux facteurs, lorsque le troisième est fixé à son niveau central. Il nous est alors possible de mettre en évidence la (ou les) relation(s) existante(s) entre rendement et variables expérimentales impliquées dans le modèle.

La **figure 1.19a** décrit les surfaces de réponses des effets combinés du temps d'extraction et de la température sur le rendement en colorant, où le solvant d'extraction est fixé à son niveau central (50% MeOH). La surface de réponse montre une augmentation du rendement quand le temps d'extraction passe de son niveau -1 à +1 et que la température est placée à son niveau -1. Le phénomène inverse est observé quand la température est à son niveau +1. Le rendement augmente également quand la température varie de son niveau -1 à +1 et que le temps d'extraction est placé à son niveau -1. Comme précédemment, le phénomène inverse est observé quand le temps est à son niveau +1. Cette surface de réponse décrit des valeurs correspondant au maximum et au minimum respectivement de 63,2% et 59,6%. La faible variation du rendement (3,6%) confirme les résultats de l'analyse de la charte de Pareto montrant que le temps d'extraction ainsi que la température influencent peu l'extraction quantitative des colorants rouge de la garance.

La **figure 1.19b** décrit les surfaces de réponses des effets combinés du temps d'extraction et du solvant sur le rendement en colorant, où la température est fixée à son niveau central (30°C). La **figure 1.19c** traduit quant à elle les surfaces de réponses des effets combinés de la température et du solvant, où le temps d'extraction est fixé à son niveau central (18 min). La réponse reste stable pour les paramètres temps d'extraction et température, passant de leur niveau -1 à +1, quand ils sont associés au solvant d'extraction. Par contre, le rendement présente une allure parabolique dont le maximum est atteint lorsque

le solvant passe de son niveau -1 à +1. Cette forme peut être expliquée par l'effet quadratique du paramètre solvant d'extraction qui représente l'effet influant l'extraction quantitative dans la charte de Pareto (**Figure 1.18**). Les figures **1.19b** et **1.19c** montrent respectivement des variations de rendement de 8,2% et de 9% confirmant que le solvant est le paramètre qui influence le plus l'extraction quantitative des colorants de la garance assistée par ultrasons.

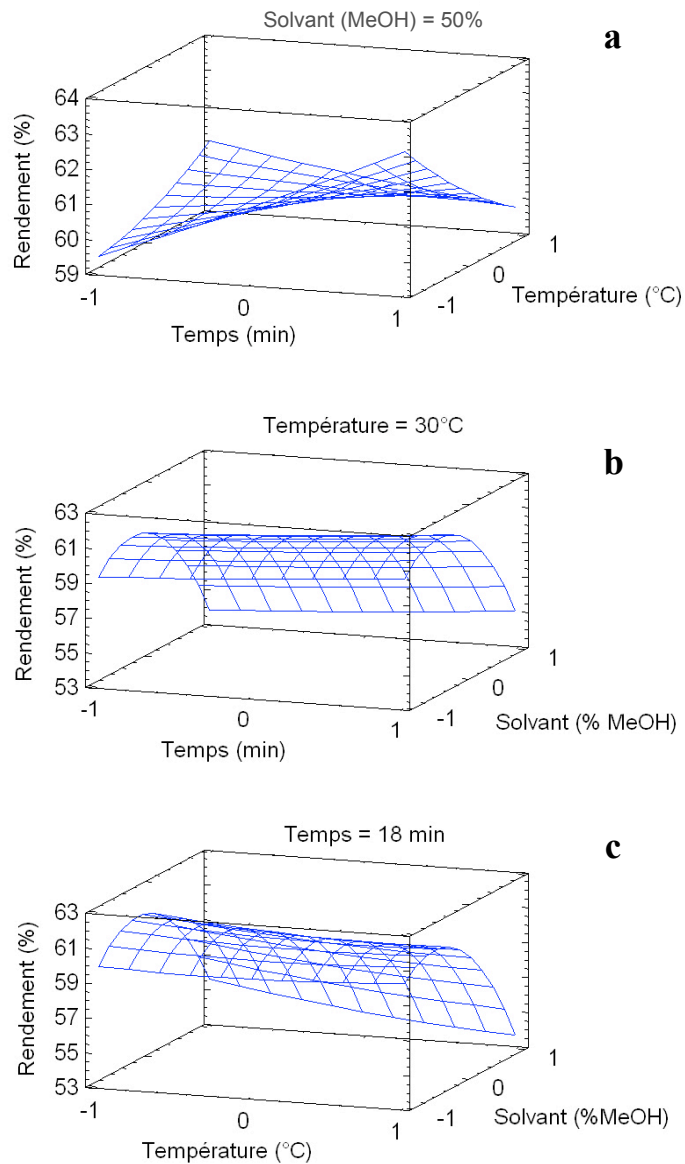


Figure 1.19. Surfaces de réponses obtenues à partir du PCC du temps et de la température (a), du temps et du solvant (b), de la température et du solvant (c) obtenus pour le rendement en colorant.

II.2.1.3. Conditions optimales

L'équation polynomiale du second degré est également utilisée pour définir des conditions optimales d'extraction. L'équation mathématique a été dérivée pour chaque variable étudiée donnant des équations du premier degré. La procédure implique d'égaliser les dérivés à 0 et de résoudre l'équation pour donner des conditions optimales en valeurs codées. Ces valeurs sont alors décodées, à partir du plan d'expérience, en valeurs réelles afin d'être appliquées à l'extraction des colorants assistée par ultrasons. Les valeurs optimales des paramètres affectant l'extraction quantitative par ultrasons ont été calculées et sont de 18 min pour le temps d'extraction, 36°C pour la température, 37% de méthanol pour le solvant d'extraction et 0,5 mm d'ouverture de maille, avec un rendement de 64,3%.

II.2.1.4. Composition chimique

Pendant le procédé d'extraction, une haute température pourrait accélérer l'hydrolyse enzymatique de ces précurseurs ou causer la dégradation de certains composés comme la galiosine. En effet, la présence de purpurine peut être expliquée par un double procédé de dégradation de la galiosine *via* une hydrolyse enzymatique donnant la pseudopurpurine qui subit à son tour une décarboxylation. La température d'extraction est un facteur important pour conserver la composition chimique initialement présente dans la plante et responsable de la richesse de la couleur.

Chacun des 20 extraits de colorants de garance obtenus à partir du plan composite centré (PCC) a été analysé par CLHP/UV-Visible (**Tableau 1.4**) et les résultats ont été comparés. Les composés extraits à partir des racines de garance ont été identifiés à l'aide des temps de rétention et des spectres UV-Visible des molécules de références injectées dans les mêmes conditions. Les principaux colorants anthraquinoniques identifiés sont par ordre d'élution : le primevéroside de lucidine, l'acide rubérythrique, la galiosine, le primevéroside de rubiadine, la lucidine, l'alizarine, la purpurine et la rubiadine. La xanthopurpurine n'est pas systématiquement détectée dans les différents extraits. Le composé élué à 25,8 min est inconnu mais pourrait correspondre à un composé aglycone étant donné la valeur de son temps de rétention.

Tableau 1.4. Proportion relative en anthraquinones dans les extraits de garance.

Conditions d'extraction ^a	Exp. n°	Pourcentage relatif (%)								
		prim. lucidine	ac. rubérythrique	galiosine	prim. rubiadine	lucidine	alizarine	purpurine	inconnu	rubiadine
25-42-80	1	35,4	40,1	10,8	1,8	2,8	7,1	0,8	1,0	0,2
10-18-80	2	36,1	40,7	11,8	1,8	0,9	5,6	0,7	2,2	0,1
18-30-0	3	29,9	37,1	0,8	1,4	2,9	13,5	0,8	12,4	1,1
10-42-80	4	34,4	38,3	13,6	1,7	2,9	7,0	1,0	0,8	0,2
18-10-50	5	38,9	43,1	4,2	1,8	1,1	7,7	0,9	2,3	0,0
25-18-20	6	33,4	39,6	2,7	2,0	0,7	10,8	0,6	9,8	0,4
10-18-20	7	38,4	44,6	1,1	1,8	0,5	6,9	0,7	5,6	0,4
25-18-80	8	36,7	41,4	11,4	1,6	2,3	5,7	0,5	0,2	0,2
18-30-50	9	39,4	44,2	1,6	1,9	0,4	7,8	0,8	3,4	0,5
25-42-20	10	25,2	27,4	2,2	2,7	4,8	24,6	0,6	11,6	0,8
18-50-50	11	37,3	40,8	1,0	1,6	0,7	8,2	0,7	8,7	1,1
18-30-50	12	39,9	44,9	1,6	2,0	0,4	7,7	0,7	2,6	0,3
5-30-50	13	37,5	42,3	10,3	1,6	1,4	5,5	0,5	0,8	0,0
10-42-20	14	34,1	39,9	2,0	0,4	1,3	12,9	0,6	8,3	0,4
18-30-50	15	40,2	44,8	1,4	1,0	0,3	8,2	1,5	2,7	0,0
18-30-50	16	40,8	45,4	0,3	0,5	0,4	8,1	0,8	3,2	0,2
18-30-100	17	36,7	39,7	7,4	1,7	3,3	7,8	0,7	0,0	0,0
18-30-50	18	39,5	44,6	1,5	1,8	0,5	8,5	0,9	2,5	0,2
30-30-50	19	39,4	43,6	0,9	1,9	0,2	9,9	0,8	3,1	0,2
18-30-50	20	40,0	44,3	1,7	1,9	0,4	8,0	0,7	2,8	0,1
18-36-37 ^b		34,2	41,1	0,9	1,4	0,2	13,3	0,6	6,3	0,2

^a *t* (min) - *T* (°C) - *S* (% MeOH)^b Conditions optimales calculées pour l'extraction quantitative assistée par ultrasons

Les principaux composés présents dans ces racines de garance sont trois précurseurs hétérosidiques et un composé aglycone en plus petite proportion. Le primevéroside de lucidine, l'acide rubérythrique et la galiosine se présentent sous forme de pics intenses sur les chromatogrammes à 450 nm et ils représentent, en proportion relative, plus de 80% des colorants anthraquinoniques (respectivement 36,4%, 41,2% et 4,4% en moyenne sur les 20 expériences). L'alizarine est le principal composé aglycone extrait et sa proportion relative varie dans les différents extraits de garance entre 5,5% et 24,6%, dépendant directement des conditions d'extraction. Ce composé est le plus connu des colorants de la garance et peut être également considéré comme un produit de dégradation (Burnett et Thomson, 1968). L'alizarine peut être soit présente initialement dans la racine de garance soit être le résultat

d'un procédé de dégradation de son précurseur glycosylé, l'acide rubérythrique, initié lors de l'étape d'extraction.

Il est difficile d'interpréter l'origine et la proportion relative des molécules aglycones. Dans le but de déterminer les raisons des variations des colorants anthraquinoniques de la garance, les aires de pic de tous les composés ont été placées, comme réponses, dans le plan expérimental. Le **tableau 1.5** permet de définir les paramètres influençant l'extraction des composés anthraquinoniques. Le temps d'extraction (A) et la température (B) influencent l'extraction des composés aglycones (coefficients positifs) et au contraire ne favorisent pas l'extraction des précurseurs hétérosidiques (coefficients négatifs). Plus le temps et la température augmentent durant l'extraction, et plus la dénaturation des précurseurs est importante. Le solvant d'extraction (C) est également un paramètre influençant l'extraction des composés. En effet, on note que le solvant, ici le méthanol, avantage l'extraction des précurseurs hétérosidiques, et inversement il défavorise l'extraction des aglycones. Par analogie, on peut donc noter que l'eau aide à l'extraction des composés aglycones. Théoriquement, l'eau qui est le solvant le plus polaire devrait extraire principalement les composés les plus polaires, donc les précurseurs hétérosidiques. Les résultats du **tableau 1.5** montrant le contraire supposent que l'eau accélère l'activité enzymatique et favorise la formation des composés aglycones par hydrolyse des précurseurs.

Tableau 1.5. Effets des différents paramètres sur l'extraction de chaque composé.

Composés	A	B	C	AA	BB	CC	AB	AC	BC
<i>Précurseurs</i>									
prim. lucidine	-1,20	-2,40	+3,03	-1,86	-2,08	-5,23	-0,61	+2,68	+1,64
ac. rubérythrique	-1,54	-2,94	+1,61	-1,72	-2,31	-4,42	-1,00	+3,13	+2,07
galiosine	-1,67	-0,36	+4,80	+2,79	+1,33	+2,03	-0,48	-0,62	+0,10
prim. rubiadine	+1,57	-0,51	+0,28	+0,70	+0,57	+0,17	+1,70	-1,84	+0,56
<i>Aglycones</i>									
lucidine	+0,80	+1,81	+0,61	+0,82	+0,95	+3,88	+0,63	-0,84	-0,84
alizarine	+2,74	+2,77	-4,67	+0,24	+0,38	+1,97	+1,21	-2,39	-2,64
purpurine	+0,01	+0,18	+0,36	-1,46	-0,66	-0,92	+0,14	-0,43	+0,99
inconnu	+2,77	+4,23	-14,91	-1,07	+3,99	+5,00	+0,50	-3,48	-1,93
rubiadine	+0,99	+2,79	-3,74	-0,94	+1,71	+1,71	+0,47	-0,47	-0,47

La composition chimique en anthraquinones de l'extrait obtenu dans les conditions optimales a été également mise en évidence dans le **tableau 1.4**. Concernant les précurseurs hétérosidiques, cet extrait contient du primevéroside de lucidine (A) (34,2%) et de l'acide

rubérythrique (**B**) (41,1%) en grande quantité mais également, en proportion non négligeable, de l'alizarine (**G**) (13,3%) et du composé inconnu (6,3%) (**Figure 1.20**).

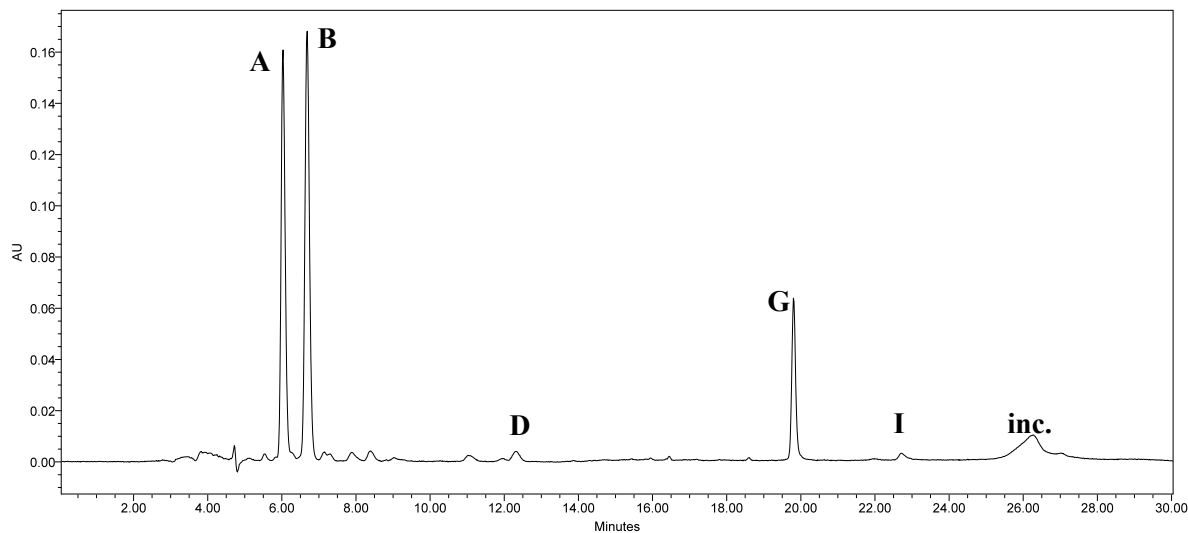


Figure 1.20. Chromatogramme à 450 nm des colorants extraits dans les conditions optimales.

Cette proportion en composés aglycones peut supposer une dégradation des précurseurs effectuée durant l'étape d'extraction. Dans ces circonstances, il est difficile d'effectuer une interprétation qualitative de la composition chimique des différents extraits. Il est donc nécessaire d'introduire un rapport afin de déterminer l'état de dégradation d'un extrait en fonction de sa proportion relative en colorant. Le rapport ($R_{\text{dég}}$) entre un des précurseurs hétérosidiques les plus importants, l'acide rubérythrique, et son aglycone correspondant, l'alizarine, a été établi. Plus le rapport est important, plus la proportion en précurseur hétérosidique est grande par rapport à son aglycone, ce qui implique que le composé est moins dégradé. Ce rapport a été calculé pour les vingt extraits réalisés par le plan expérimental ainsi que pour l'extrait obtenu dans les conditions optimales pour l'extraction quantitative (**tableau 1.6**).

Tableau 1.6. Rapport de dégradation ($R_{dég}$) pour chaque expérience.

Exp n°	Conditions d'extraction			$R_{dég}^a$
	Temps (min)	Température (°C)	Solvant (%MeOH)	
1	25	42	80	5,6
2	10	18	80	7,3
3	18	30	0	2,7
4	10	42	80	5,5
5	18	10	50	5,6
6	25	18	20	3,7
7	10	18	20	6,5
8	25	18	80	7,2
9	18	30	50	5,7
10	25	42	20	1,1
11	18	50	50	4,9
12	18	30	50	5,8
13	5	30	50	7,7
14	10	42	20	3,1
15	18	30	50	5,5
16	18	30	50	5,6
17	18	30	100	5,1
18	18	30	50	5,2
19	30	30	50	4,4
20	18	30	50	5,5
Optimale	18	36	37	3,1

^a $R_{dég} = (\% \text{ ac. rubérythrique})/(\% \text{ alizarine})$

En comparaison avec les vingt expériences réalisées dans le cadre du PCC, la valeur du rapport de dégradation ($R_{dég}$) pour l'expérience optimale est faible ce qui suppose une possible dégradation des colorants anthraquinoniques. Malgré cet état de dégradation, ces conditions vont être conservées pour l'extraction purement quantitative. En ce qui concerne l'extraction qualitative, nous avons choisi des conditions expérimentales présentes dans le PCC, possédant un fort rendement d'extraction qui est le meilleur compromis entre ces deux paramètres et bénéficiant d'un état de dégradation moindre. C'est le cas de l'expérience n° 8 (rendement en colorant de 64,0% et $R_{dég} = 7,2$). Par conséquent, les nouvelles conditions optimales pour l'extraction des colorants de la garance assistée par ultrasons qui seront utilisées sur le plan qualitatif sont : 25 min, 18°C et 80% MeOH.

II.2.2. Comparaison entre l'extraction par ultrasons et les méthodes traditionnelles

II.2.2.1. Rendement en colorant

Après l'optimisation des conditions pour l'extraction des colorants de la garance assistée par ultrasons, une étude comparative entre cette dernière et la méthode conventionnelle a été menée. Le procédé traditionnel pour l'extraction des colorants de la garance consiste en un reflux d'une heure et avec un mélange méthanol-eau (8:2, v/v) (Derksen et al., 2002 ; Boldizsár et al., 2006). D'autre part, un procédé d'extraction employant une simple agitation magnétique a été étudié, car il peut être considéré théoriquement comme le moins dénaturant d'un point de vue physique et a été comparé avec les deux autres méthodes. Le **tableau 1.7** montre les conditions d'extraction utilisées pour les trois protocoles testés. On peut ajouter que l'ouverture de maille, employée pour la taille des racines de garance est de 0,5 mm, optimisée dans l'étude préliminaire. Les rendements obtenus pour chaque procédé d'extraction ont été comparés (**Tableau 1.7**). Les méthodes par reflux et par agitation ont des rendements proches (respectivement de 60% et 58,7%), tandis que la méthode utilisant les ultrasons donne un rendement de 63,3%. La méthode par ultrasons produit un meilleur rendement avec un temps d'extraction réduit et une température basse. L'étude cytohistologique montrant l'effet sur les racines de garance des divers procédés employés permettra de mieux comprendre ces résultats.

Tableau 1.7. Comparaison du rendement pour les trois procédés d'extraction.

Procédé d'extraction	Conditions expérimentales			Rendement (%)
	Solvant (MeOH/H ₂ O)	Temps (min)	Température (°C)	
Reflux	80/20	60	75	60 ±1
Agitation	80/20	60	25	58,7 ±0,3
Ultrasons	80/20	25	18	63,3 ±0,5

II.2.2.2. Composition chimique

Après l'étude quantitative, la composition chimique en colorants obtenus a été comparée *via* les trois méthodes d'extraction. Ces extraits ont été analysés par CLHP/UV-Visible à la longueur d'onde caractéristique des anthraquinones $\lambda=450$ nm (**Figure 1.21**).

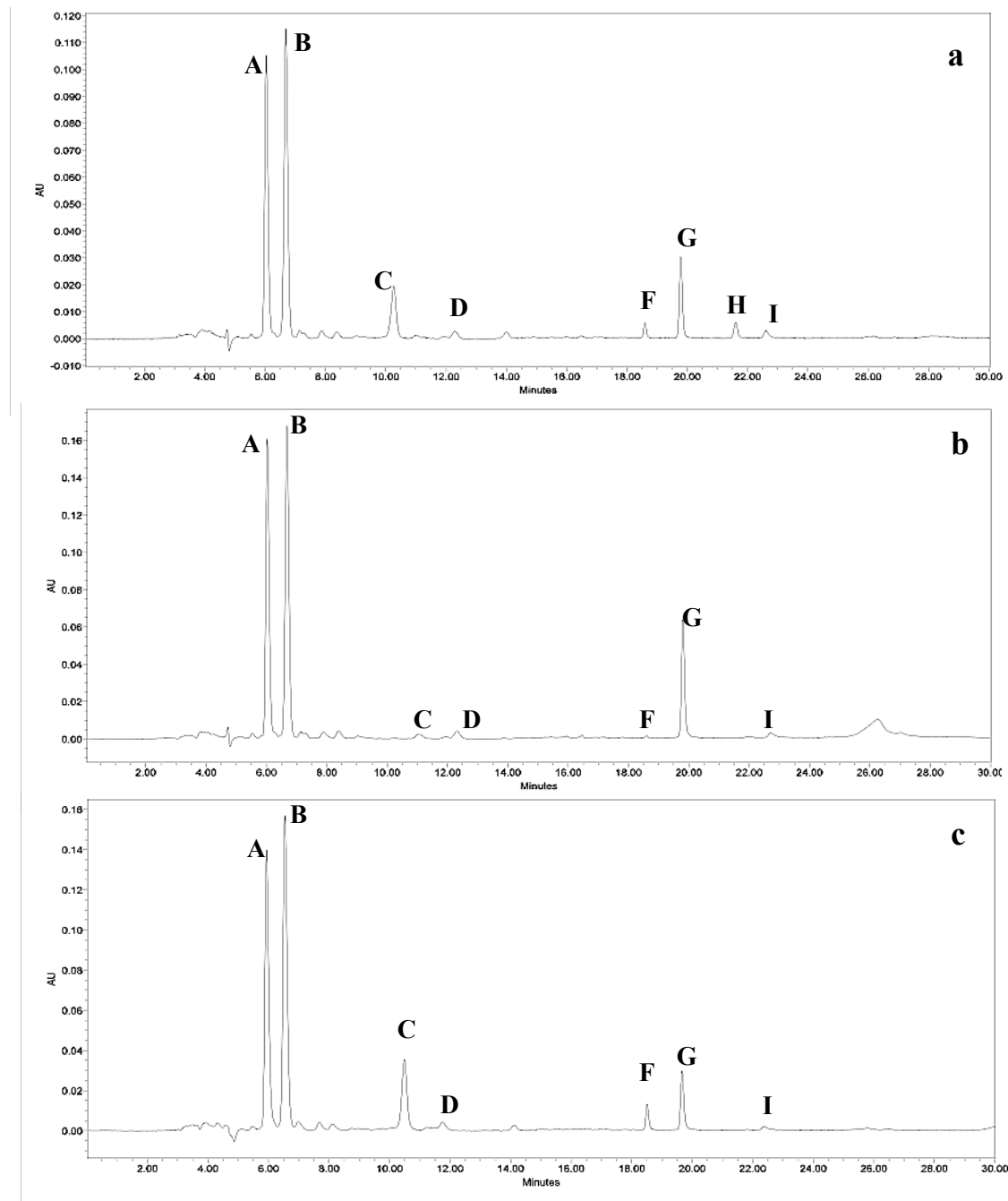


Figure 1.21. Chromatogramme à 450 nm des extraits de garance obtenus par les trois procédés d'extraction : reflux (a), agitation (b) et ultrasons (c).

La composition chimique des extraits obtenus par reflux (**Figure 1.21a**) et ultrasons (**Figure 1.21c**) présente un profil chromatographique similaire contrairement aux extraits obtenus par agitation (**Figure 1.21b**). Le **tableau 1.8** décrit la proportion relative en composés anthraquinoniques pour les extraits obtenus par les trois procédés d'extraction. Les composés glycosylés comme le primevéroside de lucidine (**A**), l'acide rubérythrique (**B**), la galiosine (**C**) et le primevéroside de rubiadine (**D**), ainsi que les aglycones comme la lucidine (**F**), l'alizarine (**G**), la purpurine (**I**) sont détectés. La galiosine (**C**) est particulièrement peu extraite par agitation ; quant au primevéroside de rubiadine (**D**) il est peu extrait par la méthode à reflux. En ce qui concerne les composés aglycones, la lucidine (**F**) est retrouvée en plus faible proportion après agitation. Enfin, la xanthopurpurine (**H**) est seulement présente dans l'extrait de garance obtenu par reflux.

Le rapport de dégradation ($R_{\text{dég}}$) a été calculé pour ces trois méthodes d'extraction. Les résultats sont 5,2 pour le reflux, 5,4 pour l'agitation et 7,3 pour les ultrasons. Les ultrasons peuvent être considérés comme le procédé d'extraction le moins dénaturant.

Tableau 1.8. Pourcentage relatif en anthraquinones pour les extraits de garance obtenus par les trois procédés d'extraction.

Composés	Procédés d'extraction		
	Reflux	Agitation	Ultrasons
Prim. lucidine (A)	34,6	38,3	35,9
Ac. rubérythrique (B)	40,1	45,7	41,6
Galiosine (C)	10,0	0,8	11,2
Prim. rubiadine (D)	tr. ^a	1,33	1,3
Lucidine (F)	1,6	0,4	2,2
Alizarine (G)	7,6	8,5	5,7
Xanthopurpurine (H)	1,8	tr.	tr.
Purpurine (I)	0,5	0,7	tr.
Rubiadine (J)	tr.	tr.	tr.
$R_{\text{dég}}$	5,2	5,4	7,3

^a Composé à l'état de traces

^b Composé non détecté

De plus, les analyses des trois différents procédés d'extraction ont été réalisées dans les mêmes conditions de concentration (20 g de racine dans 500 mL pour les ultrasons et 6 g de racine dans 150 mL pour les deux autres techniques). De ce fait, une comparaison quantitative de chaque composé a pu être effectuée. La **figure 1.22** représente l'aire des pics de chaque anthraquinone en fonction de la méthode d'extraction utilisée.

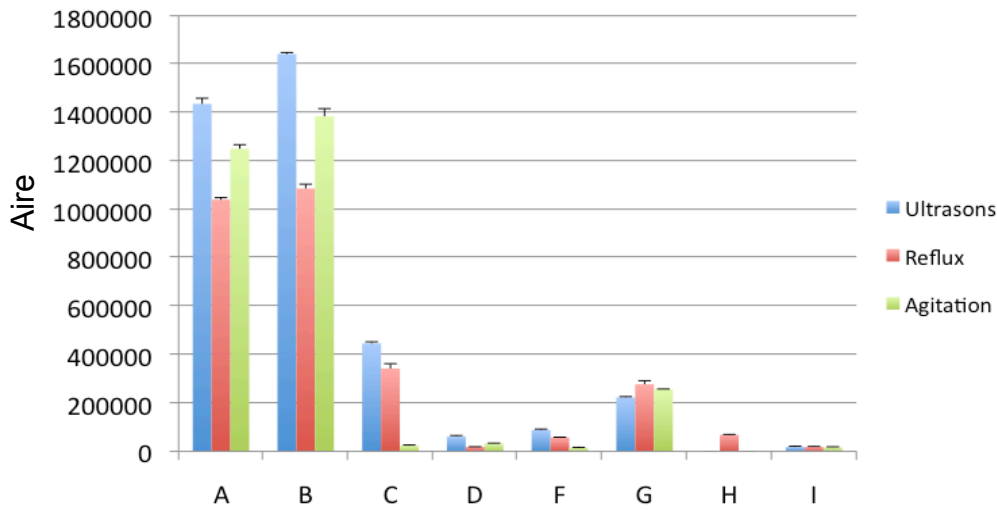


Figure 1.22. Comparaison de l'aire de pics des anthraquinones en fonction du procédé d'extraction.

En comparaison aux trois techniques d'extraction, la méthode par chauffage au reflux provoque une diminution de la quantité des précurseurs glycosylés au profit de l'augmentation des aires des aglycones correspondants, ce qui confirme son effet dénaturant. L'agitation magnétique permet une extraction des composés glycosylés de manière appréciable. Elle peut être considérée comme la méthode d'extraction la moins agressive d'un point de vue physique et reste, contrairement au chauffage par reflux, une méthode alternative pour l'extraction des colorants de la garance.

Enfin, le procédé par ultrasons extrait tous les composés dans des proportions satisfaisantes. En comparaison de la méthode par chauffage au reflux, les ultrasons permettent l'augmentation de la quantité des anthraquinones qu'elles soient glycosylées ou aglycones. Les ultrasons s'avèrent être la technique de choix pour l'extraction des anthraquinones de la garance ; ils donnent le meilleur rendement en colorant tout en préservant la composition chimique initialement présente dans la plante.

II.2.2.3. Étude cytohistologique

Cette étude cytohistologique des racines de garance a été réalisée en étroite collaboration avec le Pr. El Maâtaoui (INRA, UMR 406, Université d'Avignon).

L'observation des sections de tissus frais de *R. tinctorum* réalisées à main levée ont révélé une anatomie générale de type Dicotylédone. De l'extérieur vers l'intérieur on rencontre : une couche épidermique (E), un parenchyme cortical (PC), du phloème (P), du liber (L) (phloème secondaire) et du bois (B) (xylème secondaire) (**Figure 1.23**). Les colorants sont essentiellement concentrés au niveau des parois du parenchyme cortical ainsi que dans les éléments du liber et du phloème. Au niveau du parenchyme cortical, les cellules montrent des signes de dégénérescence qui se manifestent par le brunissement des parois et par l'aspect écrasé des parois cellulaires. Par conséquent, notre analyse cytohistologique sera recentrée sur la zone phloème (incluant le liber) des sections longitudinales.

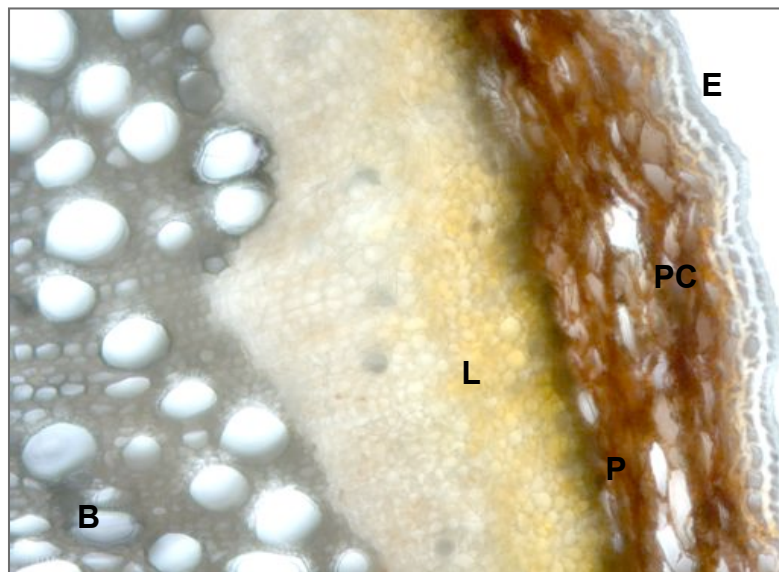


Figure 1.23. Sections longitudinales d'une racine fraîche de *R. tinctorum*.

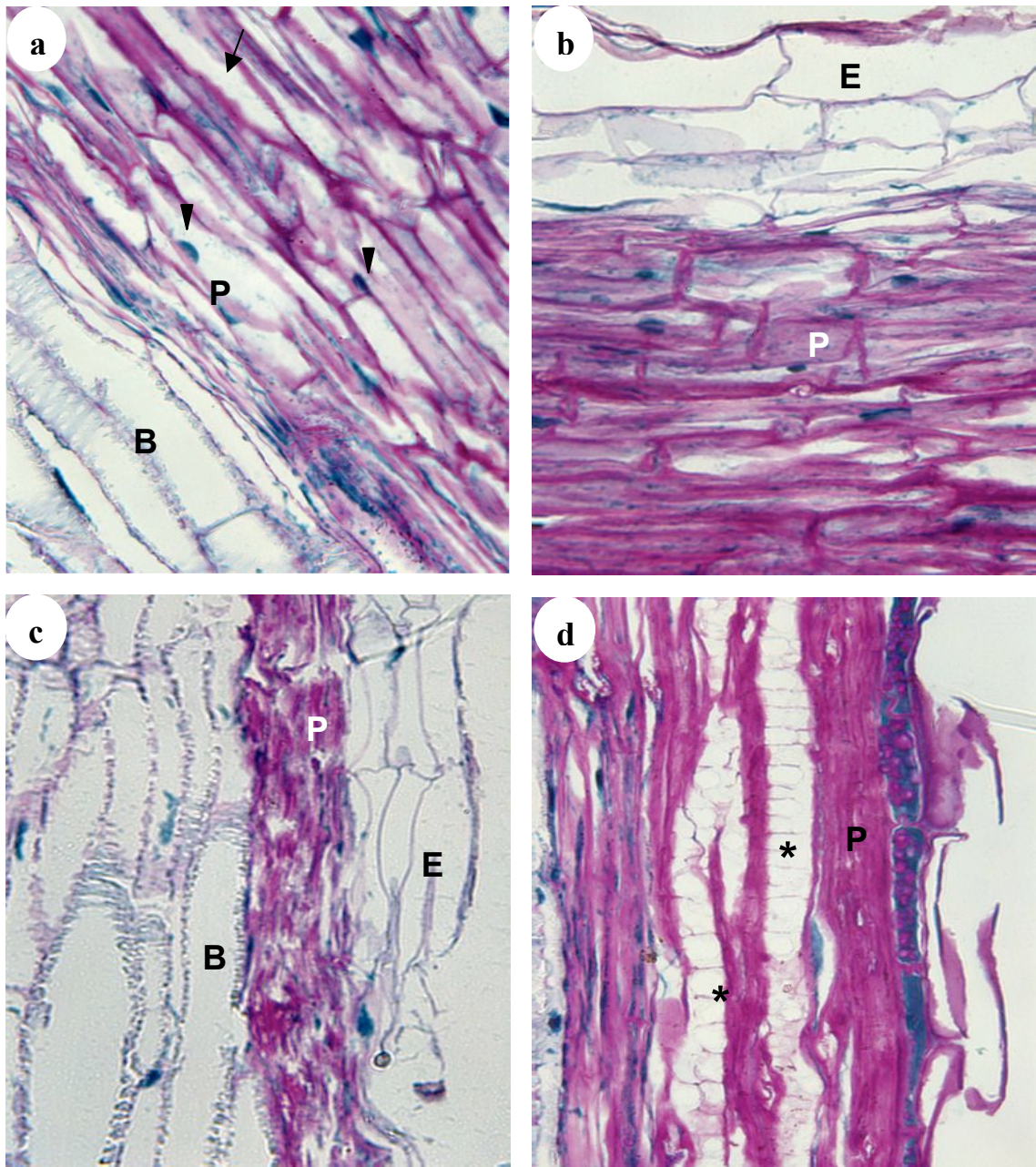
La majorité des fragments fixés et sectionnés avant les procédés d'extraction (contrôle) montrent une organisation histologique dans laquelle le xylème secondaire et le phloème dominant (**Figure 1.24a**). Cela indique que les échantillons de garance prélevés développent une croissance secondaire. Le phloème (P) montre des structures régulièrement disposées se composant de tubes criblés et de cellules parenchymateuses avec une grande

vacuole, des traces de cytoplasme (flèche) et des noyaux (tête de flèche) (**Figure 1.24a**). Les parois cellulaires apparaissent comme compactes donnant aux cellules du phloème une architecture normale. Aucun métabolite secondaire n'a été observé. Ceci est dû au fait que les solvants utilisés avant la réalisation des coupes ont précipité leur solubilisation.

Les observations microscopiques des fragments soumis à l'extraction révèlent que les trois méthodes induisent différents effets sur l'architecture générale du phloème et sur la structure de la paroi cellulaire. Après l'extraction par agitation, le phloème montre une structure similaire à celle de l'échantillon témoin. Cependant, on peut noter une légère diminution dans l'espace des vacuoles et un épaissement des parois cellulaires (**Figure 1.24b**). Cela est probablement dû à l'effet destructurant du milieu d'extraction sur les constituants appartenant à la paroi cellulaire (pectine, cellulose).

En revanche, les procédures d'extraction par reflux (**Figure 1.24c**) et par ultrasons (**Figure 1.24d**) provoquent de profondes altérations sur la structure du phloème. Dans les deux cas, le phloème montre des éléments fortement aplatis avec une diminution apparente du volume cellulaire et un contenu (cytoplasme, noyaux) plaqué contre les parois. Ces événements cytohistologiques sont plus marqués après l'extraction à l'aide d'ultrasons qui produit des effets particuliers sur la structure des parois. En effet, le phloème des fragments soumis à ce traitement montre clairement et à plusieurs endroits (**Figure 1.24d**) la présence de parois cellulaires amorphes décrivant des sortes de saignées (*) et typique de l'action des ultrasons. Ceci peut être dû à l'implosion des microbulles de cavitation qui sont formées durant la période de pression négative des ondes sonores (Vinatoru, 2001 ; Vilku et al., 2008). L'implosion peut se produire asymétriquement menant à la formation de micro-jets de solvant susceptibles de bombarder la surface des parois cellulaires, de ce fait menant à son érosion (Mason, 1989 ; Hagenson et Doraiswamy, 1998).

Au niveau de l'efficacité, l'extraction assistée par ultrasons induit des changements au niveau cellulaire dans le système étudié fournissant une explication plausible au rendement plus important de colorants extraits en comparaison avec les extractions par agitation et par reflux. Les dommages produits sur la paroi cellulaire sont susceptibles de faciliter la libération des colorants des cellules contenues dans le milieu. Des effets similaires des ultrasons ont été décrits en utilisant la microscopie électronique à balayage sur *Mentha piperita* (Shotipruk et al., 2001), sur *Elletaria cardamomun* (Lucchesi et al., 2007), sur des graines d'oseille (Zhang et al., 2008) et *Euonymus alatus* (Yang et Zhang, 2008).



*Figure 1.24. Sections longitudinales montrant le comportement des tissus de racines de R. tinctorum après extraction : témoin (a), agitation (b), reflux (c) et ultrasons (d). E = Épiderme, B = Bois, P = Phloème, * = saignées provoqués par les ultrasons.*

II.3. APPLICATION À DES OBJETS DE MUSÉE

Un ensemble de pots provenant du Palais du Roure (Avignon, France) a été étudié. Cette collection revêt un intérêt historique de tout premier ordre. En effet, il s'agit d'un ensemble de pots provenant de l'entreprise Thomas frères, fabricant de colorants, et retrouvé chez la maison Foulc, fabrique d'indiennes la plus important et la plus prospère d'Avignon (1822-1882). Cette collection comprend six échantillons, composés de cinq poudres rouges (n°1-5) et d'un échantillon de racines (n°6). Les échantillons n° 1 et 4 ont conservé leur étiquette calligraphiée où il est noté respectivement "alizarine de garance" et "carmin de garance" (Figure 1.25).



Figure 1.25. Représentation des objets prélevés au Palais du Roure.

II.3.1. Analyse chromatographique

Ces échantillons ont pu être analysés par CLHP/UV-Visible et les chromatogrammes obtenus à 450 nm sont présentés dans la **figure 1.26** et la proportion relative des anthraquinones identifiées pour chaque échantillon est rapportée dans le **tableau 1.9**.

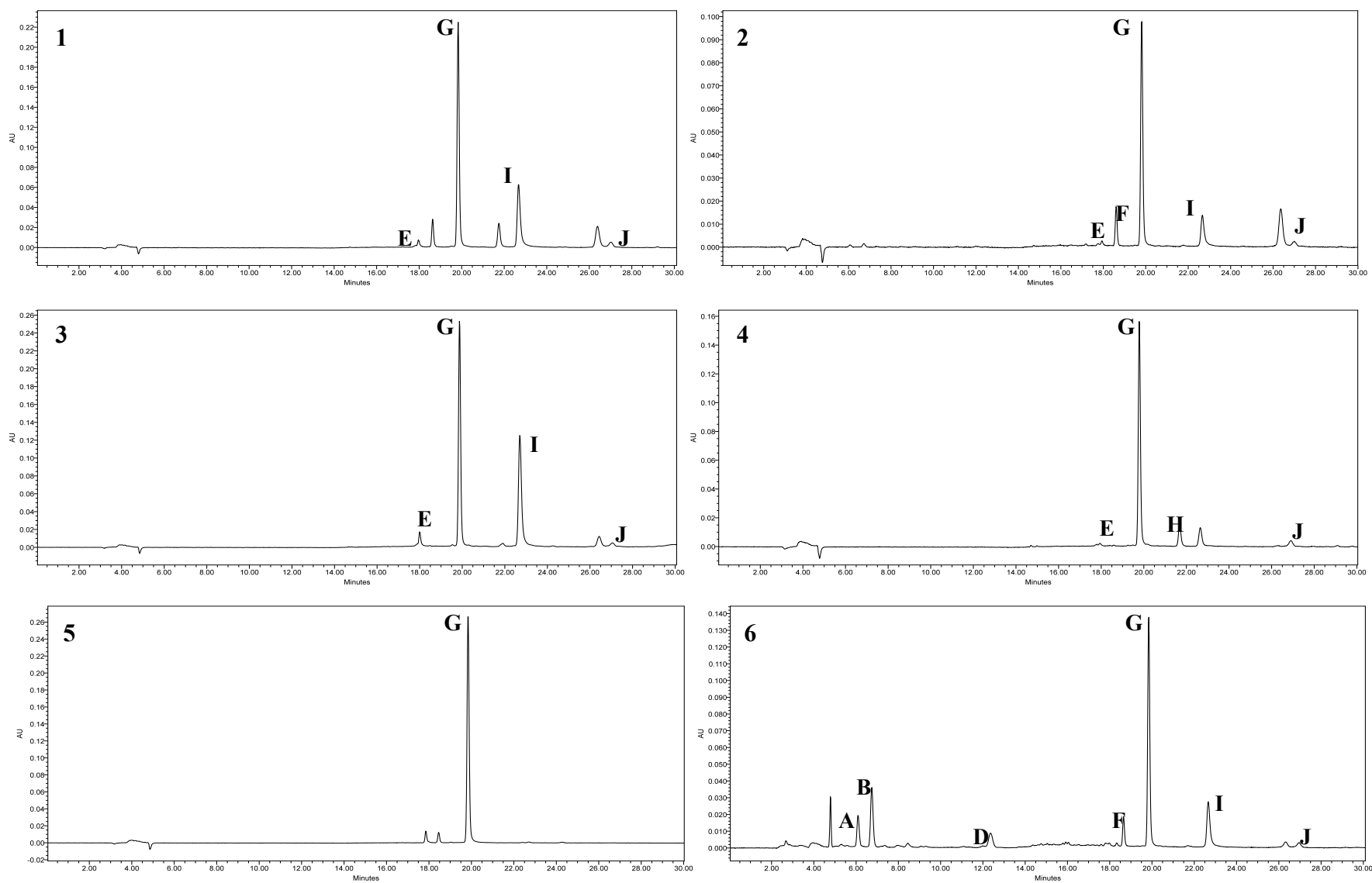


Figure 1.26. Chromatogrammes à 450 nm, des échantillons anciens : échantillons 1 à 6.

Cinq échantillons contiennent uniquement des molécules aglycones ; c'est le cas des échantillons n°1 à 5. Les échantillons n°1 et 2 (**Figures 1.26(1)** et **(2)**) présentent cinq colorants anthraquinoniques : l'antragallol (**E**), la lucidine (**F**), l'alizarine (**G**), la purpurine (**I**) et la rubiadine (**J**). L'échantillon n°3 (**Figure 1.26(3)**) est composé d'antragallol (**E**), d'alizarine (**G**), de purpurine (**I**) et de rubiadine (**J**) mais pas de lucidine et l'échantillon n°4 (**Figure 1.26(4)**) contient les mêmes colorants que l'échantillons n°3 mais avec la xanthopurpurine (**H**) à la place de la purpurine (**I**). Ces échantillons sont tous des garancines à différents degrés d'hydrolyse, avec l'absence (ou non) de certains composés comme la lucidine (**F**). Cette absence peut être expliquée par la transformation de ce dernier composé en son produit d'oxydation, le nordamnacanthal (2-formyl-1,3-dihydroxyanthraquinone), qui n'a pas été identifié ici, ou par l'utilisation d'une garance initialement pauvre en lucidine. La présence d'alizarine (**G**) dans tous ces échantillons montre que les hydrolyses ont été réalisées sur des espèces de garance de teinturiers (*R. tinctorum*). L'échantillon n°5 (**Figure 1.26(5)**) contient principalement de l'alizarine. Ce composé est accompagné par deux autres anthraquinones non identifiées. Cet échantillon est vraisemblablement de l'alizarine synthétique où les deux composés seraient des produits secondaires formés durant la synthèse. Cette hypothèse est possible car la synthèse de l'alizarine a été découverte au XIX^{ème} siècle (Greabe et Liebermann, 1868) ce qui correspond au créneau de datation de nos échantillons.

Enfin, dans le chromatogramme correspondant à l'échantillon n°6 (**Figure 1.26(6)**), plusieurs colorants anthraquinoniques ont été détectés dont les pics correspondent à des composés glycosylés et aglycones : le primevéroside de lucidine (**A**), l'acide rubérythrique (**B**), le primevéroside de rubiadine (**D**), la lucidine (**F**), l'alizarine (**G**), la purpurine (**I**) et la rubiadine (**J**). La présence d'acide rubérythrique (**B**) et d'alizarine (**G**) indique que cet échantillon correspond à une garance des teinturiers (*R. tinctorum*). Enfin, la présence de composés glycosylés en faible quantité au profit des aglycones montre probablement que la garance a été récoltée assez mature afin de donner la meilleure coloration.

Tableau 1.9. Proportion relative en anthraquinone pour chaque échantillon ancien.

Composés	Proportion relative (%)					
	Ech. n°1	Ech. n°2	Ech. n°3	Ech. n°4	Ech. n°5	Ech. n°6
Prim. lucidin (A)	-	-	-	-	-	7,1
Ac. ruberythrique (B)	-	-	-	-	-	14,5
Galiosine (C)	-	-	-	-	-	-
Prim. rubiadine (D)	-	-	-	-	-	5,7
Anthragallol (E)	2,1	1,4	3,9	1,2	-	-
Lucidine (F)	5,8	8,7	-	-	-	5,3
Alizarine (G)	51,6	56,4	50,3	75,8	91,8	45,7
Xanthopurpurine (H)	-	-	-	9,4	-	-
Purpurine (I)	22,1	13,3	38,3	-	-	14,4
Rubiadine (J)	2,3	2,3	1,7	3,7	-	1,9

II.3.2. Analyse colorimétrique

La couleur des échantillons anciens a été mesurée, dans le système CIE Lab, à l'aide d'un colorimètre. Ils ont été comparés à un échantillon contemporain de garance des teinturiers, à la garancine préparée au laboratoire ainsi qu'à deux standards d'aglycones de garance communément rencontrés : l'alizarine et la purpurine (**Tableau 1.10**).

Dans la garance, chaque composé biosynthétisé donne une couleur particulière à l'extrait. Théoriquement, les composés glycosylés, comme le primevéroside de lucidine, sont jaunes-orangés alors que les aglycones sont rouges voire bruns. Cette observation est confirmée et elle est en rapport avec l'effet hypsochrome déjà évoqué pour les composés glycosylés par rapport aux aglycones (**Tableau 1.1**). Donc une modification de la composition chimique et/ou de la proportion entre composés a une répercussion directe sur la coloration de l'échantillon.

Une analyse colorimétrique a été réalisée sur ces échantillons anciens. Le **tableau 1.10** montre les valeurs $L^*a^*b^*$ obtenues, la teinte (H°) et la saturation (S^*) pour chaque échantillon de garance. Les valeurs de luminence (L^*) varient entre 14,13 et 40,33 indiquant que ces échantillons tendent plus vers le noir (valeurs plus proches de 0). De plus les valeurs de a^* et b^* sont toutes positives ce qui implique qu'elles sont appliquées respectivement dans la zone rouge et jaune dans le référentiel $L^*a^*b^*$. Les valeurs de a^* évoluent entre 2,15 et 47,33 et les valeurs de b^* entre 12,36 et 52,62.

La saturation (S^*) et la teinte (H°) ont été également calculées pour chaque échantillon. La saturation représente l'intensité d'une teinte spécifique. Elle est basée sur la pureté de la couleur. La saturation (S^*) des échantillons varie entre 12,55% et 70,78%. La teinte est la forme pure d'une couleur, c'est-à-dire sans adjonction de blanc ou de noir qui permettent d'obtenir ses nuances. Les valeurs de teintes (H°) s'étendent de 48,03° à 57,77°. Seul l'échantillon de garancine à une teinte supérieure qui est de 80,13°. La teinte peut être représentée sur un cercle de couleur où le rouge correspond à 0° et le jaune à 60°. La teinte de la majorité des échantillons se trouve logiquement dans cette zone de couleur.

La couleur de l'alizarine et de la purpurine a également été mesurée et comparée aux échantillons de garance. L'alizarine et la purpurine ont une couleur rouge même si l'alizarine présente une composante jaune plus élevée ($b^* = 46,74$ contre 29,13 pour la purpurine). Ces deux composés sont essentiels dans la composition chimique de la garance des teinturiers. La présence de ces molécules ainsi que leur proportion relative donne une propriété optique particulière aux extraits de garance.

Tableau 1.10. Valeurs de $L^*a^*b^*$, de saturation (S^*) et de teinte (H°) pour les échantillons anciens de garance.

Echantillon	L^*	a^*	b^*	S^* (%)	H°
1	18,57	15,95	18,39	24,35	49,05
2	30,32	17,25	22,04	27,99	51,94
3	29,84	31,88	39,15	50,49	50,84
4	17,87	10,83	12,93	16,87	50,04
5	40,33	47,33	52,62	70,78	48,03
6	32,85	14,74	23,39	27,64	57,77
Garance	37,86	21,65	29,81	36,85	54,01
Garancine	14,13	2,15	12,36	12,55	80,13
Alizarine	32,55	20,31	46,74	50,96	63,51
Purpurine	18,27	24,45	29,13	38,03	49,98

II.4. CONCLUSION

L'étude chromatographique, sur la composition en anthraquinones, menée au cours de ces travaux contribue à une meilleure connaissance des espèces de garance employées anciennement ainsi que des transformations chimiques apportées dans le but de modifier sa coloration.

Une procédure expérimentale Box-Wilson plus communément appelé Plan Composite Centré (PCC) a été mise en place pour étudier la performance des ultrasons sur l'extraction des colorants de la garance et pour permettre l'optimisation des conditions d'extraction (temps, température et solvant). Cette approche mathématique a permis de clairement diminuer le nombre d'expériences, en comparaison avec les méthodes conventionnelles d'optimisation, en faisant varier simultanément les trois paramètres : seulement 20 expériences ont été réalisées contre 125 dans les conditions habituelles. L'interprétation des résultats montre que les valeurs optimales des paramètres influençant l'effet des ultrasons sont de 18 min à 36°C dans un mélange méthanol-eau (37:63, v/v). Une étude préalable a permis de définir la granulométrie optimale des racines broyées correspondant à une taille de 0,5 mm. Ces conditions optimales donnent un rendement en colorants de 64,3%.

Ces conditions d'extraction provoquant une dégradation des colorants, de nouvelles conditions ont été mises en place et utilisées dans le reste de l'étude pour l'analyse de la composition chimique: 25 min à 18°C et dans un mélange méthanol-eau (8:2, v/v). Elles ont été comparées, en matière de rendement et de composition chimique, à la méthode conventionnelle, utilisant un procédé de chauffage par reflux, ainsi qu'à une méthode employant l'agitation. Il en résulte que la méthode par ultrasons produit un meilleur rendement que les méthodes traditionnelles avec un temps d'extraction réduit (25 min contre 1h) et une température plus basse. Ainsi un protocole simple, rapide, efficace et non dénaturant a été mis en place pour l'extraction des colorants de la garance. Ce procédé peut être employé aussi bien pour l'extraction d'analytes avant analyse que dans le domaine industriel pour la teinture.

Les racines de garance ont également été étudiées d'un point de vue cytohistologique, afin d'examiner les effets des différents procédés d'extraction. Les observations microscopiques des fragments de garance soumis aux méthodes conventionnelles montrent des altérations au niveau cellulaire avec notamment une diminution de l'espace des vacuoles. En ce qui concerne l'extraction par ultrasons, de profondes déstructurations des cellules, avec

des parois cellulaires amorphes décrivant des sortes de saignées ont pu être observées. Ces effets peuvent être dûs à l'implosion des bulles de cavitation, formant des micro-jets susceptibles de détériorer la surface des parois cellulaires. Les changements au niveau cellulaire fournissent une explication plausible au rendement plus important de colorant extraits en comparaison des extractions traditionnelles. En effet, les micro-jets formés par les ultrasons transpercent les différentes parois cellulaires, notamment la partie épidermique, libérant ainsi les colorants.

Enfin, les échantillons prélevés au Palais du Roure, comprenant des poudres de couleurs rouges et des racines, ont été analysés par chromatographie et par colorimétrie. Les racines proviennent de l'espèce *R. tinctorum*, les poudres sont des garancines issues de la même espèce et un échantillon d'alizarine de synthèse.

Ces résultats apportent la preuve d'un véritable savoir-faire des fabricants de couleurs du XIX^{ème} siècle. Il faut également noter qu'à cette période charnière, entre l'ère du naturel et du synthétique, le procédé de fabrication de la garancine venait enrichir leur palette de rouges. Enfin, les indienneurs, bien que respectueux de la couleur naturelle, expérimentaient également la couleur de synthèse.

Ces travaux ont été valorisés par la publication de deux articles scientifiques. Le premier porte sur l'optimisation d'un procédé utilisant les ultrasons pour l'extraction des colorants anthraquinoniques de la garance (Cuoco et al., 2009 a). Le second compare la méthode d'extraction par ultrasons aux méthodes traditionnelles (chauffage au reflux et agitation magnétique) au niveau du rendement en colorant, de la composition chimique et de l'impact des procédés sur la racine (Cuoco et al., 2009 b).

PARTIE 2

LES COLORANTS JAUNES

Chapitre I. Étude bibliographique

I.1. HISTORIQUE (Cardon, 2003)

Les graines d'Avignon et la gaude comptent parmi les colorants jaunes les plus employés en teinture (Schweppe, 1992; de Graaff, 2004 ; Peggie et al., 2007 ; Marques et al., 2009). Leur utilisation fût marquée par des évènements historiques importants. En effet, elles sont liées à l'histoire de la discrimination des juifs en Europe, d'où l'autre appellation "herbe des juifs" pour citer la gaude. En l'an 849, le calife al-Mutawakkil ordonna à tous les juifs et chrétiens vivant en pays musulmans de porter un vêtement de couleur jaune, qui pouvait être un manteau, un chapeau ou un turban, afin de les distinguer de la population.

En 1215, le concile de Latran, pour répondre à cette discrimination, imposa à son tour le port d'un signe distinctif pour les juifs et musulmans vivant en pays chrétiens. La représentation de ce symbole n'était pas précisée et elle variait en fonction des régions. En Provence, les juifs devaient choisir entre le port d'un chapeau pointu ou d'une insigne appelée rouelle (**Figure 2.1**). La rouelle (en provençal patasson) était une étoffe jaune découpée en disque et imposée aux juifs par les autorités civiles. Elle symbolisait les 30 deniers de Judas selon l'interprétation traditionnelle.



Figure 2.1. Juifs portant la rouelle et le chapeau pointu (Cardon 2003).

En 1231, l'obligation pour les juifs de porter la rouelle jaune était publiée dans toute l'Espagne et en 1267 le concile de Vienne ordonna la même réglementation.

Ces insignes discriminatoires seront définitivement supprimés pour les juifs des États pontificaux en 1791, lors de la Révolution, à la suite des principes de la constitution française. Malheureusement, si les rouelles et les chapeaux jaunes disparurent en 1791, l'étoile jaune ressurgira en 1940 imposée par le régime nazi.

Les fruits de nerprun utilisés pour la teinture sont nombreux et variés. Les plus communément employés étaient les baies immatures correspondant aux nerpruns des rochers (*Rhamnus saxatilis*), fétide (*Rhamnus infectorius*), des teinturiers (*Rhamnus tinctorius*), purgatif (*Rhamnus catharticus*) et alaterne (*Rhamnus alaternus*). Ces baies étaient regroupées sous l'appellation commerciale de graines d'Avignon et constituées de *Rh. saxatilis* et/ou de *Rh. catharticus* et *Rh. alaternus*.

On peut ajouter que les fruits de nerprun pouvaient être commercialisés sous d'autres appellations. C'est le cas des graines de Hongrie qui étaient le plus souvent un mélange des fruits de *Rh. saxatilis* et *Rh. catharticus*. Celles d'Italie provenaient uniquement de *Rh. infectorius* et celles d'Espagne de *Rh. saxatilis*. Les graines du Levant étaient un mélange de *Rhamnus amygdalinus* et *Rhamnus petiolaris*, dont le dernier pousse en Asie mineure. Enfin, les graines de Perse, très appréciées en Europe, rassemblaient les fruits immatures des espèces *Rh. saxatilis*, *Rh. lycioides* et *Rh. amygdalinus*.

I.2. CARACTÈRES BOTANIQUES (Cardon et du Chatenet, 1990 ; Cardon, 2003)

I.2.1. Les espèces du genre *Rhamnus*

Les nerpruns appartiennent à la famille des *Rhamnaceae* et plus précisément au genre *Rhamnus* regroupant environ 100 espèces d'arbustes ou de petits arbres de 1 à 10 m de haut. Ce sont des espèces indigènes des régions subtropicales présentes principalement en Afrique et en Amérique du Sud.

Le nerprun des rochers (*Rhamnus saxatilis*) est un buisson très ramifié, hérissé d'épines, comportant un feuillage caduque et ne dépassant pas 2 m de hauteur. Ses feuilles ovales et finement dentées sur les cotés (**Figure 2.2a**). Les fleurs sont petites, jaunâtres et se

développent entre mai et juillet. Les fruits sont de petites drupes vertes devenant brunes à maturité (août-septembre).

Le nerprun alaterne (*Rhamnus alaternus*) est un arbrisseau pouvant atteindre jusqu'à 5 m caractéristique des garrigues méditerranéennes comportant un feuillage persistant. Les rameaux sont alternes, glabres et non épineux. Les feuilles sont ovales ou lancéolées et ont les bords légèrement dentés (**Figure 2.2b**).

Le nerprun purgatif (*Rhamnus catharticus*) est un arbrisseau de 3 à 6 m de hauteur possédant notamment des rameaux à bout épineux et un feuillage caduque. Les feuilles sont ovales, finement dentées, opposées sur les jeunes rameaux, puis alternes sur les plus âgés (**Figure 2c**). Les fleurs sont jaunes verdâtres et sont présentes entre mai et juin. Les fruits sont de petites drupes noires à maturité (août-septembre).

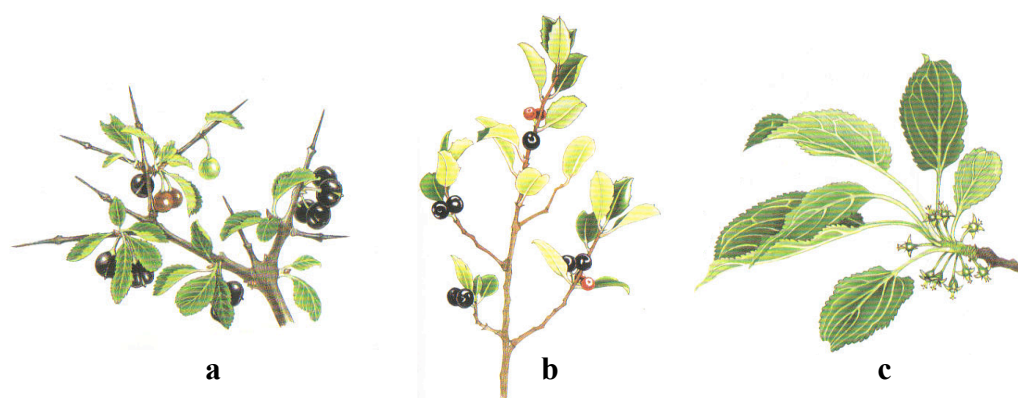


Figure 2.2. Représentation des espèces *Rh. saxatilis* (a), *Rh. alaternus* (b) et *Rh. catharticus* (c) (Cardon et du Chatenet, 1990).

Elles se localisent généralement en Europe et autour du bassin Méditerranéen (Cardon, 2003). L'espèce *Rh. saxatilis* se trouve dans toute l'Europe centrale et méridionale, et *Rh. alaternus* seulement dans le sud de l'Europe, depuis le Portugal jusqu'en Bulgarie. Enfin, *Rh. catharticus* se situe autour du bassin Méditerranéen ainsi qu'en Asie orientale (**Figure 2.3**).

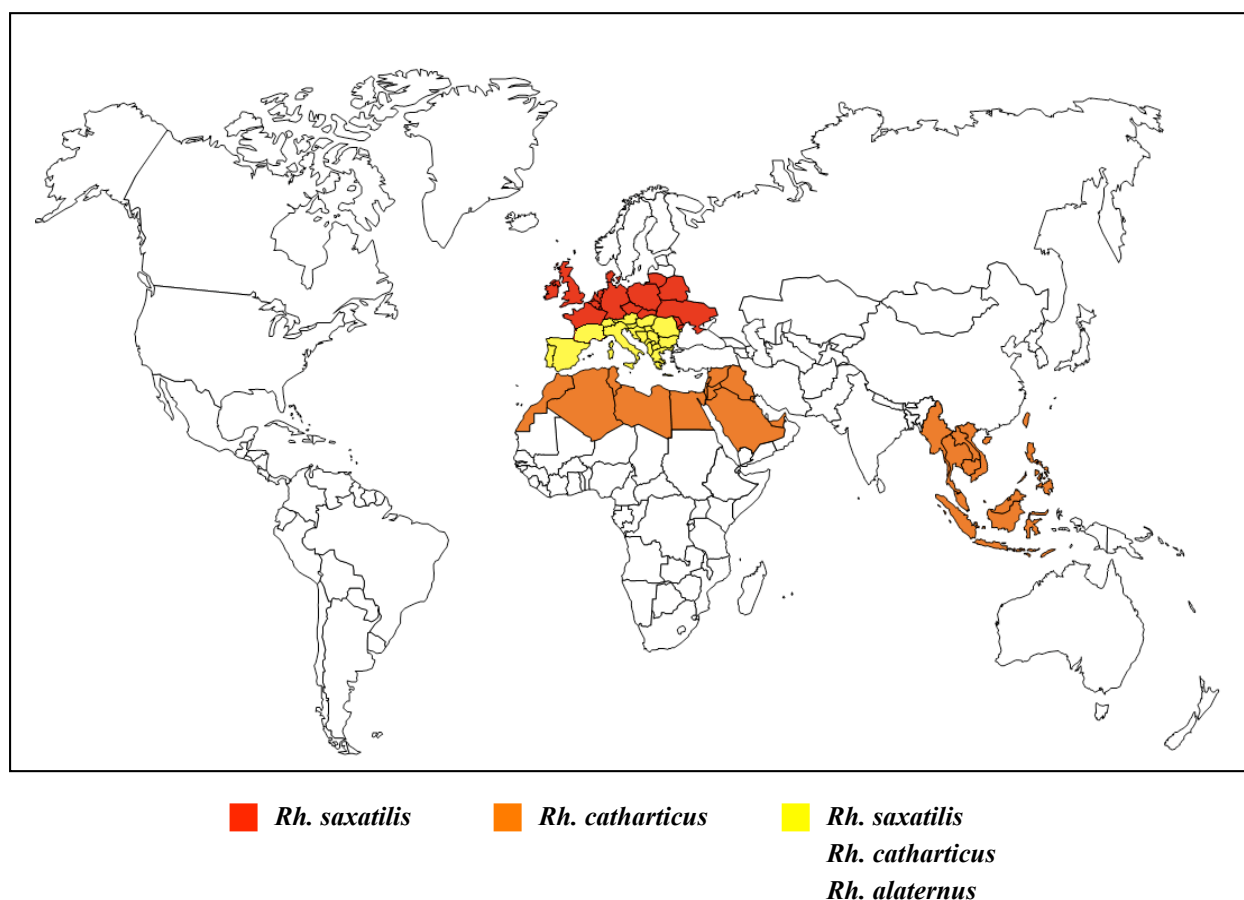


Figure 2.3. Répartition géographique des trois espèces de Rhamnus.

I.2.2. L'espèce Reseda luteola

Les différentes espèces de *Reseda* appartiennent à la famille des *Resedaceae*. Ce genre botanique comprend une cinquantaine d'espèces annuelles, bisannuelles ou vivaces, originaires d'Afrique du Nord, d'Europe et d'Asie occidentale.

La gaude (*Reseda luteola*) est une plante herbacée bisannuelle. Elle dresse une longue tige (jusqu'à 1,50 m) robuste, anguleuse et non ramifiée. Les feuilles, entières et lancéolées, sont disposées alternativement le long de la tige qui se termine par une longue grappe raide de petites fleurs jaune verdâtre se développant entre mai et septembre. Enfin, les fruits sont de petites capsules à trois dents, contenant de minuscules graines noires (**Figure 2.4**).



Figure 2.4. Représentation de l'espèce *R. luteola* (Cardon et du Chatenet, 1990).

On peut trouver *R. luteola* sur les sols secs et calcaires d'Europe occidentale et méridionale, notamment dans les régions où elle était anciennement cultivée pour la teinture, comme la Normandie. Elle est également présente en Afrique du Nord ainsi qu'au Moyen Orient (**Figure 2.5**).

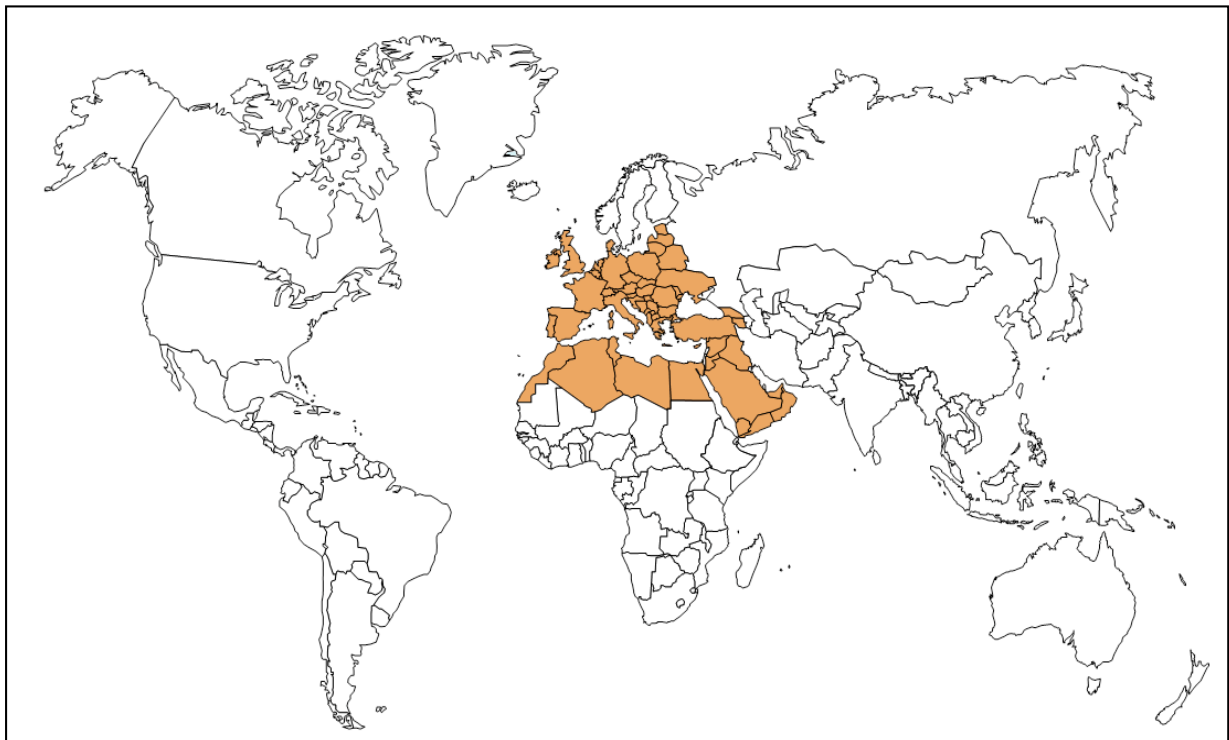


Figure 2.5. Répartition géographique de *R. luteola*.

I.3. COMPOSITION CHIMIQUE

Les colorants, présents essentiellement dans les fruits de différentes espèces de *Rhamnus*, ont des structures chimiques différentes. Cette diversité est étroitement liée à la maturité des fruits. En effet, les baies immatures comprennent essentiellement des composés flavonols. À maturité, des anthraquinones ainsi que des anthocyanes sont biosynthétisés par la plante. A noter que les anthocyanes sont présentes dans la peau donnant aux fruits mûrs leur coloration noire.

En ce qui concerne *Reseda luteola*, les principaux colorants présents dans la plante sont des flavones. Ce sont les tiges et les feuilles, contenant le plus de matière colorante, qui étaient utilisées pour la teinture.

I.3.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une importante famille des polyphénols et sont plus particulièrement connus pour leur activité antioxydante. Ils sont constitués d'un squelette de base à 15 atomes de carbone sous forme de deux cycles phényles reliés entre eux par un troisième cycle pyrone (**Figure 2.6**).

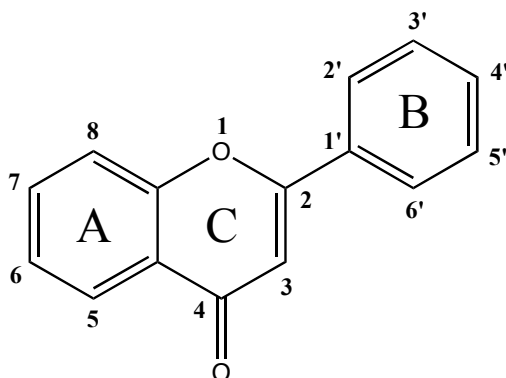


Figure 2.6. Structure du noyau flavonoïde (Schweppe 1993).

On peut distinguer chez les flavonoïdes diverses sous familles de composés comme les flavones, les flavonols, les flavanols, les aurones, les chalcones ou les anthocyanes. Tous ces composés ont une origine biosynthétique commune mettant en jeu deux composés précurseurs : l'acétyl coenzyme A et l'acide para-coumarique (acide 3-(4-hydroxyphenyl)-prop-2-énoïque) (Harborne, 1994).

I.3.1.1. Les flavonols

Les flavonols sont une sous-famille des flavonoïdes et sont caractérisés par la présence d'une fonction hydroxyle en position 3 sur le squelette de base. Ils sont présents dans le genre *Rhamnus* et se distinguent par la nature et le positionnement des substituants sur les cycles A et B du noyau flavonoïde. La plante biosynthétise principalement six flavonols qui sont la quercétine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone), l'isorhamnétine (3'-méthoxy-3,4',5,7-tetrahydroxyflavone), le kaempférol (3,4',5,7-tetrahydroxyflavone), la rhamnétine (7-méthoxy-3,3',4',5-tetrahydroxyflavone), la rhamnazine (3',7-diméthoxy-3,4',5-trihydroxyflavone) et la rhamnocitrine (7-méthoxy-3,4',5-trihydroxyflavone) (Harborne, 1994). La **figure 2.7** présente la structure chimique des principaux composés.

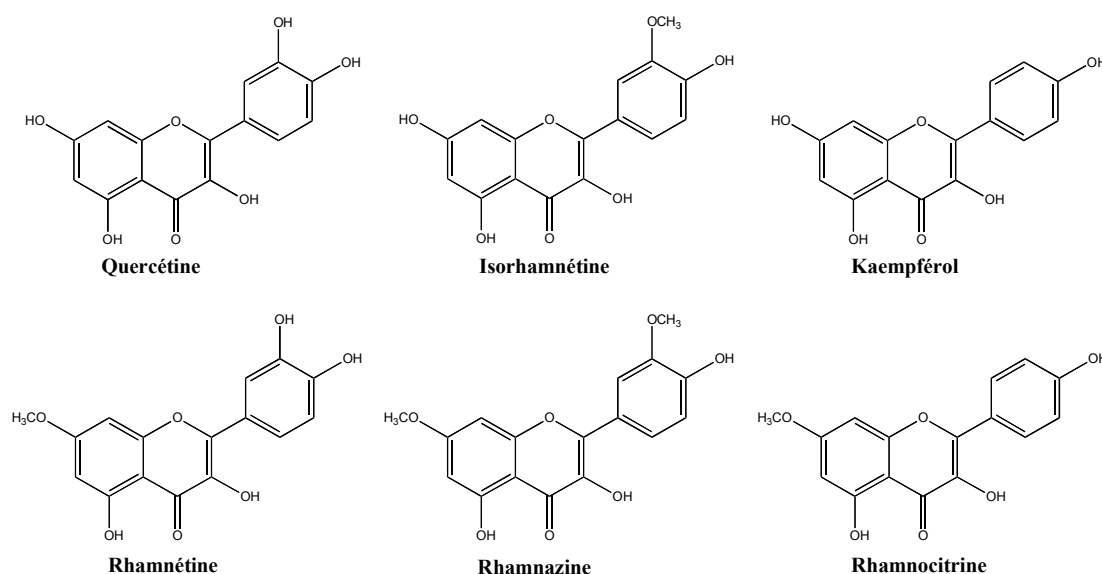


Figure 2.7. Structures des principaux flavonols aglycones rencontrés dans les fruits de *Rhamnus* (Harborne, 1994).

Il est important de noter que l'isorhamnétine et la rhamnétine ont la même masse molaire mais diffèrent de par la position de la fonction méthoxyle. Ces flavonols aglycones sont présents dans le fruit mais ont été également identifiés dans les feuilles de l'espèce *Rh. prinoïdes* (Nindi et al., 1999). Ces composés ne sont spécifiques ni du genre *Rhamnus* ni de la famille botanique des *Rhamnaceae*. En effet, ils ont pu être mis en évidence dans diverses plantes comme *Cistus monspeliensis* pour l'isorhamnétine, *Ambrosia deltoidea* pour la rhamnétine et la rhamnazine, *Artemisia annua* pour la rhamnocitrine. Enfin, la quercétine et le

kaempférol sont largement présents dans bon nombre de végétaux comme par exemple *Lotus corniculatus* (Harborne, 1994).

Par ailleurs, les flavonols présents dans les fruits des espèces du genre *Rhamnus* se rencontrent généralement à l'état de glycosides. Le principal groupement osidique entrant dans la composition des flavonols glycosylés est un trisaccharide constitué de rhamnose et de galactose : le rhamninoside ou α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- O - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- O - β -D-galactopyranoside (**Figure 2.8**).

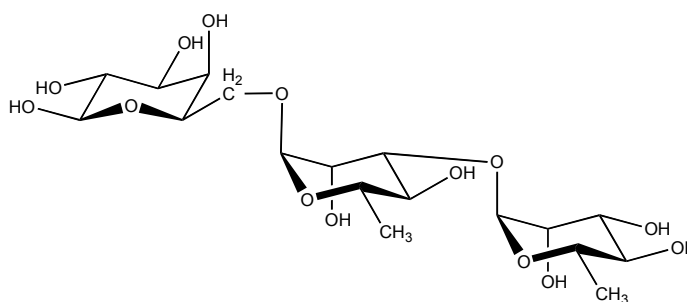


Figure 2.8. Structure chimique du rhamninoside (Marzouk et al., 1999).

Ce groupement rhamninoside est généralement lié aux composés aglycones en position 3. Il a pu être identifié dans les fruits de diverses espèces de *Rhamnus*, le 3- O -rhamninoside de rhamnétine (xanthorhamnine A et B), le 3- O -rhamninoside de rhamnazine (xanthorhamnine C) et le rhamninoside-3- O -rhamnocitrine (alaternine) (Riess-Maurer et Wagner, 1982 ; Wang et al., 1988 ; Harborne, 1994). Le 3- O -rhamninoside de quercétine et 3- O -rhamninoside de kaempférol ont également été observés notamment dans l'espèce *Rh. disperma* (Özipek et al., 1994 ; Marzouk et al., 1999). A noter qu'une confusion a été faite sur l'alaternine. En effet, ce mot a été également employé pour caractériser une anthraquinone identifiée dans l'espèce *Rh. alaternus* (Abou-Chaar et Shamlian, 1980). De la même manière, la position 4' du flavonol peut également être occupée par le rhamninoside formant des composés comme le 4'- O -rhamninoside de rhamnocitrine (catharticine) et le 4'- O -rhamninoside de kaempférol.

Le rhamninoside monoacétylé est également présent dans le genre *Rhamnus* : il est nommé O -acétyl-rhamninoside ou O - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-(4- O -acétyl)- O - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- O - β -D-galactopyranoside (**Figure 2.9**). Les composés, identifiés notamment dans *Rh. saxatilis* (Riess-Maurer et Wagner, 1982) et *Rh. thymifolius* (Satake et

al., 1993), sont le 3-*O*-acétyl-rhamninoside de rhamnétine ainsi que le 3-*O*-acétyl-rhamninoside de kaempférol.

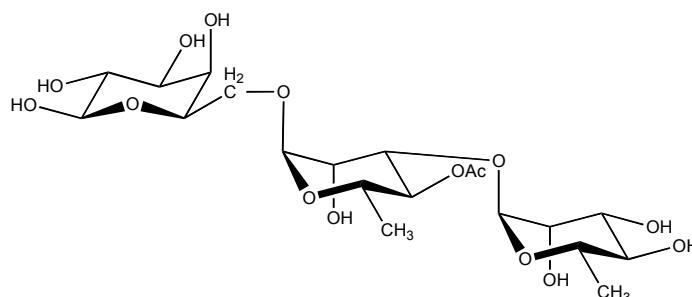


Figure 2.9. Structure chimique de l'acétyl-rhamninoside (Satake et al., 1993).

De manière plus secondaire, on note la présence d'un autre trisaccharide : l'isorhamninoside ou α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-galactopyranoside. La différence avec le groupement rhamninoside réside dans la liaison entre les deux rhamnoses. Le 3-*O*-isorhamninoside de rhamnazine et de rhamnocitrine ont été isolés dans l'espèce *Rh. formosana* (Lin et al., 1991).

De plus, un composé comportant l'acide paracoumarique, substitué sur un groupement rhamninoside, a été caractérisé dans l'espèce *Rh. petiolaris* (Özipek et al., 1994). Il s'agit du 3-*O*-(3''-*O*-coumaroyl)-rhamninoside de rhamnétine (**Figure 2.10**).

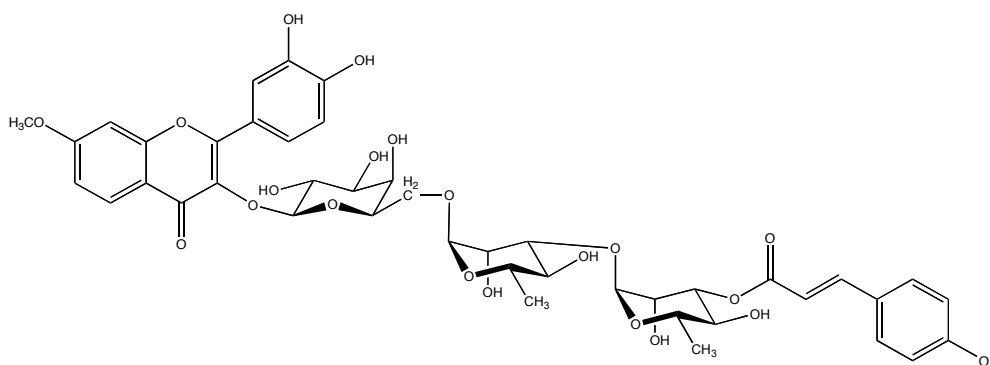


Figure 2.10. Structure chimique du 3-*O*-(3''-*O*-coumaroyl)-rhamninoside de rhamnétine (Özipek et al., 1994).

Enfin, un flavonol monoglycoside, la quercitrine ou 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside de quercétine (**Figure 2.11**), a été identifié dans différentes espèces (Özipek et al., 1994 ; Romani et al., 2006).

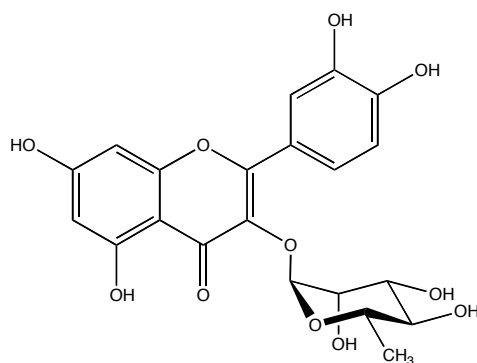


Figure 2.11. Structure chimique de la quercitrine (Özipek et al., 1994).

I.3.1.2. Les flavones

La diversité des structures des composés flavones présents dans l'espèce *Reseda luteola* réside dans la nature et dans le positionnement des substituants sur le cycle B du noyau flavonoïde. La gaude biosynthétise principalement quatre flavones à l'état aglycones (Cristea et al., 2003 ; Peggie et al., 2007) : la lutéoline (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone), l'apigénine (4',5,7-trihydroxyflavone), le chrysoeriol (3'-méthoxy-4',5,7- trihydroxyflavone) et la diosmétine (4'-méthoxy-3',5,7- trihydroxyflavone) (Figure 2.12).

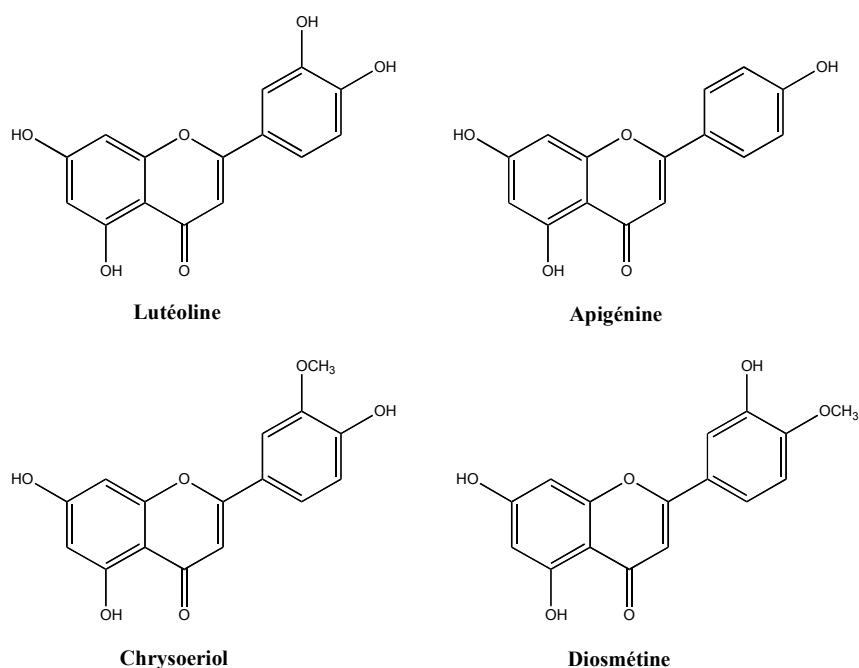


Figure 2.12. Structures des principales flavones aglycones rencontrées dans *Reseda luteola* (Peggie et al., 2007).

Parmi ces principaux colorants présents, la lutéoline a été isolée à partir de la gaude dès le début du XIX^{ème} siècle par le chimiste français Chevreul. Il s'agit d'une molécule assez commune chez les plantes à fleurs mais curieusement absente chez les autres Resedaceae, comme le réséda bâtard (*Reseda lutea*) présent dans le sud de la France et ressemblant beaucoup à la gaude (Cardon, 2003).

Ces composés sont également présents sous forme glycosylée où la partie sucre est composée de glucose. Les composés identifiés dans la littérature (Cristea et al., 2003) sont le 7-*O*-glucoside d'apigénine, les glucosides de lutéoline en position 7 et 3' ainsi que le 3',7-di-*O*-glucoside de lutéoline (Figure 2.13).

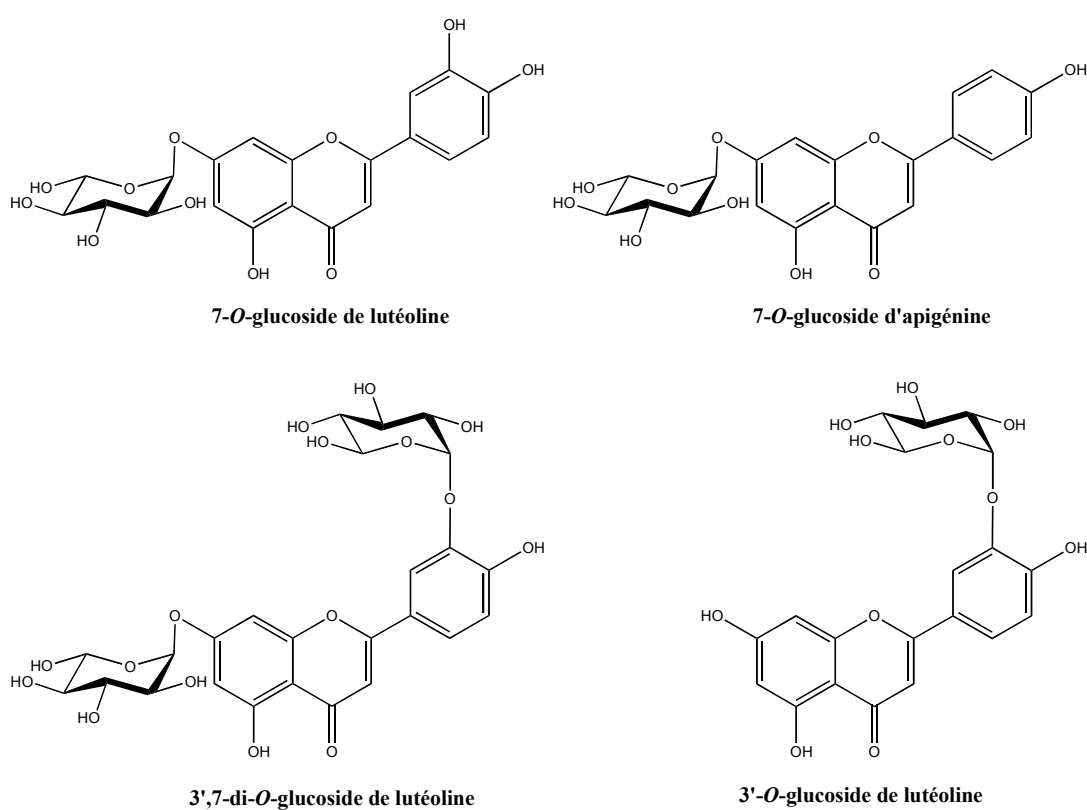


Figure 2.13. Structures chimiques des flavones glycosylés (Cristea et al., 2003).

I.3.1.3. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des substances naturelles présentes dans de nombreux végétaux. Elles conservent la structure de base des flavonoïdes mais présentent une ionisation du cycle C produisant le cation flavylum. Le pH est un facteur important dans le changement de couleur des anthocyanes. En milieu acide, la forme flavylum est stable et donne une coloration rouge, tandis qu'en milieu basique, il se transforme en base quinonique de coloration bleue.

Ces composés ont été identifiés dans la peau des fruits matures de *Rh. alaternus* (Longo et al., 2005) sous forme aglycone et glycosylés. Les composés aglycones correspondent à la pélargonidine, la cyanidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine ainsi que la malvidine (**Figure 2.14**).

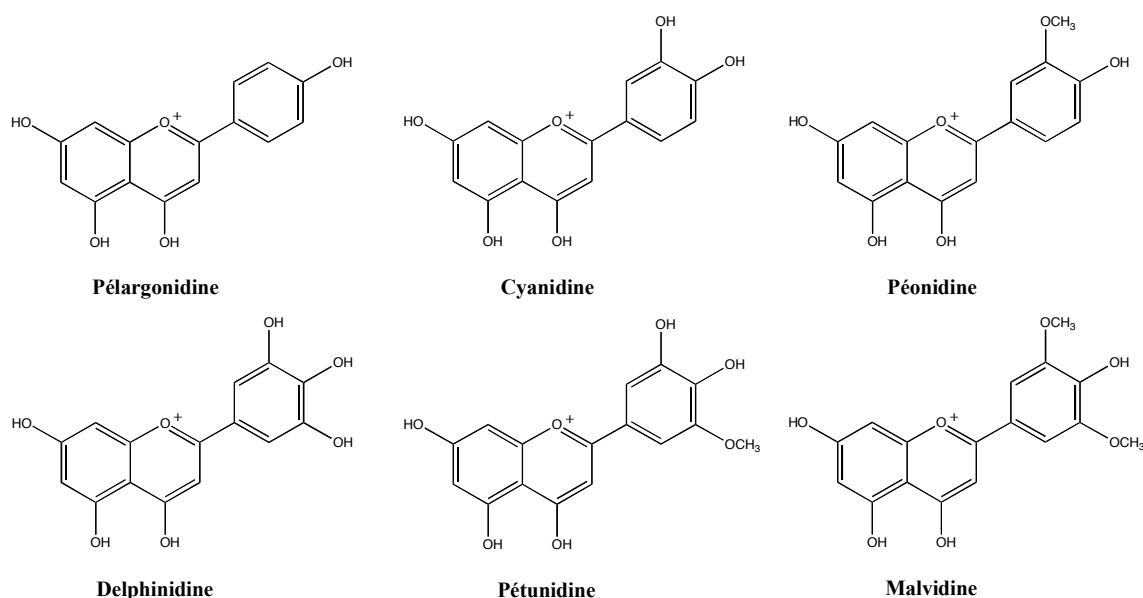


Figure 2.14. Structures des principaux anthocyanes aglycones rencontrés dans les fruits de *R. alaternus* (Longo et al., 2005).

Des anthocyanes glycosylés ont également été caractérisés dans *Rh. alaternus* correspondant aux dérivés 3-*O*-rutinose et 3-*O*-glucose des composés aglycones précédemment détaillés.

I.3.2. Les anthraquinones

Les fruits matures des divers arbustes appartenant au genre *Rhamnus* contiennent également des anthraquinones. Il s'agit de composés aglycones comme l'émodyne, le chrysophanol, l'aloé-émodyne, la rhéine, l'alaternine et la pariétine représenté dans la **figure 2.15** (Abou-Chaar et Shamlian, 1980 ; Sharp et al., 2001 ; Manojlovic et al., 2005 ; Rafaëly et al., 2008).

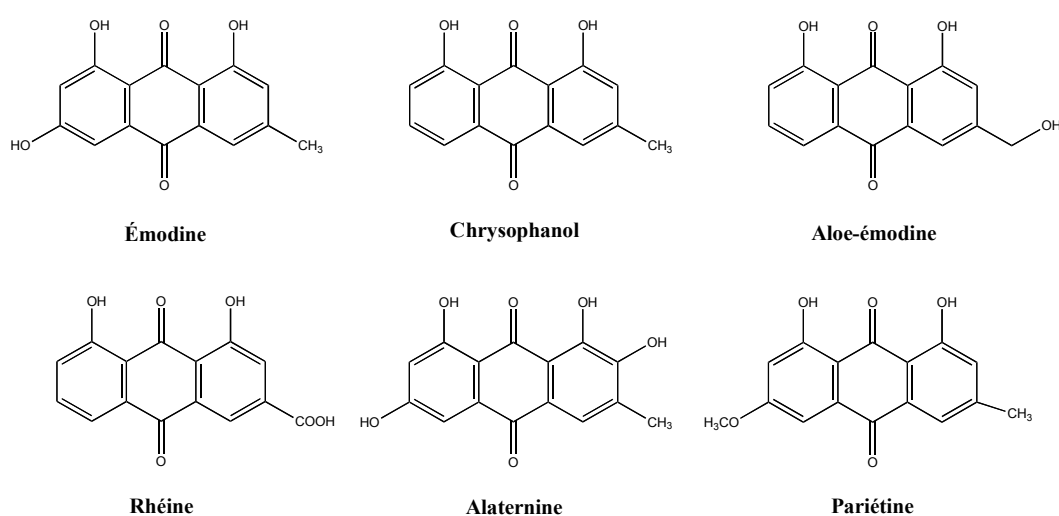


Figure 2.15. Structures des principales anthraquinones aglycones rencontrées dans les fruits de *Rhamnus* (Schweppe, 1993 ; Rafaëly et al., 2008).

On peut noter que ces anthraquinones aglycones ont été identifiées dans l'écorce, les feuilles ainsi que dans les fleurs de l'espèce *Rh. alaternus* (Abou-Chaar et Shamlian, 1980).

La plante biosynthétise également des anthraquinones glycosylées. Le principal groupement osidique lié à l'anthraquinone, qui est le plus souvent l'émodyne, correspond au rhamnose. La franguline A (6-*O*-rhamnoside d'émodyne) a été identifiée dans *Rh. catharticus* (Rafaëly et al., 2008), *Rh. frangula* (Cardon, 2003) et *Rh. libanoticus* (Coşkun et al., 2001). Des dérivés acétylés de la franguline A ont été caractérisés dans *Rh. prinoides* (Abegaz et Peter, 1995) et dans *Rh. nepalensis* (Mai et al., 2001). Ils correspondent aux formes mono- (position 2' et 3'), di- (2',3'-3',4' et 2',4') et tri-acétate (peracétate) de la partie rhamnose (**Figure 2.16**).

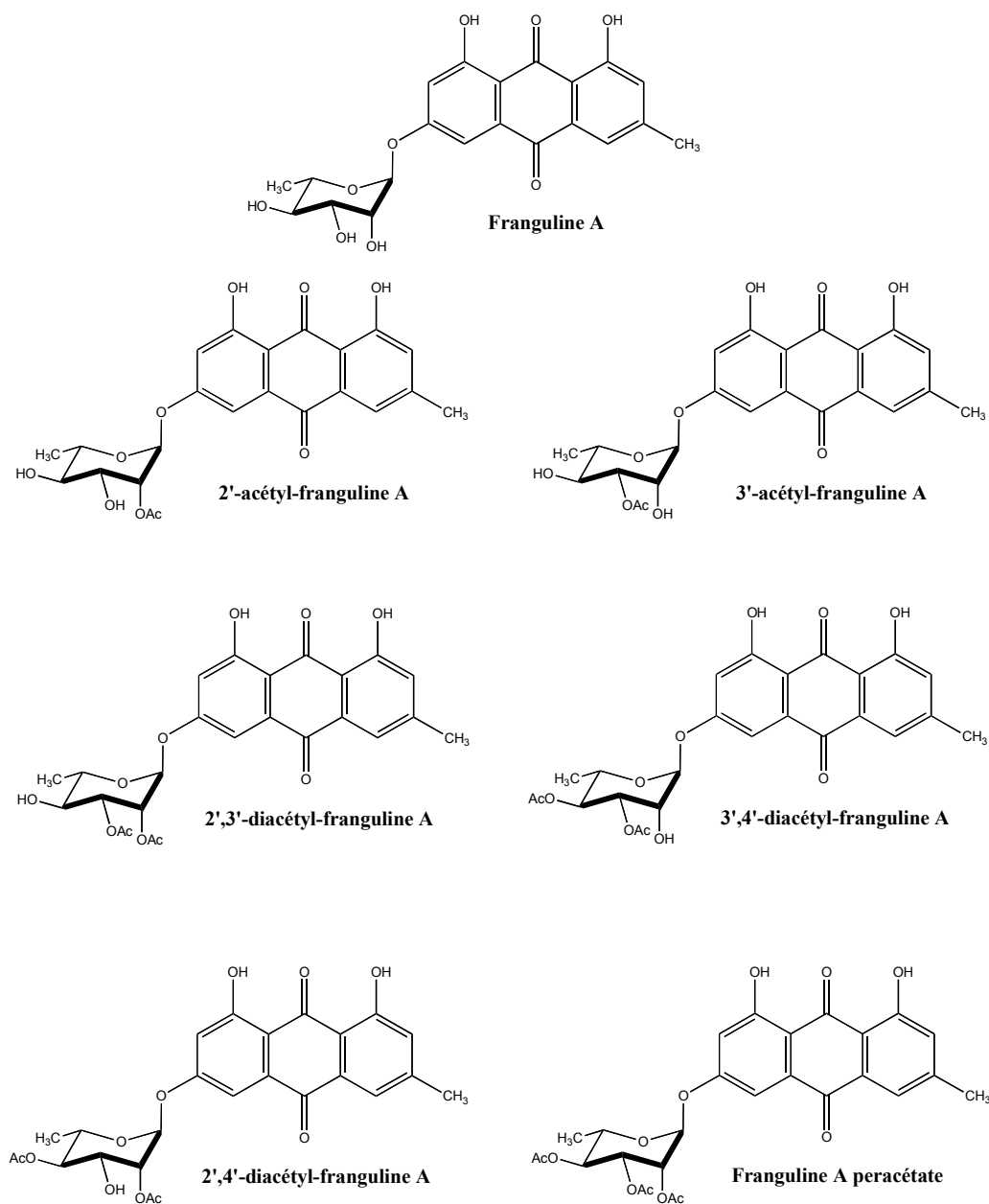


Figure 2.16. Structures des principales anthraquinones rhamnosides rencontrées dans les fruits de *Rhamnus* (Coşkun et al., 2001 ; Mai et al., 2001).

La franguline B, correspondant à un apiose lié à l'émodyne en position 6 (**Figure 2.17**), a été identifiée dans diverses espèces comme *Rh. frangula* (Wagner et Demuth, 1972) ou *Rh. formosana* (Lin et al., 1990).

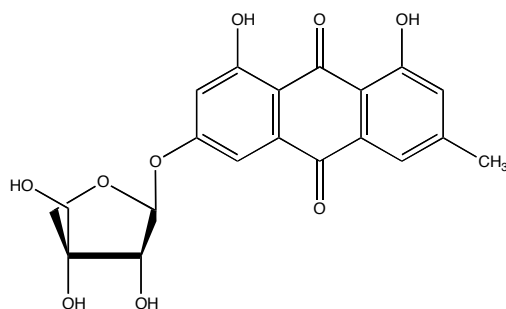


Figure 2.17. Structure de la franguline B (Lin et al., 1990).

D'autres anthraquinones glycosylées peuvent être présentes dans diverses espèces. C'est le cas du 1-*O*-rhamnopyranosyl-(1→2)-*O*-glucopyranoside d'émodyne et du 8-*O*-rhamnopyranosyl-(1→2)-*O*-glucopyranoside de pariétine qui ont été identifiés dans *Rh. formosana* (Lin et al., 1991).

Dans le même sens, le 8-*O*-β-gentiobioside de pariétine et le 8-*O*-β-rutinoside de pariétine ont été isolés respectivement à partir de *Rh. virgatus* (Prasad et al., 2000) et *Rh. libanoticus* (Coşkun et al., 2001).

Enfin, le genre *Rhamnus* contient également des anthrones. Ces composés sont des dérivés de l'anthracène, comme pour les anthraquinones, mais contrairement à ces dernières, elles ne comportent qu'une seule fonction cétone en position 9. A été identifié dans *Rh. prinoïdes* (Abegaz et Peter, 1995) et dans *Rh. nepalensis* (Mai et al., 2001) l'émodinanthrone aglycone ainsi que ses dérivés acétyl-rhamnosides. De plus, des bianthrones ont également été caractérisées mettant en jeu deux anthrones analogues, l'émodyne et le chrysophanol bianthrones, ainsi que des anthrones différentes donnant notamment le chrysophanol-émodyne bianthrone. De la même manière, la plante biosynthétise des émodynes bianthrones rhamnosides dont les parties sucres, liées en position 6 et 6', peuvent être acétylées. La **figure 2.18** décrit différentes anthrones et bianthrones aglycones.

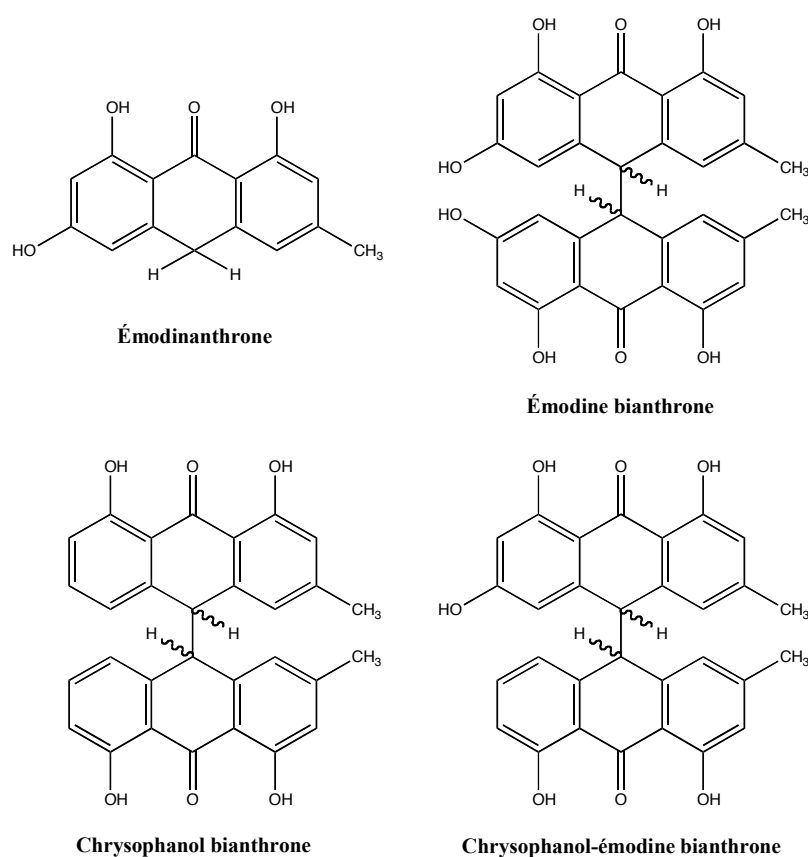


Figure 2.18. Structures de l'émodinanthrone et de diverses bianthrone présentes dans le genre Rhamnus (Mai et al., 2001).

I.4. PROPRIÉTÉS ET UTILISATIONS

I.4.1. Dans le domaine de la couleur

Comme décrit précédemment à propos de la garance (cf. Partie 1, I.5.1.), les colorants présents dans les différents nerpruns ainsi que dans la gaude ont également été utilisés en teinture et en peinture (Delormois, 1770 ; Schweppe, 1993 ; Cardon, 2003 ; Romani, 2006). En effet, les anthraquinones, les anthrones et les flavonoïdes possèdent des sites permettant la formation de complexes de coordination avec l'ion métallique. Les flavonoïdes possèdent des sites "céto-phénolate" et "diphénolate" favorable à cette complexation avec notamment, pour certains, la présence d'un noyau catéchol (benzène-1,2-diol) comme la quercétine, la cyanidine ou la lutéoline. On peut ajouter que les laques fabriquées à partir des graines d'Avignon étaient commercialisées sous l'appellation Stil de grain (Romani et al., 2006).

Les fruits de nerprun ont principalement été employés pour la fabrication de jaune en utilisant les fruits verts. Les fruits mûrs étaient qu'en à eux appliqués à la préparation d'un vert nommé vert de vessie (Cardon et du Chatenet, 1990 ; Pérégo, 2005). Cette appellation provient du fait qu'il était conservé et vendu dans des vessies de porc. Il était principalement réalisé en utilisant les fruits de la bourdaine (*Rhamnus frangula*) mais les autres nerpruns pouvaient également être employés à cet effet. Toutefois, le vert de vessie n'était pas toujours apprécié en raison de son instabilité dans le temps. Il était essentiellement employé en peinture à l'eau.

I.4.2. Dans le domaine pharmacologique

Les fruits de plusieurs nerpruns ont également des propriétés pharmacologiques et leur application remonte dès l'Antiquité. La présence des composés polyphénoliques leur attribue des propriétés antioxydantes (Hsiao et al., 1996 ; Choi et al., 2000 ; Ammar et al., 2008). De plus, il a été établi que ces arbustes avaient des activités purgatives, digestives et diurétiques et étaient très utilisés en médecine chinoise (Wang, 1988 ; Cardon, 2003 ; Manojlovic et al., 2005).

Chapitre II. Résultats et discussion

Ce chapitre regroupe les résultats obtenus sur les colorants jaunes employés anciennement en Provence pour la teinture : le jaune d'Avignon et la gaude. Une étude fondamentale sur l'identification des colorants extraits à partir des fruits (immatures et matures) d'espèces appartenant au genre *Rhamnus* a été effectuée. Les flavonols et les anthraquinones ont été identifiés d'une part en utilisant les standards commerciaux et d'autre part grâce à la CLHP/UV/SM. D'autre part, trois nouvelles anthraquinones ont été caractérisées par RMN. De plus, après l'identification des différentes molécules composant la gaude, une comparaison entre la chromatographie liquide et l'électrophorèse capillaire a été réalisée. Enfin, un échantillon noté "Stil de grain" provenant d'une pharmacie du XVIII^{ème} siècle a été analysé dans le but de déterminer l'espèce botanique anciennement utilisée.

II.1. ÉTUDE DES COLORANTS DE RHAMNUS

II.1.1. Identification des flavonols

II.1.1.1. Les composés aglycones

Les composés aglycones présents dans les fruits immatures des *Rhamnus* ont été analysés par CLHP/UV/SM. Lors de l'analyse des spectres de masse, des fragments correspondants à une déshydratation du pic moléculaire $[M+H-H_2O]^+$ et à deux pertes successives de CO ($[M+H-H_2O-CO]^+$ et $[M+H-H_2O-2CO]^+$) ont été observés en détection en mode positif. La rupture du cycle C du flavonol a également été notée tandis que les fragments correspondants révèlent une substitution du cycle A et B. La coupure est réalisée au niveau des liaisons 0 et 2 produisant les ions fragments $^{0,2}A^+$ et $^{0,2}B^+$ (Petsalo et al., 2006 ; Tsimogiannis et al., 2007). Les ions fragments produits lors de la coupure du cycle C de la rhamnétine sont présentés dans la **figure 2.19**.

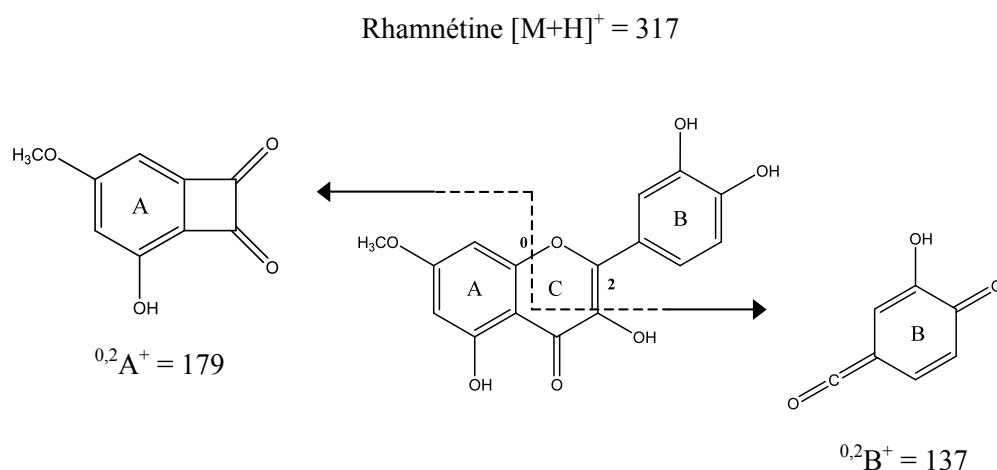


Figure 2.19. Rétrocyclisation observée lors de la fragmentation des flavonols aglycones et en particulier la rhamnétine (Tsimogiannis et al., 2007).

Cette fragmentation a permis notamment de différencier la rhamnétine de l'isorhamanétine, qui ont toutes deux la même masse molaire et qui se distinguent par le groupement méthoxyle respectivement en position 7 sur le cycle A (pour la première) et en position 3' sur le cycle B (pour la deuxième). Les données des ions fragments des composés aglycones sont présentées dans le **tableau 2.1**.

Tableau 2.1. Données chromatographiques des flavonols aglycones.

n°	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M+H] ⁺ (m/z)	ions fragments en mode positif (m/z)	identification
14	39,1	203, 256, 372	303	285, 257, 165, 137	quercétine
15	42,7	203, 255, 372	317	165, 151	isorhamnétine
16	43,5	197, 267, 364	287	241, 165, 119	kaempférol
17	43,8	204, 256, 372	317	299, 271, 179, 137	rhamnétine
18	47,4	204, 255, 372	331	179	rhamnazine
19	48,4	197, 268, 366	301	179, 119	rhamnocitrine

II.1.1.2. Les composés glycosides

Pour cette étude, nous n'avons pas eu la possibilité d'utiliser des standards pour l'identification des composés glycosylés. Le principal problème était de déterminer la position

du sucre sur le composé aglycone qui peut être en position 3 ou 4' (Riess-Maurer et Wagner, 1982 ; Satake et al., 1993). Les sites de glycosylation peuvent être déterminés par l'étude du spectre UV/Visible. En effet, en comparaison avec le composé aglycone, un effet hypsochrome est observé au niveau du λ_{\max} quand la partie sucre est en position 3 sur le squelette flavonol (Vallejo et al., 2004 ; Lin et al., 2008). La présence d'un groupe hydroxyle en position 3, caractéristique des composés flavonol, induit une liaison hydrogène intramoléculaire avec le groupement carbonyle voisin (position 4). Cette liaison hydrogène n'existe pas quand le groupement -OH est substitué par un glycosyle. L'effet hypsochrome provoqué par la présence d'un substituant glycosyle en position 3 est décrit dans la littérature (Mabry et al., 1970). De la même manière, une liaison hydrogène intramoléculaire existe entre le groupement hydroxyle en position 4' et un hydroxyle ou un méthoxyle en position 3' comme c'est le cas pour la quercétine, la rhamnétine, l'isorhamnétine et la rhamnazine (**Figure 20**). La glycosylation en position 4' sur de telles molécules inhibe cette liaison hydrogène et le spectre UV/Visible en est modifié.

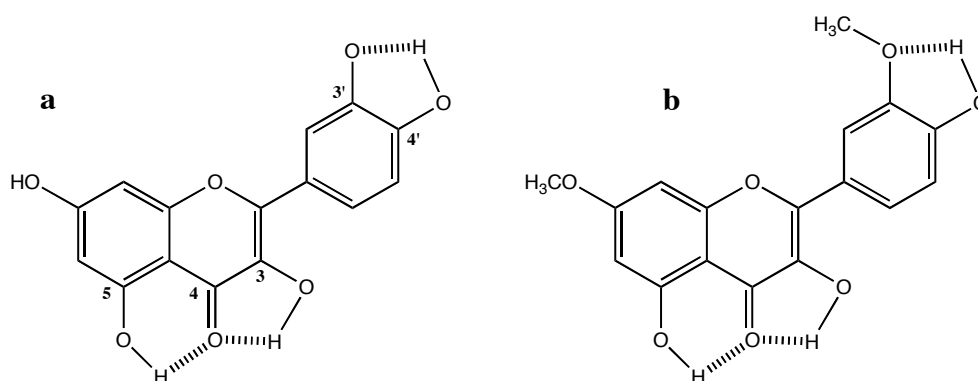


Figure 2.20. Liaisons hydrogène présentes dans la quercétine (a) et dans la rhamnazine (b).

Dans le but de préciser le site de glycosylation, qui peut donc être en position 3 ou 4', une étude spectroscopique entre la quercétine, le 3-*O*-glucoside de quercétine et le 4'-*O*-glucoside de quercétine a été réalisée. En comparaison avec la quercétine aglycone (**Figure 2.21**), l'effet hypsochrome observé est plus important pour le 3-*O*-glucoside de quercétine (~20 nm pour une liaison hydrogène entre -OH et C=O) que pour le 4'-*O*-glucoside de quercétine (~10 nm pour une liaison hydrogène entre -OH et -OR).

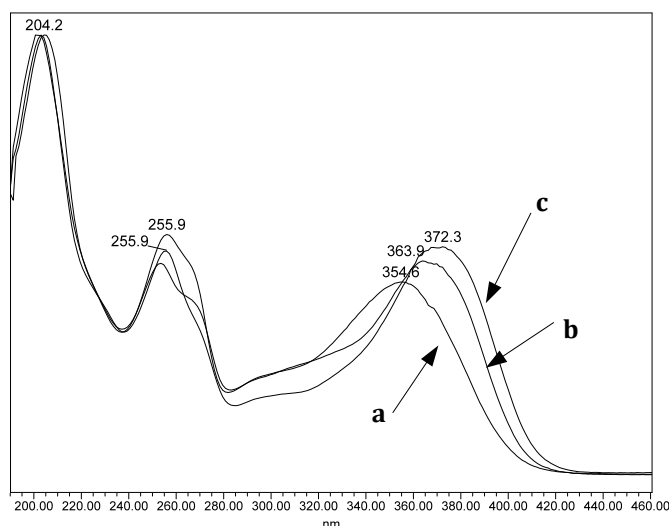


Figure 2.21. Comparaison des spectres UV-Visible du 3-O-glucoside de quercétine (a), du 4'-O-glucoside de quercétine (b) et de la quercétine (c).

L'observation des valeurs de maxima d'absorption des composés glycosylés (**Tableau 2.2**) permet donc de déterminer la position de la partie sucre sur les flavonols aglycones. On peut noter que le kaempférol et la rhamnocitrine, qui ne présentent pas de groupement –OH en position 3', ne montrent aucun déplacement de longueur d'onde quand ils sont glycosylés en position 4' (composés **6** et **12**).

La détermination du sucre lié aux flavonols aglycones a été réalisée en accord avec les précédentes études sur le genre botanique *Rhamnus* (Marzouk et al., 1999) ainsi que sur la spectrométrie de masse appliquée aux flavonoïdes glycosylés (Smith et al., 1971 ; Schels et al., 1977 ; Lin et Harnly, 2007). Les parties sucres des flavonols glycosylés présents dans différentes espèces de *Rhamnus* et décrites dans la littérature (Satake et al., 1993) sont le *O*-rhamninoside (*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-*O*-β-D-galactopyranoside) et le *O*-acétyl-rhamninoside (*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-(4-*O*-acétyl)-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-*O*-β-D-galactopyranoside). Les temps de rétention (t_R), les longueurs d'onde des maxima d'absorption (λ_{max}), les pics moléculaires en modes positif et négatif $[M+H]^+/[M-H]^-$ et les principaux ions fragments dont ceux correspondants aux composés aglycones $[A+H]^+$ sont listés dans le **tableau 2.2**.

Tableau 2.2. Données chromatographiques des flavonols glycosylés.

n°	t _R (min)	UV λ _{max} (nm)	[M+H] ⁺ / [M-H] ⁻ (m/z)	ions fragments en mode positif (m/z)	identification
1	28,2	204, 256, 358	757/755	611, 465, 303	3- <i>O</i> -rhamninoside de quercétine
2	28,9	196, 265, 347	742/740	595, 449, 287	3- <i>O</i> -rhamninoside de kaempférol
3	29,2	205, 256, 358	771/769	625, 479, 317	3- <i>O</i> -rhamninoside de isorhamnétine
4	29,5	203, 255, 364	758/756	757, 611, 465, 303	4'- <i>O</i> -rhamninoside de quercétine
5	30,0	197, 267, 351	783/781	637, 449, 287	3- <i>O</i> -acétyl-rhamninoside de kaempférol
6	30,1	196, 267, 364	741/739	595, 449, 287	4'- <i>O</i> -rhamninoside de kaempférol
7	30,5	205, 257, 358	771/769	625, 479, 317	3- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnétine
8	31,3	197, 267, 347	755/753	609, 463, 301	3- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnocitrine
9	31,6	205, 256, 356	785/783	639, 493, 331	3- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnazine
10	32,0	203, 254, 367	771/769	625, 479, 317	4'- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnétine
11	32,4	196, 267, 349	797/795	651, 463, 301	3- <i>O</i> -acétyl-rhamninoside de rhamnocitrine
12	32,5	196, 268, 364	755/753	609, 463, 301	4'- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnocitrine
13	32,7	205, 256, 358	827/825	681, 493, 331	3- <i>O</i> -acétyl-rhamninoside de rhamnazine

Le procédé d'identification peut être illustré par le composé **7** (t_R 30,5 min). Les ions [M+H]⁺/[M-H]⁻ m/z 771/769, [A+H]⁺ m/z 317 (perte du glycosyle, masse correspondant à la rhamnétine), ainsi que les ions fragments en mode positif m/z 625 (perte d'un rhamnosyle) et m/z 479 (perte de deux rhamnosyles) suggèrent, en accord avec la théorie précédemment décrite sur l'effet hypsochrome, que ce composé correspond au 3-*O*-rhamninoside de rhamnétine (**Figure 2.22**). À noter que la spectrométrie de masse en mode négatif a permis de déterminer la masse molaire du composé, et le mode positif a rendu possible l'identification de la partie glycosylée ainsi que l'aglycone, grâce à une meilleure ionisation des composés.

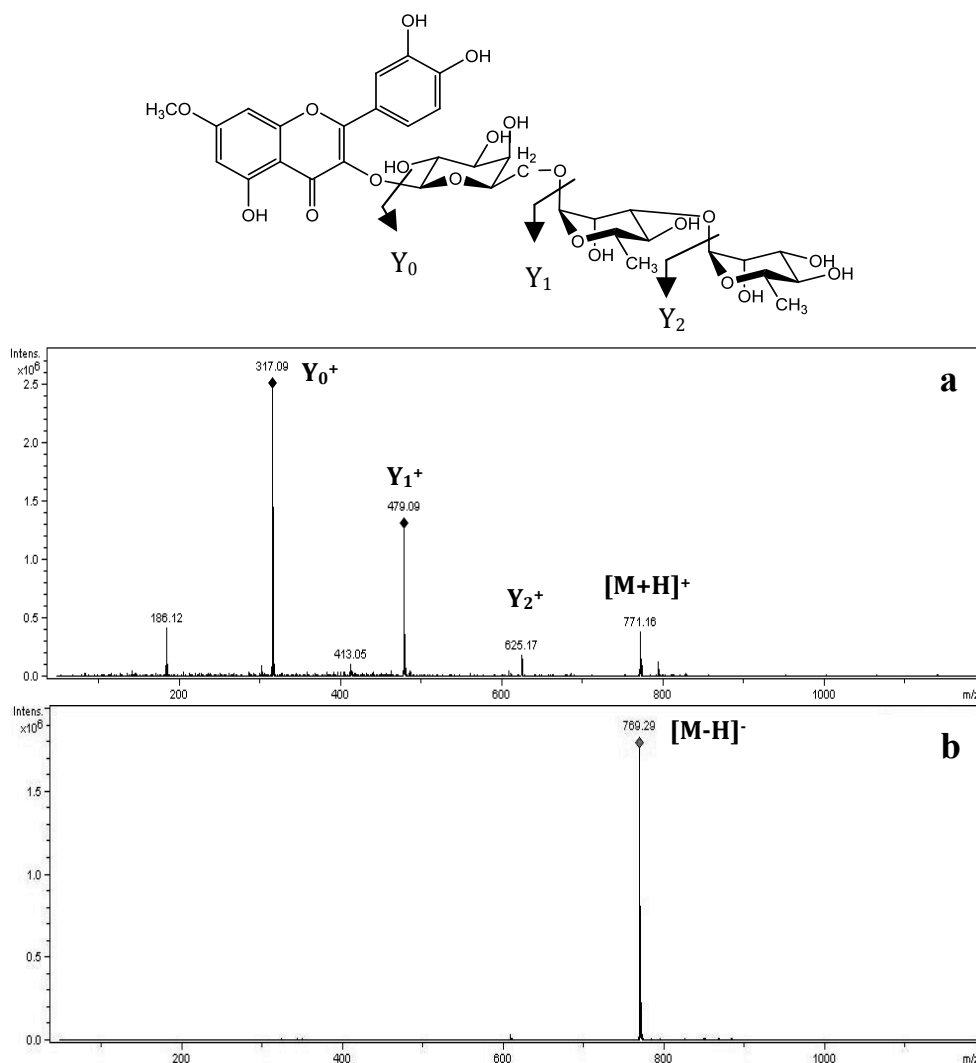


Figure 2.22. Schéma de fragmentation et spectre de masse, en mode positif (a) et négatif (b), du 3-O-rhamnoside de rhamnétine.

Le composé **4** possède des ions $[M+H]^+/[M-H]^-$ à m/z 757/755 et un ion fragment correspondant à la molécule aglycone $[A+H]^+$ m/z 303 représentant un *O*-rhamnoside de quercétine. Ses données spectroscopiques UV-Visible (203, 255 et 364 nm) ainsi que son temps de rétention permettent de conclure que la partie glycosidique est localisée en position 4'. Ce composé est donc identifié comme étant le 4'-*O*-rhamnoside de quercétine. Les autres composés contenant la partie rhamnoside sont le 3-*O*-rhamnoside de quercétine (**1**), le 3-*O*-rhamnoside de kaempférol (**2**), le 3-*O*-rhamnoside d'isorhamnétine (**3**), le 4'-*O*-rhamnoside de kaempférol (**6**), le 3-*O*-rhamnoside de rhamnocitrine (**8**), le 3-*O*-rhamnoside de rhamnazine (**9**) et le 4'-*O*-rhamnoside de rhamnocitrine (**12**).

De la même manière, le composé **5** a été identifié à un dérivé 3-*O*-rhamninoside de kaempférol où les ions $[M+H]^+/[M-H]^-$ et $[A+H]^+$ correspondent respectivement à m/z 783/781 et 287 et les ions fragments en mode positif obtenus sont m/z 637 et m/z 449. La différence de masse entre la première et la deuxième fragmentation ($\Delta 188$) correspondant à la perte d'un rhamnosyle et d'un groupement acétyle. Ce flavonol a été identifié au 3-*O*-acétyl-rhamninoside de kaempférol précédemment cité dans différentes études sur le genre *Rhamnus* (Satake et al., 1993 ; Marzouk et al., 1999).

Dans le même sens, les composés **11** et **13** ont été identifiés respectivement au 3-*O*-acétyl-rhamninoside de rhamnocitrine et au 3-*O*-acétyl-rhamninoside de rhamnazine.

II.1.2. Identification des anthraquinones

II.1.2.1. Mise en place des conditions d'extraction en phase solide (SPE)

Les fruits matures de *Rhamnus* contiennent différentes familles de composés : les flavonols, les anthocyanes et les anthraquinones. Comme le montre l'analyse chromatographique sur un extrait de fruits matures de *Rh. purshianus* (**Figure 2.23**), les anthraquinones sont éluées après les flavonols. De plus, au contraire des flavonols, la faible quantité d'anthraquinones ne permet pas l'identification et la quantification directe de ces derniers. Nous avons donc été conduits à les concentrer.

On peut noter que le chromatogramme a été obtenu à 250 nm, longueur d'onde intermédiaire et non spécifique des flavonols et des anthraquinones, permettant d'observer les deux populations de composés sur un même chromatogramme.

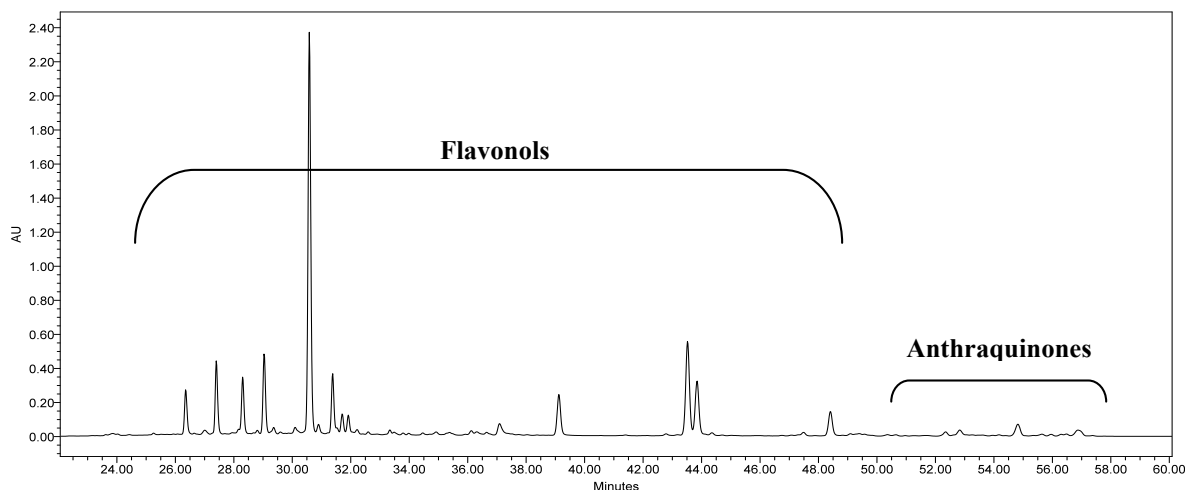


Figure 2.23. Chromatogramme à 250 nm des fruits matures de *Rhamnus purshianus*.

L'ensemble des composés polyphénoliques, après avoir été extraits dans un mélange méthanol-eau, ont été soumis à une extraction sur phase solide (SPE). Cette opération a pour but de purifier sélectivement et de concentrer les composés anthraquinoniques.

Les analyses SPE/CLHP/UV-Visible ont été effectuées sur les trois espèces de *Rhamnus* présentes dans notre région (*Rh. saxatilis*, *Rh. catharticus* et *Rh. alaternus*) ainsi que sur des espèces de provenance diverses.

II.1.2.2. Caractérisation de molécules

La fraction anthraquinonique, extraite à partir des fruits matures de *Rh. alaternus* et isolée par SPE a été étudiée par CLHP. L'analyse RMN des différentes fractions a permis d'identifier trois nouvelles anthraquinones acétyl-glycosides : le 6-*O*-(2'-acétyl)-arabinopyranoside d'émodyne, le 6-*O*-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne et le 6-*O*-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne.

De plus, l'analyse RMN a également été effectuée sur la molécule standard d'émodyne (afin de vérifier l'identification de l'aglycone) ainsi que sur deux analytes : le 6-*O*-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émodyne identifié dans *Rh. napalensis* (Mai et al., 2001) et le 6-*O*-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émodyne identifié dans *Rh. prinoides* (Abegaz et Peter, 1995) et *Rh. napalensis* (Mai et al., 2001). Les structures chimiques de ces composés sont présentées dans la **figure 2.24**.

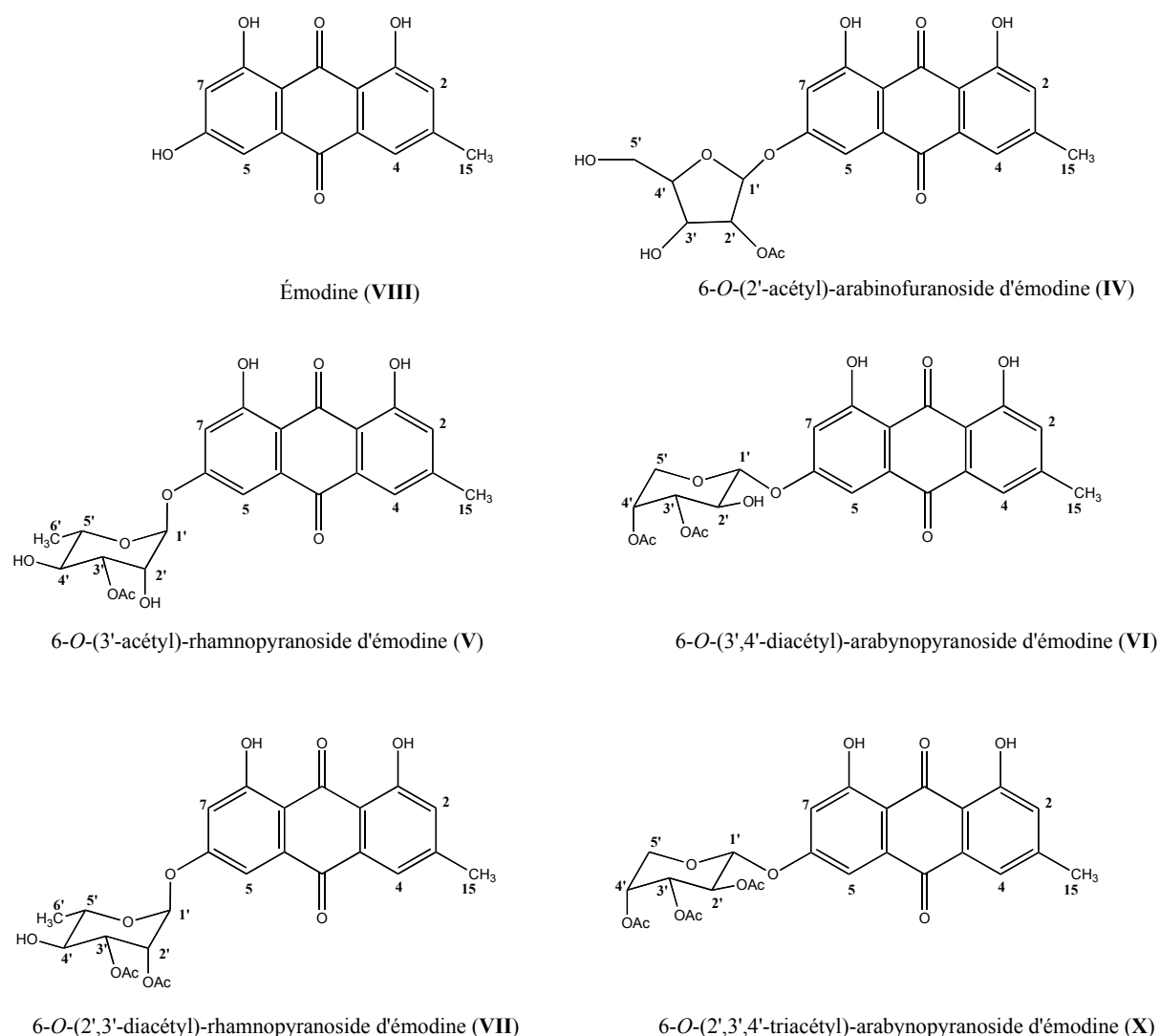


Figure 2.24. Structure des composés caractérisés par RMN.

II.1.2.2.1. Émodine (VIII)

Les données RMN ^1H de l'émodyne (**Tableau 2.3**) décrivent deux signaux à δ_{H} 7,12 ppm (1H) et 7,60 ppm (1H) correspondants aux protons aromatiques 2 et 4 et apparaissant respectivement sous forme d'un multiplet et d'un doublet large du fait du couplage aromatique *mé*ta entre eux (1 Hz) et d'un couplage ^4J (0,7 Hz) avec le groupement méthyle 15. De la même manière, deux signaux à δ_{H} 6,55 ppm (1H, *d*, $J = 2,3$ Hz) and 7,20 ppm (1H, *d*, $J = 2,7$ Hz) correspondant respectivement aux protons aromatiques 5 et 7, apparaissent sous forme de deux doublets dû au couplage aromatique en *mé*ta entre eux. Enfin, le groupement

méthyle 15 en position 3 sur le cycle aromatique apparaît à δ_H 2,45 ppm (3H) sous forme d'un pseudo-triplet à cause des couplages 4J (0,7 Hz) avec les deux protons aromatiques 2 et 4.

II.1.2.2.2. 6-O-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émodyne (IV)

Les analyses RMN 1H , COSY et NOESY ont été réalisées sur ce composé. Les données RMN 1H (**Tableau 2.3**) décrivent la partie émodine, avec les quatre protons aromatiques 2, 4, 5 et 7 ainsi que le groupement méthyle 15. La partie hexose a été observée avec des signaux caractéristiques compris entre δ_H 3,80 et 5,31 ppm. Le déplacement chimique de proton anomérique 1' peut être déterminé par la présence d'une tache de corrélation NOE entre les protons 5 (δ_H 7,38 ppm) et 7 (δ_H 6,88 ppm) de la partie émodine avec un signal à δ_H 5,30 ppm sous forme d'un singulet. Le signal fortement déblindé à δ_H 5,31 ppm peut être dû à la présence d'un groupement acétate en position *alpha*, dont le signal sous forme d'un singulet intégrant pour 3 protons est observé à δ_H 2,10 ppm. Le signal à δ_H 5,31 ppm présent sous forme d'un doublet (4,0 Hz) est couplé avec un proton à δ_H 3,87 ppm apparaissant sous forme de multiplet sur le spectre RMN 1H . Cette valeur de couplage de 4,0Hz semble être d'une valeur intermédiaire par rapport aux valeurs de couplages caractéristiques d'une structure pyranose entre protons axiaux/équatoriaux $^3J_{H_{eq}-H_{eq}}$ / $^3J_{H_{ax}-H_{eq}}$ (~2 Hz) et $^3J_{H_{ax}-H_{ax}}$ (~9 Hz) laissant plutôt supposer des couplages entre protons d'une structure furanose.

Un dernier enchaînement est observé entre les signaux situés à δ_H 4,00 et 3,83 ppm apparaissant sous forme de deux doublets de doublets avec des constantes de couplages respectivement de 12,4-3,5Hz et 12,3-1,8 Hz pouvant correspondre à deux protons géminés d'un groupement CH_2OH terminal (5'). Le spectre de RMN COSY montre que ce méthylène 5' est couplé avec un proton à 3,95 ppm (4') apparaissant sous forme d'un triplet dédoublé (3,5 et 1,9 Hz). La dernière constante J 3,5 Hz du proton 4' peut correspondre à un couplage avec le signal apparaissant sous forme d'un multiplet à 3,87 ppm (3'). Puisque le proton 3' est couplé avec le signal à 5,31 ppm sous forme de doublet, celui-ci peut donc correspondre au proton 2'. Les taches de corrélations observées sur les spectres RMN COSY/NOESY peuvent confirmer cet enchaînement de différents protons pouvant correspondre à une structure 2'-acétyl-arabinofuranoside, mais la configuration de chaque carbone présent dans la partie sucre n'a pas pu être déterminée.

Enfin, la tache de corrélation NOE entre le proton anomérique 1' et les protons 5 et 7 montre que la partie sucre est bien liée à l'aglycone en position 6. Le composé **IV** peut correspondre au 6-*O*-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émodyne.

Tableau 2.3. Données RMN de l'émodyne et du 6-*O*-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émodyne.

N°	Émodyne	6- <i>O</i> -(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émodyne		
	¹ H (δ) <i>J</i> (Hz)	¹ H (δ) <i>J</i> (Hz)	COSY	NOESY
1	-	-	-	-
2	7,12 (<i>ls</i>)	7,16 (<i>m</i>)	4	15
3	-	-	-	-
4	7,60 (<i>ld</i> ; 1,0)	7,64 (<i>m</i>)	-	15
5	7,20 (<i>d</i> ; 2,7)	7,38 (<i>d</i> ; 2,4)	7	1'
6	-	-	-	-
7	6,55 (<i>d</i> ; 2,3)	6,88 (<i>d</i> ; 2,4)	5	1'
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	2,45 (<i>lt</i> ; 0,7)	2,46 (<i>t</i> ; 0,8)	2, 4	2, 4
<i>Arabinosyle</i>				
1'	-	5,30 (<i>s</i>)	-	5, 7
2'	-	5,31 (<i>d</i> ; 4,0)	3'	3'
3'	-	3,87 (<i>m</i>)	2', 4'	2', 4'
4'	-	3,95 (<i>td</i> ; 3,5-1,9)	5'a, 5'b	3'
5'	a	4,00 (<i>dd</i> ; 12,4-3,5)	4', 5'b	3', 5'b
	b	3,83 (<i>dd</i> ; 12,3-1,8)	4', 5'a	4', 5'a
COCH ₃	-	2,10 (<i>s</i>)	-	-

II.1.2.2.3. 6-*O*-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne (**VI**)

Les données RMN ¹³C du composé **VI** (Tableau 2.4) montrent cinq signaux correspondant aux carbones aromatiques de la partie anthraquinone, un méthyle, un méthylène et quatre méthines. Les données RMN ¹H (Tableau 2.4) décrivent la partie émodyne, avec les quatre protons aromatiques 2, 4, 5 et 7 ainsi que le groupement méthyle 15.

De plus, la partie hexose a été observée avec des signaux caractéristiques compris entre δ_H 3,99 et 5,34 ppm. Le proton anomérique 1' de la partie sucre peut correspondre au doublet à δ_H 5,24 ppm (1H, 7 Hz) et au signal à δ_C 98,6 ppm sur le spectre RMN ^{13}C . Les figures de couplages observées sur le spectre RMN 1H et les corrélations 3J 1H - 1H du spectre RMN COSY permettent de déterminer l'enchaînement des différents groupes méthines du sucre. Les protons 1', 2' (δ_H 3,99 ppm) et 3' (δ_H 5,08 ppm) sont en position axiale à cause de la présence de constante de couplage (7,0 à 9,5 Hz) caractéristiques 3J H_{ax} - H_{ax} . En revanche, la constante de couplage entre les protons 4' et 3', d'environ 3 Hz, est caractéristique d'un couplage 3J H_{ax} - H_{eq} , d'où la position équatoriale du proton 4'. Les deux derniers signaux observés à δ_H 4,09 ppm et 4,03 ppm sur le spectre RMN 1H apparaissent sous forme d'une même tache de corrélation négative (CH_2) sur le spectre HSQC à δ_C 64,4 ppm ; ces signaux correspondent au groupement méthylène 5' sous forme de doublet de doublet avec une constante de couplage géminé $^2J_{gem}$ de 12,9 Hz et de constantes 3J H_{eq} - H_{eq} (2,0 Hz) et 3J H_{ax} - H_{eq} (3,0 Hz) avec le proton 4'. De plus, la présence de taches de corrélation observées sur le spectre RMN NOESY montrent bien que les protons 1', 3', 4' et un des protons du groupement méthylène 5' sont du même côté du plan. La résonance des protons 3' et 4' à δ_H 5,08 ppm et 5,34 ppm est caractéristique d'un déblindage d'environ 1,4 ppm provoqué par une acétylation des fonctions hydroxyles géminés. La partie sucre peut correspondre au 3',4'-diacétyl-arabinopyranose.

Sur le spectre RMN 1H , deux derniers signaux apparaissent sous forme de singulet intégrant pour trois protons chacun à δ_H 2,13 ppm et 2,07 ppm. Ces déplacements chimiques en RMN 1H et le signal observé en RMN ^{13}C à δ_C 172,0 ppm sont caractéristiques des groupements acétates. Enfin, le déblindage observé sur le spectre RMN 1H des deux protons aromatiques 5 et 7 respectivement de 0,25 et 0,30 ppm par rapport à l'émodine ainsi que la présence de taches de corrélation entre les protons aromatiques 5, 7 et le proton anomérique sur le spectre RMN NOESY permettent de confirmer que la partie sucre se trouve liée à la partie émodine au niveau de la fonction hydroxyle en position 6. Le composé **VI** a donc été identifié au 6-*O*-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émodine.

Tableau 2.4. Données RMN du 6-O-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne.

N°	6-O-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne			
	¹³ C (δ)	¹ H (δ) J (Hz)	COSY	NOESY
1	-	-	-	-
2	125,2 (CH)	7,16 (<i>ls</i>)	4, 15	15
3	-	-	-	-
4	121,9 (CH)	7,64 (<i>ls</i>)	2, 15	15
5	109,7 (CH)	7,45 (<i>d</i> ; 2,3)	7	1'
6	-	-	-	-
7	110,3 (CH)	6,94 (<i>d</i> ; 2,3)	5	1'
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	21,9 (CH ₃)	2,46 (<i>ls</i>)	2, 4	2, 4
	-	-	-	-
<i>Arabinosyle</i>				
1'	101,3 (CH)	5,27 (<i>d</i> 7,0)	2'	5, 7, 3', 5'
2'	69,4 (CH)	3,99 (<i>dd</i> ; 9,5-7,0)	1', 3'	3'
3'	73,5 (CH)	5,08 (<i>dd</i> ; 9,5-3,7)	2', 4'	1', 4', 5'
4'	69,1 (CH)	5,34 (<i>m</i>)	3', 5'	3', 5'
5'	a	4,04 (<i>dd</i> ; 13,0-2,7)	4'	1', 3', 4'
	b	4,01 (<i>dd</i> ; 13,0-2,0)		
COCH ₃	20,7; 172,0	2,13 (<i>s</i>)	-	-
COCH ₃	20,7; 172,0	2,07 (<i>s</i>)	-	-

II.1.2.2.4. 6-O-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne (X)

Les données RMN ¹H et ¹³C (**Tableau 2.5**) du composé **X** sont également très proches des composés **IV** et **VI** au niveau de l'émodyne et de la partie arabinoside. La seule différence est la résonance du proton 2' à δ_H 5,39 ppm, correspondant à un déblindage d'environ 1,4 ppm provoqué par une acétylation de la fonction hydroxyle géminée. On peut remarquer que par rapport au composé précédent qui n'avait pas de groupement acétate sur la fonction hydroxyle en position 2', les protons 1' et 3' sont blindés (~ 0,20 ppm). Ces déplacements chimiques pourraient être dûs à la gêne stérique provoquée par l'acétate sur les atomes de carbone situés en position *gamma*. A noter qu'un début de dégradation du composé n'a pas

permis son analyse RMN NOESY. Le composé **X** a été identifié au 6-*O*-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émidine.

Tableau 2.5. Données RMN du 6-*O*-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émidine.

N°	6- <i>O</i> -(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émidine		
	¹³ C (δ)	¹ H (δ) <i>J</i> (Hz)	COSY
1	-	-	-
2	125,3 (CH)	7,16 (<i>m</i>)	4-15
3	-	-	-
4	121,8 (CH)	7,64 (<i>m</i>)	2
5	109,4 (CH)	7,38 (<i>d</i> ; 2,7)	7
6	-	-	-
7	110,3 (CH)	6,90 (<i>d</i> ; 2,3)	5
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	22,0 (CH ₃)	2,46 (<i>t</i> ; 0,8)	-
<i>Arabinosyle</i>			
1'	98,6 (CH)	5,51 (<i>d</i> ; 7,0)	2'
2'	69,7 (CH)	5,39 (<i>dd</i> ; 9,4, 6,7)	1'-3'
3'	71,0 (CH)	5,29 (<i>dd</i> ; 9,4, 3,7)	2'-4'
4'	68,7 (CH)	5,37 (<i>dd</i> ; 3,3, 2,0)	3'-5'
5'	a	4,09 (<i>dd</i> ; 12,9, 3,0)	4'
	b	4,03 (<i>dd</i> ; 12,9, 2,0)	
COCH ₃	20,6; 171,8	2,15 (<i>s</i>)	-
COCH ₃	20,5; 171,3	2,08 (<i>s</i>)	-
COCH ₃	20,4; 171,5	2,04 (<i>s</i>)	-

II.2.2.2.5. 6-*O*-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émidine (**VII**)

Les données RMN ¹H et ¹³C du composé **VII** (Tableau 2.6) montrent une partie émidine, avec la présence caractéristique des quatre protons aromatiques 2, 4, 5, 7 et du groupement méthyle 15. Dans la partie sucre, le signal à δ_H 5,75 ppm (1H, d, 1,0 Hz) et à δ_C 96,7 ppm peut correspondre au proton anomérique 1'. Cette faible constante de couplage (1,0 Hz) entre les protons 1' et 2' est caractéristique de couplages ³J H_{eq}-H_{eq} ou ³J H_{ax}-H_{eq}. Le proton 4' (δ_H 3,62) apparaît sous forme de pseudo-triplet avec des constantes de couplage avec

les protons 3' et 5' de l'ordre de 10 Hz, caractéristiques d'un couplage $^3J_{H_{ax}-H_{ax}}$; les protons 3', 4' et 5' sont donc en position axiale. La faible constante de couplage d'environ 3,5 Hz observée entre les protons 2' et 3' montre que le proton 2' ne peut être qu'en position équatoriale. L'absence de tache de corrélation sur le spectre RMN NOESY entre le proton 1' et les protons 3', 4', 5' indique que le proton 1' est en position équatoriale. Le spectre RMN COSY montre une tache de corrélation $^1H-^1H$ entre le proton 5' à δ_H 3,62 ppm et un signal à δ_H 1,37 ppm pouvant correspondre à un groupement méthyle 6'. Des taches de corrélation sont observées sur le spectre RMN NOESY entre les signaux de ce groupement méthyle 6' et les protons 5' et 4', confirmant la position équatoriale du groupement méthyle 6'. Le déplacement chimique du proton 4' à δ_H 3,62 ppm montre que celui-ci est porté par un atome de carbone ayant une fonction hydroxyle contrairement aux protons 2' et 3' déblindés respectivement à δ_H 5,43 ppm et 5,25 dû à l'acétylation de leur fonction hydroxyle. La partie sucre peut correspondre au 2',3'-diacétyl-rhamnopyranose.

Le déblindage observé sur le spectre RMN 1H des deux protons aromatiques 5 et 7 respectivement de +0,29 et 0,44 ppm par rapport à l'émidine ainsi que la présence de taches de corrélation entre les protons aromatiques 5, 7 et le proton anomérique sur le spectre RMN NOESY permettent de confirmer que la partie sucre se trouve liée à la partie émidine au niveau de la fonction hydroxyle en position 6. Le composé **VII** a été identifié au 6-*O*-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émidine (Abegaz et Peter, 1995 ; Mai et al., 2001).

Tableau 2.6. Données RMN 6-O-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émودية.

N°	6-O-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émودية			
	¹³ C (δ)	¹ H (δ) J (Hz)	COSY	NOESY
1	-	-	-	-
2	125,1 (CH)	7,16 (<i>ls</i>)	4, 15	15
3	-	-	-	-
4	121,8 (CH)	7,64 (<i>ls</i>)	2, 15	15
5	109,8 (CH)	7,49 (<i>d</i> ; 2,0)	7	1'
6	-	-	-	-
7	110,5 (CH)	6,98 (<i>d</i> ; 2,0)	5	1'
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	22,2 (CH ₃)	2,46 (<i>ls</i>)	-	2-4
<i>Rhamnosyle</i>				
1'	96,7 (CH)	5,75 (<i>d</i> ; 1,0)	2'	5, 7, 2'
2'	70,1 (CH)	5,43 (<i>dd</i> ; 3,3-1,7)	1', 3'	1', 3'
3'	-	5,25 (<i>dd</i> ; 10,0-3,7)	2', 4'	2', 5'
4'	-	3,62 (<i>t</i> ; 9,7)	3', 5'	6'
5'	-	3,74 (<i>dq</i> ; 9,7-6,2)	4', 6'	3', 6'
6'	-	1,37 (<i>d</i>)	5'	4', 5'
COCH ₃	20,5	2,16 (<i>s</i>)	-	-
COCH ₃	20,5	2,06 (<i>s</i>)	-	-

II.1.2.2.6. 6-O-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émودية (V)

Les données RMN ¹H (**Tableau 2.7**) du composé **V** sont très proches de celles du composé **VII** au niveau de l'émودية et de la partie rhamnoside. La seule différence est le blindage du proton 2' d'environ 1,2 ppm montrant la non-acétylation de cette position. Enfin, la tache de corrélation NOE entre le proton anomérique 1' et les protons 5 et 7 montre que la partie sucre est bien en position 6. Le composé **V** a été identifié au 6-O-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émودية (Mai et al., 2001).

Tableau 2.7. Données RMN du 6-O-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émidine.

N°	6-O-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émidine		
	¹ H (δ) J (Hz)	COSY	NOESY
1	-	-	-
2	7.16 (m)	4, 15	15
3	-	-	-
4	7.64 (m)	2, 15	15
5	7.50 (d; 2,6)	7	1'
6	-	-	-
7	6.98 (d; 2,4)	5	1'
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	2.47 (t; 0,6)	2, 4	4
<i>Arabinosyle</i>			
1'	5.66 (d; 2,1)	2'	5, 7, 2'
2'	4,22 (d; 1,4)	1', 3'	1', 3'
3'	5,12 (dd; 9,3, 3,4)	2', 4'	2', 4', 5'
4'	3,68 (m)	3', 6'	6'
5'	a b	3', 6'	3', 6'
6'	1,28 (d; 6,0)	4', 5'	4', 5'
COCH ₃	2.16 (s)	-	-

L'ensemble des résultats obtenus sur les anthraquinones présentes au sein des fruits matures de *Rhamnus spp.* est récapitulé dans le **tableau 2.8**.

Tableau 2.8. Données chromatographiques des anthraquinones présents dans les *Rhamnus*.

n°	t _R (min)	UV λ _{max} (nm)	[M+H] ⁺ / [M-H] ⁻ (m/z)	ions fragments en mode positif (m/z)	identification
I	29,7	224, 264, 434	417/415	271, 229	franguline A
II	30,6	224, 264, 436	403/401	271, 229	franguline B
III	32,4	194, 225, 257, 287, 429	271/269	229	aloe-émودية
IV	35,6	191, 224, 263, 434	445/443	271, 175	6-O-(2'-acétyl)- arabinofuranoside d'émودية
V	41,2	224, 264, 437	459/457	271, 189	6-O-(3'-acétyl)- rhamnopyranoside d'émودية
VI	50,8	224, 262, 436	487/485	-	6-O-(3',4'-diacétyl)- arabinopyranoside d'émودية
VII	59,2	191, 224, 263, 430	501/499	-	6-O-(2',3'-diacétyl)- rhamnopyranoside d'émودية
VIII	61,0	222, 289, 441	271/269	229	émودية
IX	62,6	197, 225, 257, 288, 429	255/253	-	chrysophanol
X	66,8	224, 262, 432	529/527	-	6-O-(2',3',4'-triacétyl)- arabinopyranoside d'émودية
XI	71,9	223, 267, 287, 436	-/-	-	pariétine

II.1.3. Analyse des extraits de *Rhamnus*

II.1.3.1. Comparaison chimique de trois espèces de *Rhamnus*

II.1.3.1.1. Étude des flavonols

La composition chimiques des fruits immatures de trois espèces de *Rhamnus* (*Rh. saxatilis*, *Rh. catharticus* et *Rh. alaternus*), employés anciennement dans le procédé de fabrication du jaune d'Avignon, a été étudiée et comparée par CLHP/UV-Visible à 350 nm (Figure 2.25).

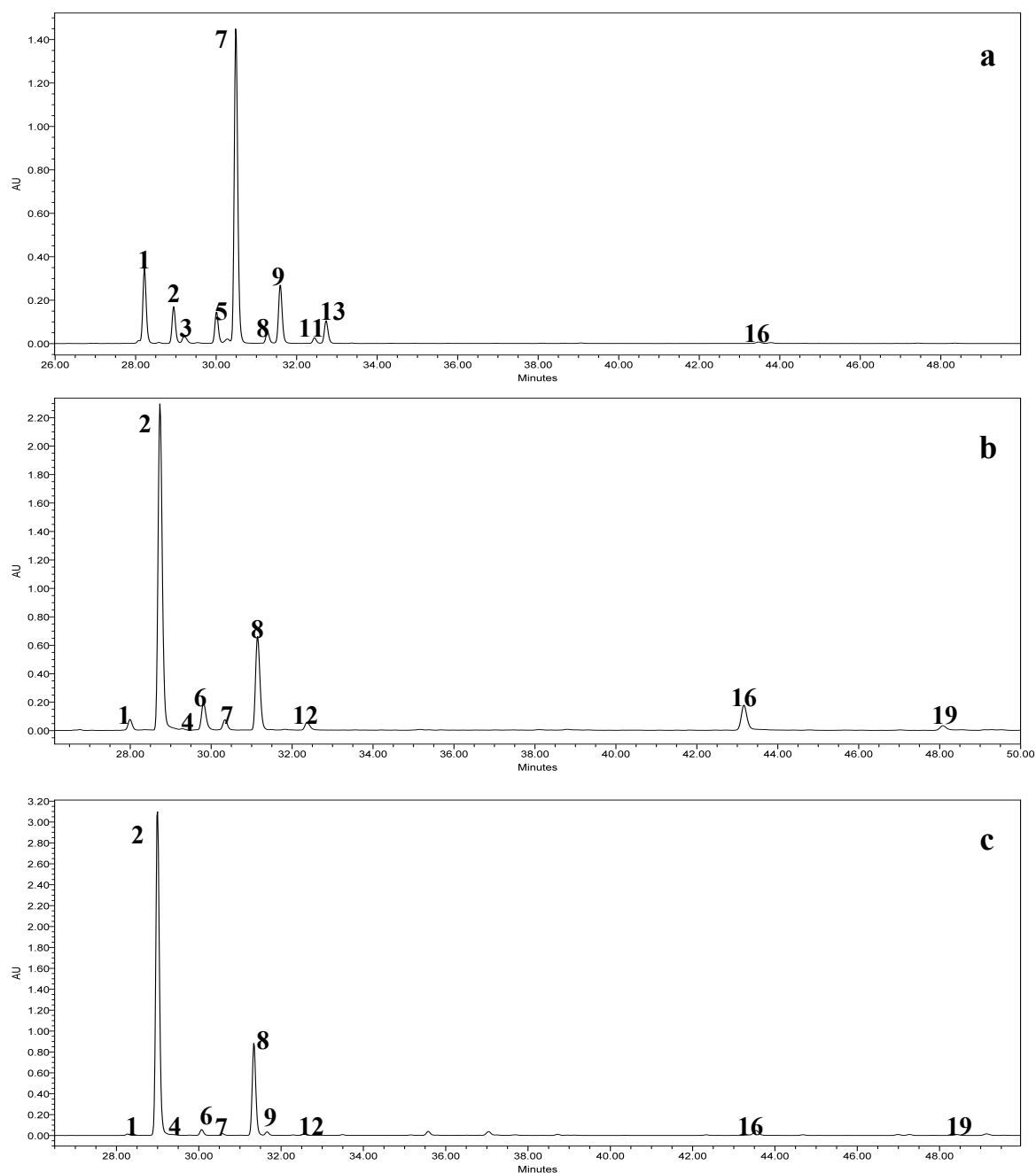


Figure 2.25. Chromatogrammes CLHP/UV-Visible, à 350 nm, des fruits immatures de *Rh. saxatilis* (a), *Rh. catharticus* (b) et *Rh. alaternus* (c).

Les extraits présentent principalement des composés glycosylés et des traces d'aglycones, comme le kaempférol (16) et la rhamnocitrine (19). L'espèce *Rh. saxatilis* (Figure 2.25a) peut être chimiquement caractérisée par la présence de dérivés 3-*O*-acétyl-rhamninoside comme les composés 5, 11 et 13. A l'opposé de cette espèce, les extraits obtenus à partir de *Rh. catharticus* (Figure 2.25b) et *Rh. alaternus* (Figure 2.25c) ne contiennent pas, du moins en quantité détectable, ces composés caractéristiques.

Les espèces *Rh. catharticus* et *Rh. alaternus* contiennent des flavonols *O*-rhamninoside liés en position 3 et en position 4' comme le 4'-*O*-rhamninoside de quercétine (**4**), le 4'-*O*-rhamninoside de kaempférol (**6**) le 4'-*O*-rhamninoside de rhamnétine (**10**) (à l'état de traces) et le 4'-*O*-rhamninoside de rhamnocitrine (**12**). La composition chimique en flavonol ne permet pas de distinguer les espèces *Rh. catharticus* et *Rh. alaternus*. De plus, on peut ajouter que le 3-*O*-rhamninoside d'isorhamnétine (**3**) n'est présent que dans l'espèce *Rh. saxatilis*.

Après la comparaison qualitative des trois espèces, des fruits immatures de *Rhamnus* de provenances diverses ont été analysés et le pourcentage relatif de chaque composé est présenté dans le **tableau 2.9**. Les espèces *Rh. saxatilis* et *Rh. alaternus* ont été récoltées à Caumont-sur-Durance et au Mont Ventoux, alors que les échantillons certifiés de *Rh. catharticus* proviennent de Pologne, de Hongrie et d'Allemagne. Le pourcentage relatif des composés identifiés dans les échantillons ne varie que très légèrement pour chaque espèce. On peut noter une différence entre les échantillons de *Rh. saxatilis* (Caumont et Mont Ventoux) pour le 3-*O*-rhamninoside de kaempférol (**2**), le 3-*O*-rhamninoside de rhamnétine (**7**) et le 3-*O*-rhamninoside de rhamnocitrine (**8**), sûrement dû à leur provenance. Enfin, la quercétine (**14**) a été identifiée dans l'échantillon de *Rh. alaternus* du Mont Ventoux et non dans celui de Caumont. Ceci peut être dû à une différence de maturité des deux échantillons et/ou aux conditions du milieu (sol, climat...).

Tableau 2.9. Composition et pourcentage relatif en flavonols pour les différents *Rhamnus*.

Composés	<i>Rh. saxatilis</i> (%)		<i>Rh. catharticus</i> (%)			<i>Rh. alaternus</i> (%)	
	Caumont	Mt Ventoux	Pologne	Hongrie	Allemagne	Caumont	Mt Ventoux
3- <i>O</i> -rhamninoside de quercétine (1)	12,14	3,75	1,98	0,71	4,31	0,24	1,62
3- <i>O</i> -rhamninoside de kaempférol (2)	6,12	34,24	62,70	51,41	62,46	73,94	74,16
3- <i>O</i> -rhamninoside d'isorhamnétine (3)	1,25	0,57	-	-	-	-	-
4'- <i>O</i> -rhamninoside de quercétine (4)	- ^b	-	tr. ^a	tr.	tr.	tr.	0,14
3- <i>O</i> -acétyl-rhamninoside de kaempférol (5)	5,41	5,94	-	-	-	-	-
4'- <i>O</i> -rhamninoside de kaempférol (6)	-	-	5,35	1,65	1,33	1,08	1,91
3- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnétine (7)	56,81	13,76	1,91	7,84	4,91	0,35	1,43
3- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnocitrine (8)	1,85	24,06	19,48	28,45	12,80	20,10	12,80
3- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnazine (9)	10,74	12,16	tr.	0,40	0,37	0,65	1,89
4'- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnétine (10)	-	-	tr.	-	0,01	0,01	-
3- <i>O</i> -acétyl-rhamninoside de rhamnocitrine (11)	0,85	2,68	-	-	-	-	-
4'- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnocitrine (12)	-	-	1,80	0,85	0,11	0,29	0,69
3- <i>O</i> -acétyl-rhamninoside de rhamnazine (13)	3,98	1,13	-	-	-	-	-
quercétine (14)	-	-	-	-	-	-	0,80
kaempférol (16)	0,33	1,09	5,44	6,27	6,87	1,28	3,89
rhamnocitrine (19)	0,08	0,42	0,93	2,15	0,65	0,24	0,33

^a Composé à l'état de traces^b Composé non identifié

Puisque l'étude de la partie hétérosidique ne permet pas de différencier *Rh. catharticus* de *Rh. alaternus*, nous nous sommes intéressés à la fraction aglycone de ces baies immatures. En effet, chaque molécule aglycone est présente sous différentes formes hétérosidiques en fonction de la position du sucre et/ou de la nature de celui-ci. De plus, chacune des espèces étudiées possède un degré de maturité différent. Aussi, étudier la population aglycone revient donc peut être à simplifier cette étude.

Les trois espèces botaniques de *Rhamnus* ont été traitées par une solution d'acide trifluoroacétique portée à ébullition durant 1h afin de provoquer l'hydrolyse totale des précurseurs. Cette expérience a donc pour but de rompre la liaison chimique entre l'aglycone et la partie sucre afin de libérer les aglycones présents dans les extraits et d'identifier leur structure.

L'étude chromatographique des différents extraits de *Rhamnus* montre les principaux flavonols aglycones (**Figure 2.26**). Chacun d'entre eux a été clairement identifié en comparaison avec les standards commerciaux, par son temps de rétention, son spectre UV/Visible, son pic moléculaire en mode positif et négatif $[M+H]^+/[M-H]^-$, et enfin par les ions fragments en mode positifs.

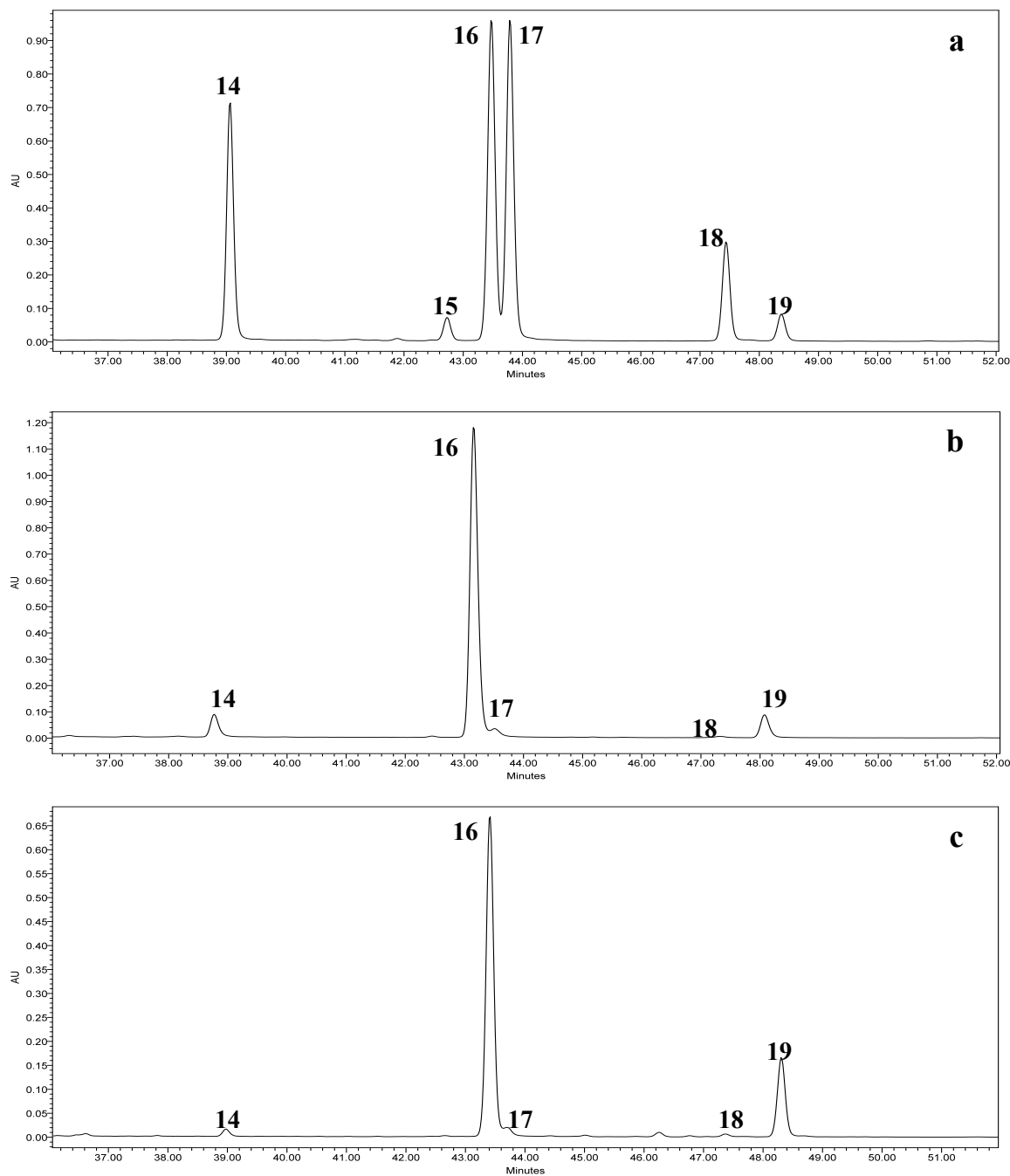


Figure 2.26. Agrandissement des chromatogrammes CLHP/UV-Visible à 350 nm des fruits immatures de *Rhamnus hydrolysés* : *R. saxatilis* (a), *R. catharticus* (b) et *R. alaternus* (c).

Après hydrolyse, tous les composés glycosylés sont transformés en leur aglycone respectif. Donc, dans ces conditions expérimentales, aucun précurseur glycosylé n'est détecté par CLHP/UV-Visible. Les trois espèces contiennent les mêmes molécules aglycones (**Figure 2.26**) excepté pour *Rh. alaternus* et *Rh. catharticus* où on peut noter l'absence de

l'isorhamnétine (**15**). Sur le chromatogramme obtenu à 350 nm, le rapport d'aire de pic entre le kaempferol (**16**) et la rhamnétine (**17**) dans l'extrait de *Rh. saxatilis* est d'environ 1/1, alors qu'il est pratiquement de 30/1 dans les extraits de *Rh. alaternus* et *Rh. catharticus*. Si on admet que les composés ont un coefficient d'absorption molaire (ϵ) voisin à 350 nm, on peut conclure que dans *Rh. saxatilis*, le kaempferol (**16**) et la rhamnétine (**17**) sont présents en proportions très voisines. Les espèces *Rh. catharticus* et *Rh. alaternus* présentent des chromatogrammes très proches. Malgré la diminution de la population en flavonol par hydrolyse des précurseurs glycosylés, la distinction entre *Rh. catharticus* et *Rh. alaternus* ne peut pas être faite.

Cette étude nous a donc permis de clairement identifier la structure chimique des principaux flavonols glycosylés et aglycones extraits à partir des fruits immatures de trois espèces du genre *Rhamnus*, par CLHP/UV-Visible/SM. Pour conclure, il est donc possible de distinguer par des composés caractéristiques l'espèce *Rh. saxatilis* des deux autres (*Rh. alaternus* et *Rh. catharticus*) qui, d'après la littérature, était la plus employée pour la fabrication du jaune d'Avignon.

II.1.3.1.1. Étude de la partie anthraquinonique

Les fruits matures des trois espèces du genre *Rhamnus* présentes dans notre région ont été analysés par SPE/CLHP/UV-Visible (**Figure 2.27**). Ces espèces étaient anciennement employées à l'état mature dans le procédé de fabrication d'un colorant vert appelé vert de vessie. La partie anthraquinonique de ces espèces a été comparée.

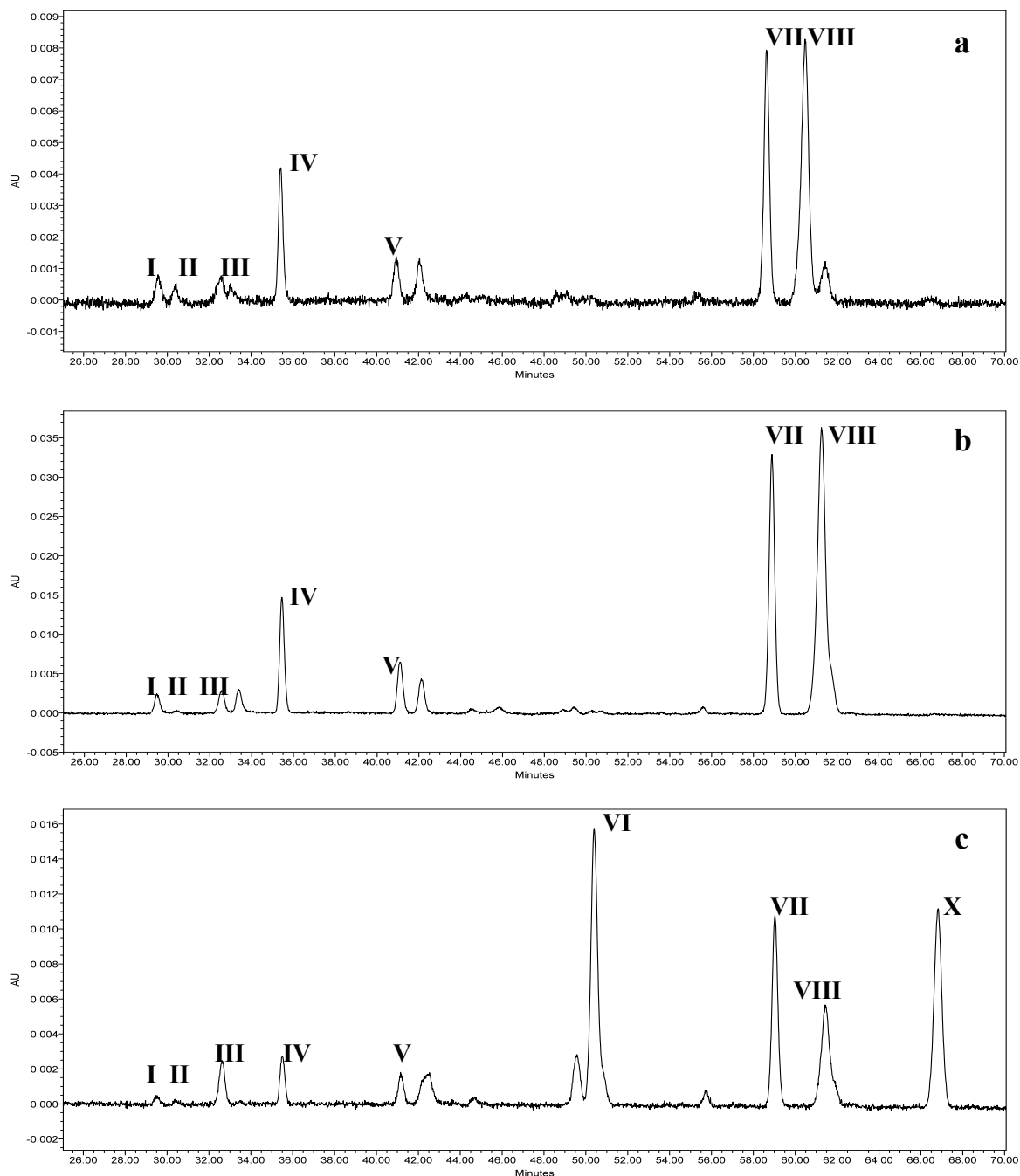


Figure 2.27. Agrandissement des chromatogrammes à 450 nm des anthraquinones de *Rh. saxatilis* (a), *Rh. catharticus* (b) et *Rh. alaternus* (c).

Les chromatogrammes obtenus pour les espèces *Rh. saxatilis* (Figure 2.27a) et *Rh. catharticus* (Figure 2.27b) montrent la présence de franguline A (I), de franguline B (II), d'aloé-émودية (III), du 6-*O*-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émودية (IV), du 6-*O*-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émودية (V), du 6-*O*-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émودية (VII) et de l'émودية (VIII). Dans l'espèce *Rh. alaternus* (Figure 2.27c),

viennent s'ajouter aux molécules précédentes deux autres composés : le 6-*O*-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne (VI) et le 6-*O*-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside-émodyne (X) qui constituent donc des biomarqueurs spécifiques de *Rh. alaternus*. En revanche, *Rh. saxatilis* et *Rh. catharticus* ne peuvent être différenciés par la composition chimique de leur partie anthraquinonique.

On peut noter que l'analyse SPE/CLHP/UV-Visible des composés aglycones, obtenus par hydrolyse acide des extraits de *Rhamnus*, n'a pas été détaillée car elle ne permet pas de distinguer chaque espèce. En effet, les chromatogrammes indiquaient la seule présence d'émodyne car les composés glycosylés majoritaires présents dans les extraits avant hydrolyse sont tous des dérivés de ce dernier.

II.1.3.2. Comparaison chimique de divers *Rhamnus* maturesII.1.3.2.1. Comparaison de la partie flavonol

La partie flavonol des différentes espèces du genre *Rhamnus* a été analysée par CLHP/UV-Visible. Cette étude porte sur dix-sept échantillons certifiés de fruits matures de diverses provenances géographiques. Ces fruits ont été récoltés ou offerts par des botanistes (**Tableau 2.10**).

Tableau 2.10. Description des espèces de *Rhamnus* étudiées pour les fruits matures.

Code	Espèces	Provenance	Fournisseur
SAX-1	<i>Rh. saxatilis</i>	Caumont sur Durance, France	Récoltés
ALA-1	<i>Rh. alaternus</i>	Caumont sur Durance, France	Récoltés
ALA-2	<i>Rh. alaternus</i>	Naples, Italy	Dr. De Micco
CAT-1	<i>Rh. catharticus</i>	Roussillon, France	Okhra
CAT-2	<i>Rh. catharticus</i>	Stalingrad, Russie	Jardin botanique de Montréal
CAT-3	<i>Rh. catharticus</i>	Gérone, Espagne	Pr. Bas Lay
ALP-1	<i>Rh. alpina</i>	Gérone, Espagne	Pr. Bas Lay
LYC-1	<i>Rh. lycioide</i>	Gérone, Espagne	Pr. Bas Lay
LUD-1	<i>Rh. ludovia</i>	Gérone, Espagne	Pr. Bas Lay
FRA-1	<i>Rh. frangula alnus</i>	Montreal, Canada	Jardin botanique de Montréal
FRA-2	<i>Rh. frangula alnus</i>	New York, USA	Jardin botanique de Montréal
FRA-3	<i>Rh. frangula alnus</i>	Gérone, Espagne	Pr. Bas Lay
FRA-4	<i>Rh. frangula alnus</i> « <i>Asplenifolius</i> »	Montreal, Canada	Jardin botanique de Montréal
PUM-1	<i>Rh. pumila</i>	Gérone, Espagne	Pr. Bas Lay
PAL-1	<i>Rh. pallasii</i>	Montreal, Canada	Jardin botanique de Montréal
PUR-1	<i>Rh. purshianus</i>	Amérique du Nord	Jardin botanique de Montréal

Le **tableau 2.11** décrit la présence des flavonols en fonction des différentes espèces et le pourcentage relatif de chaque composé est présenté en **Annexe V**.

Tableau 2.11. Composition chimique en flavonols des différents *Rhamnus* matures.

Composés	SAX-1	ALA-1	ALA-2	CAT-1	CAT-2	CAT-3	ALP-1	LYC-1	LUD-1	FRA-1	FRA-2	FRA-3	FRA-4	PUM-1	PAL-1	PUR-1
3- <i>O</i> -rhamnoside de quercétine (1)	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
3- <i>O</i> -rhamnoside de kaempférol (2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3- <i>O</i> -rhamnoside d'isorhamnétine (3)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
4'- <i>O</i> -rhamnoside de quercétine (4)	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
3- <i>O</i> -acétyl-rhamnoside de kaempférol (5)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
4'- <i>O</i> -rhamnoside de kaempférol (6)	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
3- <i>O</i> -rhamnoside de rhamnétine (7)	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3- <i>O</i> -rhamnoside de rhamnocitrine (8)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
3- <i>O</i> -rhamnoside de rhamnazine (9)	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
4'- <i>O</i> -rhamnoside de rhamnétine (10)	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -acétyl-rhamnoside de rhamnocitrine (11)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4'- <i>O</i> -rhamnoside de rhamnocitrine (12)	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -acétyl-rhamnoside de rhamnazine (13)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
quercétine (14)	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
isorhamnétine (15)	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
kaempférol (16)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
rhamnétine (17)	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
rhamnazine (18)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
rhamnocitrine (19)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

+ : présence

- : absence

En comparant les différentes espèces botaniques et/ou leurs provenance géographiquess, on peut noter que les composés 3-*O*-acétyl-rhamninoside comme le 3-*O*-acétyl-rhamninoside de kaempférol (**5**), le 3-*O*-acétyl-rhamninoside de rhamnocitrine (**11**) et le 3-*O*-acétyl-rhamninoside de rhamnazine (**13**) sont présents, comme vu précédemment, dans l'espèce *Rh. saxatilis* (SAX-1) mais sont également présents dans *Rh. frangula* (FRA-2 et FRA-3) et *Rh. pumila* (PUM-1). Leur pourcentage relatif vari entre 1,18 et 8,30%. On peut également remarquer dans ces trois espèces l'absence totale de dérivés 4'-*O*-rhamninoside.

Le 4'-*O*-rhamninoside de quercétine (**4**) a été identifiée dans les espèces *Rh. catharticus* (CAT-2), *Rh. lycioides* (LYC-1) et *Rh. pallasii* (PAL-1). Le 4'-*O*-rhamninoside de kaempférol (**6**) est présent dans *Rh. alaternus* (ALA-1 et ALA-2), *Rh. catharticus* (CAT-2 et CAT-3), *Rh. lycioides*, *Rh. ludovia* (LUD-1), *Rh. pallasii* et *Rh. purshianus* (PUR-1). Le 4'-*O*-rhamninoside de rhamnétine (**10**) est présent uniquement dans deux espèces : *Rh. catharticus* (CAT-2) et *Rh. lycioides*. De plus, le 4'-*O*-rhamninoside de rhamnocitrine (**12**) a été identifié dans les espèces *Rh. alaternus* (ALA-1 et ALA-2), *Rh. catharticus* (CAT-2), *Rh. lycioides* et *Rh. ludovia*.

Enfin, les composés 3-*O*-rhamninoside (**1**, **2**, **3**, **7**, **8** et **9**) sont présents dans la majorité des espèces. Les six flavonols aglycones, que sont la quercétine (**14**), l'isorhamnétine (**15**), le kaempférol (**16**), la rhamnétine (**17**), la rhamnazine (**18**) et la rhamnocitrine (**19**), sont également présents dans la majorité des fruits matures de ces espèces. Ils peuvent représenter la majorité des composés comme c'est le cas du kaempférol (**16**) dans *Rh. frangula* (FRA-1) avec un pourcentage relatif de 79,94%. Leur absence peut être le résultat soit de la maturité du fruit soit de l'absence de son précurseur glycosylé correspondant.

De par leur importante présence, les composés 4'- et 3-*O*-rhamninosides ne peuvent pas distinguer les espèces de *Rhamnus*, contrairement aux composés 3-*O*-acétyl-rhamninoside qui caractérisent les espèces *Rh. saxatilis* et *Rh. frangula*. Ce travail montre que la composition chimique en flavonols peut varier en fonction des différentes espèces et/ou de leur provenance. A noter que l'échantillon commercial CAT-1, provenant de la société Okhra, a une composition chimique différente des échantillons certifiés CAT-2 et CAT-3, avec notamment l'absence totale de composé 4'-*O*-rhamninoside.

Dans le but d'exprimer les liens entre les différents *Rhamnus*, une classification hiérarchique ascendante (CHA) a été réalisée à partir du pourcentage relatif des 19 flavonols étudiés pour les 16 échantillons de *Rhamnus*. La distance Euclidienne au carré (méthode de Ward) a été utilisée pour cette étude (Chen et al., 2007 ; Li et al., 2009). La **figure 2.28** montre le résultat des 16 échantillons de *Rhamnus* testés, lesquels sont répartis en quatre groupes (SAX-1→FRA-3, ALA-1→PAL-1, FRA-1→FRA-4 et CAT-2→LUD-1) dont le contenu en flavonol diffère. A noter que la longueur des branches est proportionnelle à la divergence de la composition chimique en flavonol pour chaque espèce étudiée.

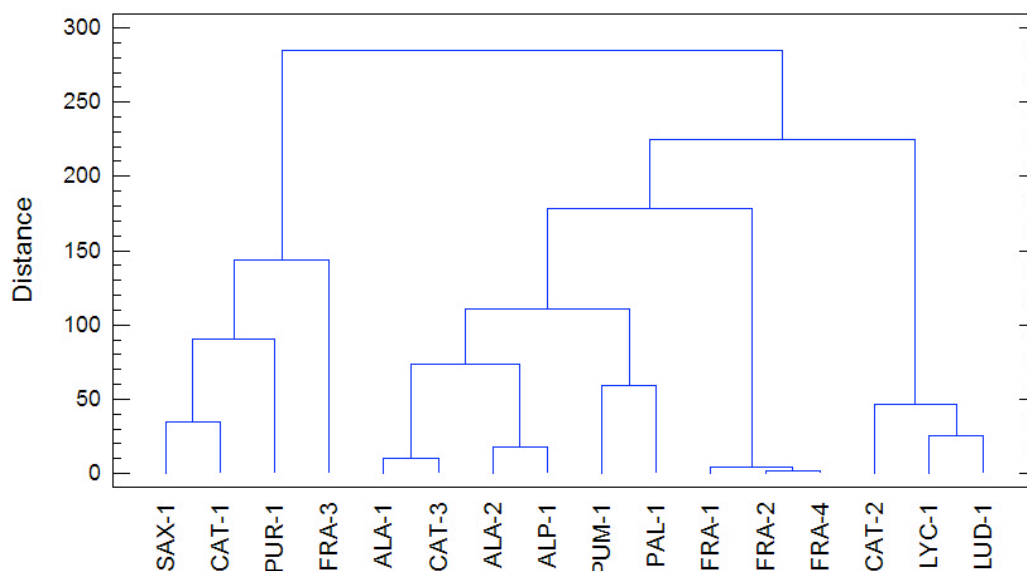


Figure 2.28. Dendrogramme des 16 espèces de *Rhamnus* construit à partir du pourcentage relatif des flavonols.

Cette hiérarchisation des différentes espèces de *Rhamnus* permet de les regrouper en fonction du pourcentage relatif en flavonol. Cependant une même espèce botanique peut appartenir à différents groupes selon sa composition chimique. C'est le cas par exemple pour *Rh. frangula*, *Rh. alaternus* ou encore *Rh. catharticus*. Ces distinctions pourraient être expliquées par le fait que les différents échantillons n'ont pas le même degré de maturité et donc que le pourcentage relatif des composés d'une même espèce peuvent différer. De plus, la fraction flavonol est semblable pour la quasi totalité des espèces étudiées, aussi il est difficile de les regrouper selon ce seul critère.

II.1.3.2.2. Comparaison de la partie anthraquinonique

L'analyse des anthraquinones préalablement isolées par extraction en phase solide (SPE) a été réalisée sur les fruits matures des différentes espèces de *Rhamnus*. La méthode SPE/CLHP/UV-Visible a été appliquée pour l'analyse de six anthraquinones commerciales et cinq caractérisées au laboratoire.

II.2.3.2.2.1. Analyse chromatographique

L'analyse SPE/CLHP/UV-Visible a été effectuée et la présence des composés anthraquinoniques est présentée dans le **tableau 2.12**. Le pourcentage relatif de chaque composé en fonction des espèces étudiées est décrit en **Annexe V**.

Tableau 2.12. Composition chimique en anthraquinones des différents *Rhamnus* matures.

Composés	SAX-1	ALA-1	ALA-2	CAT-1	CAT-2	CAT-3	ALP-1	LYC-1	LUD-1	FRA-1	FRA-2	FRA-3	FRA-4	PUM-1	PAL-1	PUR-1
franguline A (I)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
franguline B (II)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
aloe-émodyne (III)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
6- <i>O</i> -(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émodyne (IV)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
6- <i>O</i> -(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émodyne (V)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
6- <i>O</i> -(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne (VI)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6- <i>O</i> -(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émodyne (VII)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
émodyne (VIII)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
chrysophanol (IX)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
6- <i>O</i> -(2',3',4'-triacétyl)- arabinopyranoside d'émodyne (X)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pariétine (XI)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-

+ : présence

- : absence

La franguline A (**I**) ainsi que l'émودية (**VIII**) sont les deux seuls aglycones présents dans toutes les espèces étudiées. La franguline A a un pourcentage relatif assez faible, compris entre 0,41 et 3,25%, hormis pour les espèces *Rh. catharticus* (CAT-1), *Rh. frangula* (FRA-4) et *Rh. pallasii* avec respectivement 7,70 – 7,08 et 18,19%. L'émودية présente un pourcentage de 68,01% pour *Rh. ludovia*, ainsi que des valeurs proches de 50% pour les trois espèces *Rh. catharticus*, et de 60% pour *Rh. pallasii* et *Rh. purshianus*. Pour les autres espèces les valeurs d'émودية varient entre 3,81 et 39,41%. L'aloé-émودية (**III**) est également présente dans la quasi-totalité des espèces étudiées. Ce composé est caractéristique des espèces *Rh. frangula* et *Rh. alpinus* avec des pourcentages relatifs compris entre 45,97 et 90,77%. Le chrysophanol (**IX**) a été identifié uniquement dans les espèces *Rh. frangula*, *Rh. lycioides*, *Rh. ludovia* et *Rh. pumila*. La pariétine n'est présente que dans *Rh. catharticus* (CAT-1), *Rh. ludovia* et *Rh. frangula* (FRA-3) avec des pourcentages respectifs de 0,27 et 3,19%.

Les composés 6-*O*-(2'-acétyl)-arabynofuranoside d'émودية (**IV**) et 6-*O*-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émودية (**V**) ont été identifiés dans de nombreuses espèces avec des valeurs comprises entre 1,19 et 20,75%. Ces deux composés sont totalement absents des espèces *Rh. frangula* et *Rh. alpina*. Le composé 6-*O*-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émودية (**VII**) est présent dans la plupart des espèces hormis dans certains échantillons de *Rh. frangula* (FRA-1, FRA-2 et FRA-4). Enfin, les composés 6-*O*-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émودية (**VI**) et 6-*O*-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émودية (**X**) ont été identifiés uniquement dans *Rh. alaternus* et sont donc caractéristiques de cette espèce.

Comme précédemment, une classification hiérarchique ascendante (CHA) a été réalisée à partir du pourcentage relatif des 11 anthraquinones étudiées pour les 16 échantillons de *Rhamnus*. La **figure 2.29** montre le résultat des 16 échantillons de *Rhamnus* testés et trois groupes (SAX-1→LUD-1, ALA-1→ALA-2 et ALP-1→FRA-3) se dégagent de ce dendrogramme. Le deuxième groupe concerne les espèces possédant les composés **VI** et **X**, et le troisième inclus celle présentant le chrysophanol (**IX**) et/ou un pourcentage important d'aloé-émودية (**III**). Dans le premier groupe, un sous-groupe peut être mis en évidence. Il concerne les espèces *Rh. saxatilis*, *Rh. catharticus* et *Rh. purshianus* présentant un profil chromatographique proche.

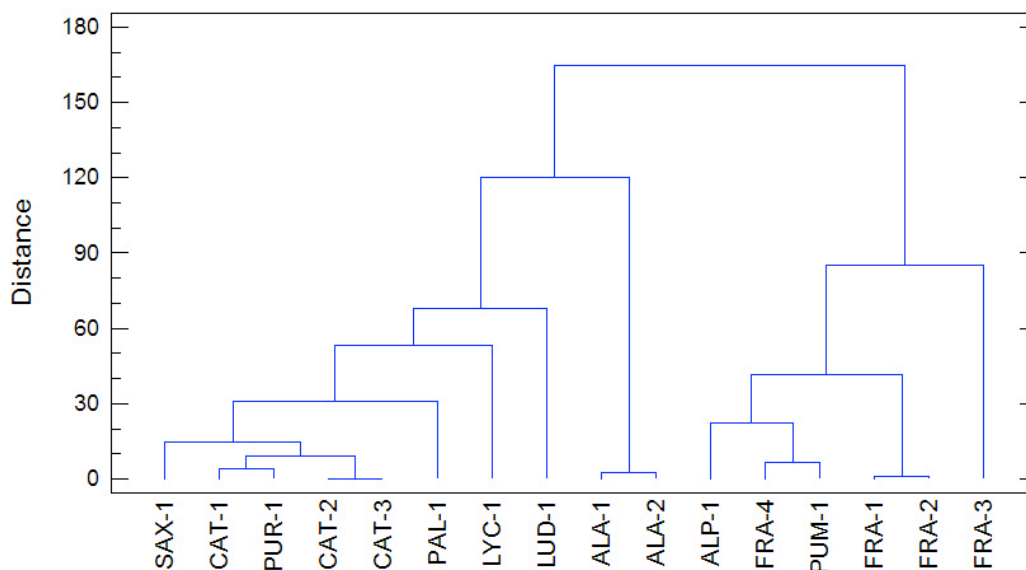


Figure 2.29. Dendrogramme des 16 espèces de *Rhamnus* construit à partir du pourcentage relatif en anthraquinones.

Ce dendrogramme réalisé sur le pourcentage relatif en anthraquinones présente un regroupement satisfaisant des échantillons d'une même espèce. Contrairement au flavonol, la composition chimique en anthraquinones permet une meilleure distinction des différentes espèces de *Rhamnus*.

II.2.3.2.2.1. Dosage des anthraquinones standards

Contrairement aux expérimentations précédentes, où le pourcentage relatif de chaque anthraquinone était étudié, les divers échantillons ont fait l'objet d'une étude quantitative. En effet, le dosage des six composés anthraquinoniques commerciaux (franguline A et B, aloémodine, émodyne, chrysophanol et pariétine) a été réalisé.

Un étalonnage externe préalable a été effectué à partir de solutions des composés commerciaux dont les concentrations massiques sont comprises entre 0,39 et 110 µg/mL. Pour chacune d'entre elles, trois analyses successives ont permis de déterminer l'aire moyenne du pic correspondant sur le chromatogramme obtenu à sa longueur d'onde d'absorption maximale. La courbe d'étalonnage pour chaque composé commercial a donc pu être tracée afin de déterminer son équation et son coefficient de détermination (R^2). Enfin, la limite de détection (LD) ainsi que la limite de quantification (LQ) ont pu être calculées (**Tableau 2.13**).

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

Composés	Équation	Gamme de concentration (µg/mL)	R ²	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
Franguline A	$y = 4,0x + 4,56$	8,16-48,00	0,9993	0,44	1,48
Franguline B	$y = 9,0x + 8,67$	8,16-110,00	0,9995	0,27	0,91
Aloe-émodyne	$y = 1,9x + 0,64$	0,39-30,24	0,9996	0,19	0,66
Émodine	$y = 9,8x - 0,32$	0,39-64,00	0,9997	0,32	1,08
Chrysophanol	$y = 1,1x + 0,59$	0,39-30,24	0,9991	0,03	0,08
Pariétine	$y = 3,5x - 0,29$	0,39-30,24	0,9993	0,31	1,03

LD : Limite de détection

LQ : Limite de quantification

Les teneurs en composés anthraquinoniques commerciaux ont été déterminées au sein des différentes espèces de *Rhamnus* étudiées. Pour ce faire, les valeurs des aires moyennes de pic des composés ont été reportées sur les courbes d'étalonnage précédemment déterminées. La masse de chaque composé commercial présent dans les différents fruits de *Rhamnus* a pu ainsi être calculée (Tableau 2.14).

Tableau 2.14. Masse (mg) des composés étalons par g de *Rhamnus*.

Éch.	Franguline A	Franguline B	Aloe-émodyne	Émodine	Chrysophanol	Pariétine	Total
SAX-1	0,12	0,22	0,02	0,60	- ^a	-	0,96
ALA-1	0,12	+ ^b	0,04	0,46	-	-	0,62
ALA-2	0,13	+	0,03	0,17	-	-	0,30
CAT-1	0,17	0,24	0,05	1,05	-	0,01	1,52
CAT-2	0,17	+	0,05	2,43	-	-	2,65
CAT-3	0,14	+	0,05	1,12	-	-	1,31
ALP-1	0,12	-	0,42	0,29	-	-	0,89
LYC-1	0,12	+	+	0,35	0,11	-	0,58
LUD-1	+	0,65	0,22	7,12	0,03	+	8,02
FRA-1	+	+	1,24	0,21	0,05	-	1,50
FRA-2	0,13	-	0,47	0,35	0,06	-	1,01
FRA-3	0,12	-	0,27	0,05	0,03	0,01	0,48
FRA-4	0,18	-	0,50	0,47	0,09	-	1,24
PUM-1	+	-	0,11	0,33	0,05	-	0,49
PAL-1	0,70	0,31	-	3,65	-	-	4,66
PUR-1	0,11	-	+	2,35	-	-	2,46

^a Non détecté

^b Sous la limite de quantification

Les résultats montrent que la quantité d'anthraquinones varie fortement en fonction des différentes espèces et/ou de leur provenance. L'émodyne présente des masses différentes en fonction de l'espèce. Ces valeurs s'étendent de 0,05 à 7,12 mg par gramme d'échantillon sec.

Dans le plupart des espèces, l'émodyne est le composé en plus grande quantité sauf pour les espèces *Rh. frangula* et *Rh. alpina* où l'aloé-émodyne est majoritaire. La quantité de franguline A varie entre 0,12 et 0,70 mg/g et celle de la franguline B entre 0,22 et 0,64 mg/g. Les espèces *Rh. lycioides*, *Rh. ludovia*, *Rh. frangula* et *Rh. pumila* renferment du chrysophanol dans des masses inférieures à 0,11 mg/g. La pariétine est présente en faible quantité (0,01 mg/g) dans *Rh. catharticus* (CAT-1) et *Rh. frangula* (FRA-3) et à l'état de trace dans *Rh. ludovia*. Enfin, on peut noter que l'espèce *Rh. ludovia* contient la plus grande quantité d'anthraquinones commerciales avec un total de 8,02 mg/g.

En ce qui concerne les échantillons d'une même espèce, les masses en anthraquinones peuvent être différentes. Si l'on compare ces échantillons, on peut remarquer que les variations sont constatées au niveau de l'émodyne. Comme vu précédemment, le genre *Rhamnus* comprend de nombreux dérivés glycosylés de l'émodyne. Donc pour une même espèce, les différences de composition chimique peuvent être expliquées par divers degrés d'hydrolyse notamment des précurseurs de l'émodyne dues à des différences de maturité et/ou de conservation des échantillons.

Devant la richesse des résultats, un tableau récapitulatif (**Tableau 2.15.**) a été réalisé regroupant les principaux composés flavonols et anthraquinones permettant ainsi une meilleure caractérisation de chaque espèce botanique de *Rhamnus*.

Tableau 2.15. Composition chimique en flavonols et en anthraquinones des différents *Rhamnus* matures.

Composés	SAX-1	ALA-1	ALA-2	CAT-1	CAT-2	CAT-3	ALP-1	LYC-1	LUD-1	FRA-1	FRA-2	FRA-3	FRA-4	PUM-1	PAL-1	PUR-1
<i>Flavonols</i>																
3- <i>O</i> -rhamnoside de quercétine (1)	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
3- <i>O</i> -rhamnoside de kaempférol (2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3- <i>O</i> -rhamnoside d'isorhamnétine (3)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
4'- <i>O</i> -rhamnoside de quercétine (4)	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
3- <i>O</i> -acétyl-rhamnoside de kaempférol (5)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
4'- <i>O</i> -rhamnoside de kaempférol (6)	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
3- <i>O</i> -rhamnoside de rhamnétine (7)	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3- <i>O</i> -rhamnoside de rhamnocitrine (8)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
3- <i>O</i> -rhamnoside de rhamnazine (9)	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
4'- <i>O</i> -rhamnoside de rhamnétine (10)	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -acétyl-rhamnoside de rhamnocitrine (11)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4'- <i>O</i> -rhamnoside de rhamnocitrine (12)	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -acétyl-rhamnoside de rhamnazine (13)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
quercétine (14)	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
isorhamnétine (15)	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
kaempférol (16)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
rhamnétine (17)	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
rhamnazine (18)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
rhamnocitrine (19)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Anthraquinones</i>																
franguline A (I)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
franguline B (II)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
aloe-émidine (III)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
6- <i>O</i> -(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émidine (IV)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
6- <i>O</i> -(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émidine (V)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
6- <i>O</i> -(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émidine (VI)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6- <i>O</i> -(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émidine (VII)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
émidine (VIII)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
chrysophanol (IX)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
6- <i>O</i> -(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émidine (X)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pariétine (XI)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-

+ : présence

- : absence

II.1.4. Application à un échantillon d'une pharmacie du XVIII^{ème} siècle

Notre équipe a procédé il y a quelques années à l'inventaire scientifique complet de la pharmacie du XVIII^{ème} siècle, située à l'Université d'Avignon (Hovaneissian, 2005). Ce pot, sur lequel est inscrit "Stil de grain" contient de petites pastilles coniques de couleur brune (**Figure 2.30**). Nous avons procédé à son analyse par chromatographie.



Figure 2.30. Échantillon "Stil de grain" de la pharmacie.

Une analyse préalable de l'échantillon traduit la présence de polyphénols caractéristiques des *Rhamnus*. Aussi, après solubilisation dans un mélange méthanol-eau (5:5, v/v), les flavonols et les anthraquinones ont été séparés par SPE et analysés par CLHP/UV-Visible (**Figure 2.31**).

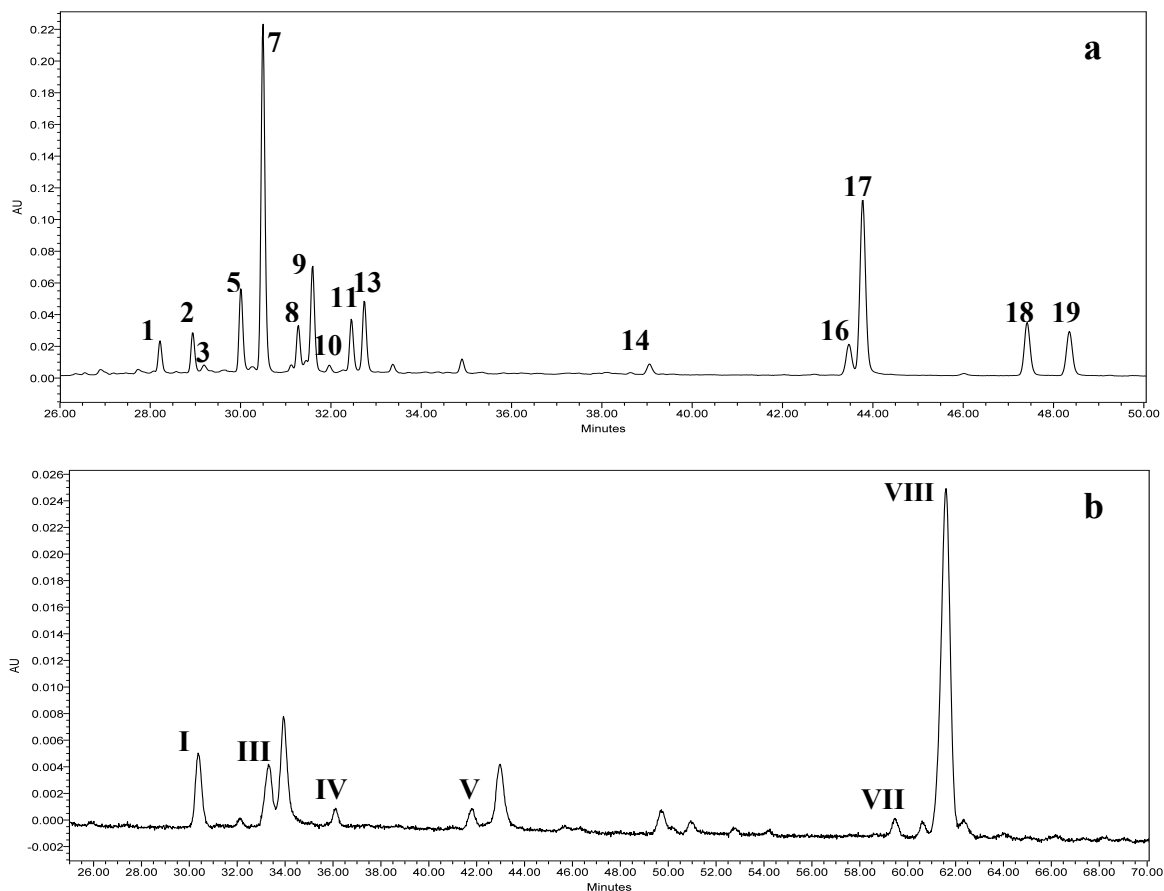


Figure 2.31. Agrandissement des chromatogrammes des flavonols à 350 nm (a) et des anthraquinones à 450 nm de l'échantillon de la pharmacie.

La partie flavonol (**Figure 2.31a**) contient le 3-*O*-rhamninoside de quercétine (1), le 3-*O*-rhamninoside de kaempférol (2), le 3-*O*-rhamninoside d'isorhamnétine (3), le 3-*O*-rhamninoside de rhamnétine (7), le 3-*O*-rhamninoside de rhamnocitrine (8) et le 3-*O*-rhamninoside de rhamnazine (9). L'échantillon contient également des composés flavonols liés à un rhamninoside acétylé sur leur position 3 comme le 3-*O*-acétyl-rhamninoside de kaempférol (5), le 3-*O*-acétyl-rhamninoside de rhamnocitrine (11) et le 3-*O*-acétyl-rhamninoside de rhamnazine (13). Ces composés sont présents dans les espèces *Rh. saxatilis*, *Rh. frangula* et *Rh. pumila*. De plus, l'échantillon contient le 4'-*O*-rhamninoside de rhamnétine, présent dans *Rh. alaternus* (immatures) et dans *Rh. catharticus* (immatures et matures). On peut noter une proportion notable de flavonols aglycones avec la quercétine (14), le kaempférol (16), la rhamnétine (17), la rhamnazine (18) et la rhamnocitrine (19).

Afin de connaître précisément les espèces employées lors de la préparation de cet échantillon, la partie anthraquinonique a été également analysée (**Figure 2.31b**). Les composés identifiés dans cet échantillon sont la franguline A (**I**), l'aloé-émودية (**III**), le 6-*O*-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émودية (**IV**), le 6-*O*-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émودية (**V**), le 6-*O*-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émودية (**VII**) et l'émودية (**VIII**). L'absence du chrysophanol, identifié dans les espèces *Rh. frangula* et *Rh. pumila*, ainsi que du 6-*O*-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émودية (**VI**) et du 6-*O*-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émودية (**X**), biomarqueurs de l'espèce *Rh. alaternus*, nous permet de conclure que cette espèce, bien qu'abondante dans la région, n'a certainement pas été utilisée et que cet échantillon a été vraisemblablement préparé avec un mélange de *Rh. saxatilis* et de *Rh. catharticus*.

On peut observer l'intensité des pics correspondant aux composés aglycones, tant pour la partie flavonol que pour la partie anthraquinonique. Ce phénomène peut être expliqué par l'utilisation de fruits mûres ou par une hydrolyse des précurseurs glycosylés lors du procédé de fabrication de cet échantillon.

Afin de confirmer notre analyse, les pourcentages relatifs des composés flavonols et anthraquinoniques de l'échantillon ancien ont été inclus dans les classifications hiérarchiques ascendantes réalisées précédemment (**Figure 2.32**). L'échantillon ancien se trouve bien dans le groupe correspondant aux *Rh. saxatilis* et *Rh. catharticus* que ce soit dans le dendrogramme des flavonols ou dans celui des anthraquinones.

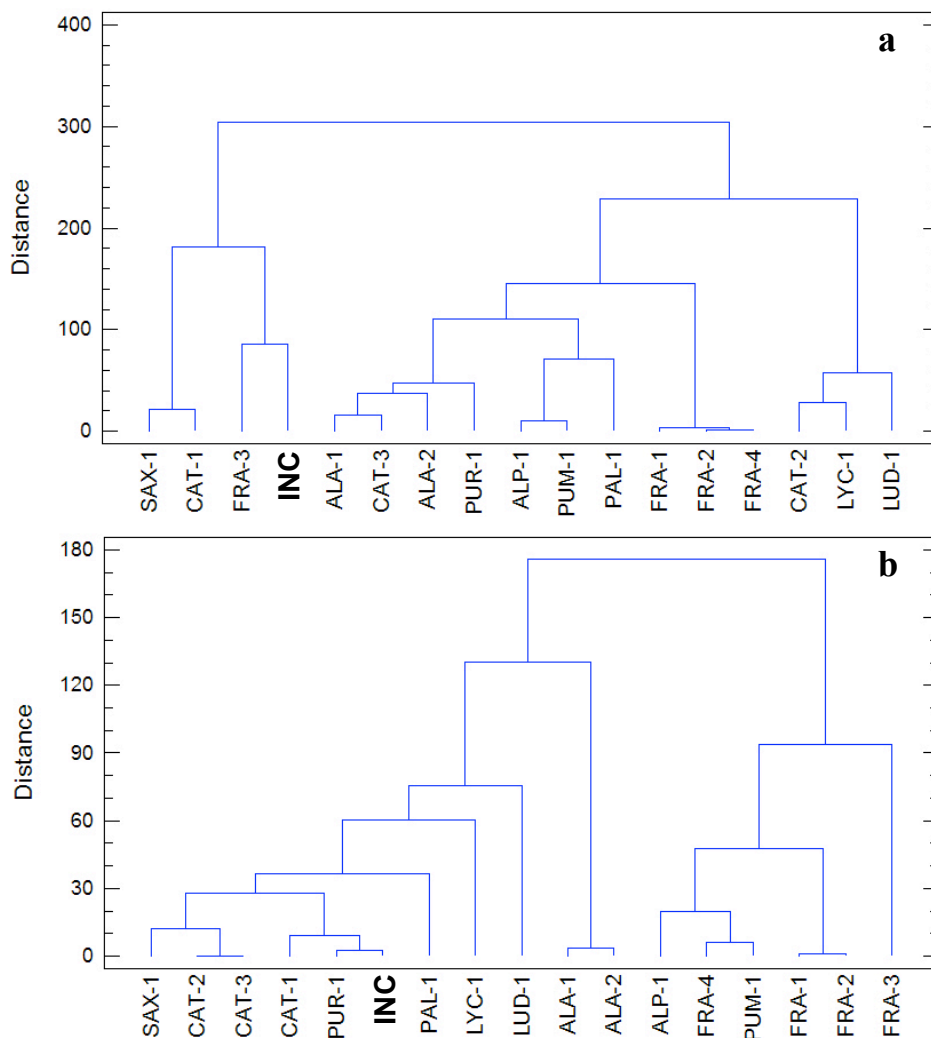


Figure 2.32. Dendrogrammes des 16 espèces de *Rhamnus* et de l'échantillon ancien construits à partir du pourcentage relatif des flavonols (a) et des anthraquinones (b).

Enfin, on peut rajouter que le terme “Stil de grain” figurant sur cet échantillon est impropre. En effet, la présence d’anthraquinones implique que les fruits utilisés étaient matures. On peut supposer que cet échantillon avait pour but une utilisation pharmaceutique.

II.2. ÉTUDE DES COLORANTS DE RESEDA LUTEOLA

II.2.1. Identification des flavones

Les principaux colorants de la gaude ont été identifiés *via* des molécules de référence (Extrasynthèse, Genay, France) et correspondent à des flavonoïdes et plus précisément des flavones ; il s'agit soit d'aglycones tels que la lutéoline ou l'apigénine, soit de dérivés mono- ou diglucosylés tels que le 7-*O*-glucoside de lutéoline, le 3',7-di-*O*-glucoside de lutéoline et le 7-*O*-glucoside d'apigénine. Le **tableau 2.16** regroupe par ordre d'élution croissant, les différentes molécules étudiées, leurs λ_{\max} respectifs ainsi que la rapport masse/charge obtenu pour chaque pic par CLHP/SM (Mathe et al., 2009).

Tableau 2.16. Caractérisation des colorants de la gaude.

	t_R (min)	Molécules	λ_{\max}	M+H
a	24,0	6,8-di- <i>C</i> -glucoside d'apigénine	217, 270, 335	611
b	25,1	di- <i>O</i> -glucoside de lutéoline	207, 268, 338	611
c	26,3	3',7-di- <i>O</i> -glucoside de lutéoline	207, 268, 340	611
d	28,8	7- <i>O</i> -glucoside de lutéoline	204, 254, 348	449
e	30,5	7- <i>O</i> -glucoside d'apigénine	203, 267, 338	433
f	31,0	inconnu 1	205, 268, 338	433
g	31,3	inconnu 2	208, 241, 268, 341	449
h	38,2	lutéoline	208, 253, 348	287
i	41,2	diosmétine	209, 251, 348	301
j	42,0	apigénine	205, 267, 338	271

Les flavonoïdes possèdent des chromophores dont la longueur d'onde d'absorption caractéristique se situe dans le visible aux alentours de 350 nm. Cette valeur correspond donc à la longueur d'onde de travail choisie en CLHP/UV.

II.2.2. Étude par chromatographie liquide

Cette étude a été réalisée dans notre laboratoire (Fujii, 2008). Elle est citée ici afin d'être comparée à celle par électrophorèse capillaire que nous avons réalisée et qui fait l'objet du paragraphe II.1.3.

L'extrait coloré de la gaude a été analysé par CLHP/UV-Visible (**Figure 33**). Les principaux composés (**c, d, e, h, j**) présents au sein de la gaude ont été identifiés en phase inverse. Les composés élués en premier correspondent donc aux produits les plus polaires, en l'occurrence il s'agit de dérivés flavonoïdiques glucosylés.

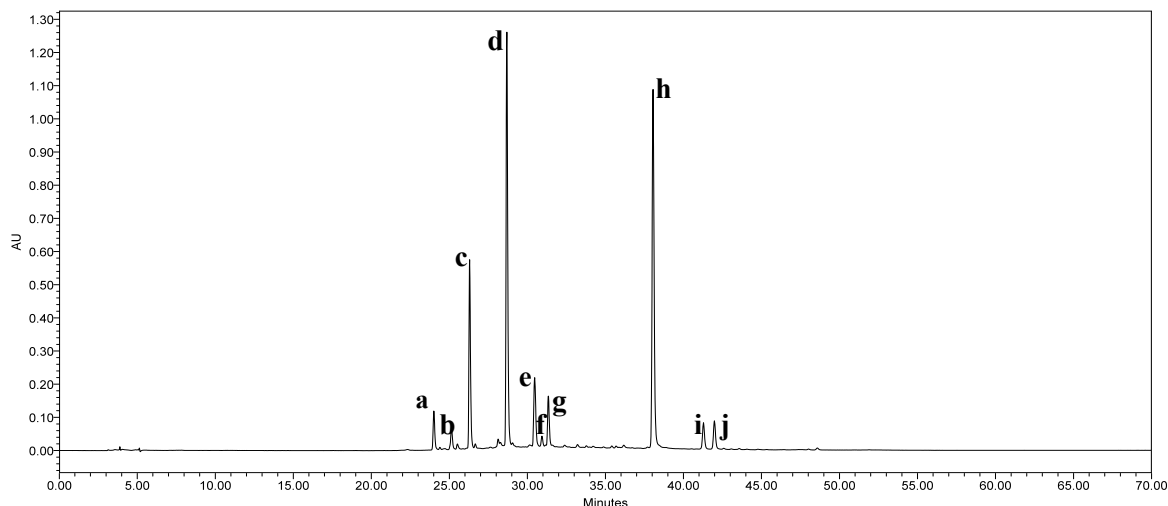


Figure 2.33. Chromatogramme CLHP/UV à 350 nm de la gaude.

II.1.2. Étude par électrophorèse capillaire

Cette méthode de séparation, bien que reposant sur un principe complètement différent de celui des méthodes chromatographique, peut constituer une alternative dans l'analyse des matériaux du Patrimoine Culturel (Mazanek et al., 2006). Une étude par électrophorèse capillaire couplée à un détecteur UV-Visible a donc été réalisée. Après extraction des colorants de la gaude dans un mélange méthanol-eau (1:1, v/v), le surnageant a été injecté en électrophorèse. La **figure 2.34** présente l'électrophérogramme obtenu.

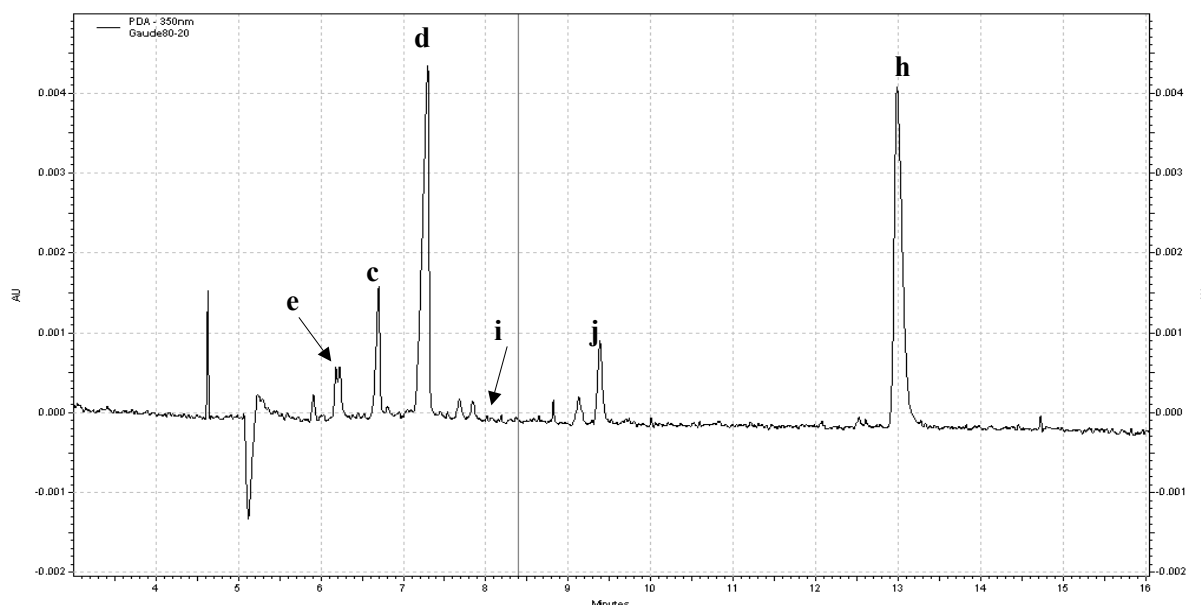


Figure 2.34. Électrophérogramme EC/UV-Visible à 350 nm de la gaude.

Les composés identifiés, à l'aide des molécules standards sont des composés glucosylés comme le 7-*O*-glucoside d'apigénine (**e**), le 3',7-di-*O*-glucoside de lutéoline (**c**) et le 7-*O*-glucoside de lutéoline (**d**). Des composés aglycones sont également présents comme la diosmétine (**i**), l'apigénine (**j**) et la lutéoline (**h**).

En comparaison avec la CLHP, on observe un gain de temps d'analyse important (les composés sont élués en 14 minutes contre 45 minutes en chromatographie) tout en conservant une séparation correcte.

Il est important de noter un changement dans l'ordre d'éluion des molécules. Ce phénomène est dû au fait que la phase éluante utilisée en électrophorèse est un tampon borate (pH 9,2) alors qu'en CLHP l'éluant est à pH acide. En milieu basique les fonctions phénol passent sous forme phénates et donc l'affinité des différentes molécules avec la colonne C18 est modifiée. Enfin, on a pu observer une sensibilité plus faible de l'électrophorèse vis à vis de ces colorants, ce qui peut expliquer l'absence de certains composés.

Cette étude a permis la mise en place d'une technique d'analyse rapide, efficace et alternative de la chromatographie liquide. Cette technique a pu être appliquée avec succès à la gaude, mais il n'a pas été possible de l'utiliser dans le cas des *Rhamnus*. En effet, l'impossibilité de comprendre l'ordre d'éluion des différents analytes et la modification profonde de leur spectre UV-Visible, en comparaison avec la CLHP/UV-Visible, ne nous a pas permis d'identifier les pics de l'électrophérogramme.

II.3. CONCLUSION

L'étude fondamentale de différentes sources végétales (*Rhamnus* spp. et *Reseda luteola*) responsables de colorations jaunes révèle une composition chimique complexe.

Le jaune d'Avignon est fabriqué à partir des fruits immatures de *Rhamnus saxatilis*, *Rh. alaternus* et *Rh. catharticus*, composés majoritairement de flavonols glycosylés. Une étude chromatographique utilisant la CLHP/UV-Visible/SM a permis d'identifier les composés présents dans ces trois espèces. Il a pu être déterminé que les trois espèces contiennent toutes des flavonols 3-*O*-rhamninosides. De plus, l'espèce *Rh. saxatilis* présente des composés 3-*O*-acétyl-rhamninosides pouvant caractériser cette espèce. Les deux autres espèces (*Rh. alaternus* et *Rh. catharticus*) contiennent des composés glycosylés dont la partie rhamninoside est liée sur le flavonol en position 4'. En revanche, ces espèces n'ont pas pu être distinguées chimiquement. Une étude plus approfondie sur un plus grand nombre d'échantillon pourra être effectuée afin de les différencier.

Les fruits matures des diverses espèces de *Rhamnus*, employés à l'époque en pharmaceutique ainsi qu'en peinture, ont également été étudiés. En effet, ces fruits étaient notamment employés lors de la fabrication d'un vert, appelé vert de vessie. La composition chimique des fruits matures de provenances diverses (commerciales, récoltées et fournies par des botanistes) a été analysée et comparée. La partie flavonol présente toujours des composés glycosylés mais également des flavonols aglycones, comme la quercétine ou la rhamnétine. Ces derniers sont issus de l'hydrolyse enzymatique des précurseurs glycosylés. Ces fruits matures renferment également des anthraquinones qui ont été séparées des flavonols et concentrées en utilisant l'extraction sur phase solide (SPE). Après optimisation des conditions chromatographiques, les anthraquinones ont été isolées dans le but de les caractériser par RMN. Des dérivés rhamnoside et arabinoside acétylés de l'émodyne ont été identifiés dont le 6-*O*-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne et 6-*O*-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne présents seulement dans l'espèce *Rh. alaternus*. Il est donc possible de différencier les trois espèces de *Rhamnus* grâce à l'étude conjointe de la partie flavonol et anthraquinone.

Une étude de cas a pu être effectuée par l'analyse des flavonols et anthraquinones d'un échantillon provenant d'une pharmacie du XVIII^{ème} siècle. Des flavonols 3-*O*-acétyl-rhamninosides ont pu être identifiés permettant de conclure que cet échantillon provient de l'espèce *Rh. saxatilis*.

Enfin, une étude sur les colorants jaunes de la gaude (*Reseda luteola*) a été réalisée. Une étude chromatographique a été précédemment réalisée (Fujii, 2008) et la mise en place des conditions pour l'analyse de ces composés par électrophorèse capillaire a été développée. En comparaison avec la CLHP, on observe un gain important au niveau de la durée tout en conservant une bonne séparation. En revanche, une perte de la sensibilité de l'électrophorèse vis à vis de ces colorants a été constatée. Ce protocole pourra être optimisé afin de l'appliquer à l'analyse d'échantillons anciens.

PARTIE 3

APPLICATIONS

Chapitre I. Étude de fibres textiles anciennes

Un protocole d'extraction des colorants présents dans les laques ou dans les fibres textiles, utilisant un tampon acétique (AcOEt/AcO⁻) a été mis en place et comparé à la méthode traditionnelle. Ce protocole a été appliqué à l'analyse par CLHP d'une laque de garance ancienne ainsi qu'à des indiennes prélevées au Palais du Roure et au Museon Arlaten.

I.1. EXTRACTION DES COLORANTS À PARTIR D'UNE LAQUE ET D'UN TEXTILE

Les colorants employés en peinture et en teinture sont souvent associés à une charge métallique afin de donner une solidité à la couleur en profitant notamment de leurs propriétés d'insolubilité dans tout solvant. Mais cela pose un problème lors de leur analyse en chromatographie liquide, qui reste la technique de choix pour l'identification de ces substances (Nowik, 1996 ; Szostek et al., 2003 ; Novotná et al., 1999 ; Clementi et al., 2007). Afin d'étudier ces échantillons par chromatographie liquide, il faut effectuer un prétraitement de l'échantillon (laque ou textile) en extrayant le(s) colorant(s) emprisonné(s) dans le complexe de coordination. Cette étape permet de "casser" la liaison colorant-aluminium. On effectue donc une opération de décomplexation de la fibre ou de la laque dans le but de libérer le(s) colorant(s).

Ces complexes sont très résistants et la première méthode pratiquée est une décomplexation en utilisant un acide fort (méthode qualifiée de "dure"). Dans cette méthode d'extraction des colorants, l'échantillon de tissu est traité par de l'acide chlorhydrique 37% dans un mélange méthanol : eau (5:5, v:v) à ébullition pendant 10 minutes (Wouters, 1985). Cette méthode permet l'augmentation de la concentration en protons H⁺ dans la solution, déplaçant l'équilibre de la réaction (ci-dessous) vers la droite et donc favorisant la libération des colorants.



Ces conditions aussi drastiques ont pour conséquence une dégradation de la fibre ainsi que des colorants présents. En effet, elles peuvent provoquer l'hydrolyse des composés glycosylés souvent majoritairement présents chez les plantes tinctoriales notamment dans les flavonoïdes (Zhang et Laursen, 2005). De plus, ces conditions de décomplexation peuvent également dénaturer les composés aglycones. En effet, la décarboxylation de la munjistine et de la pseudopurpurine pour donner respectivement la xanthopurpurine et la purpurine, lors d'une décomplexation "dure" des colorants rouges à partir d'une laque a été observée (Wouters, 1985 ; Schweppe, 1993). Enfin, ce procédé peut causer l'estérification des composés phénoliques (Ferreira et al., 2002). D'un point de vue analytique, cette méthode de décomplexation a un autre inconvénient : l'acidité de l'extrait ne permet pas une analyse directe de l'échantillon. En effet, la colonne chromatographique utilisée en CLHP ne supporte pas de pH inférieur à 2, ce qui implique un ajustement par une solution de NaOH et par conséquent la dilution de cette dernière, pouvant influencer sur la résolution du chromatogramme et donc sur l'identification de l'échantillon.

Dans le but d'éviter ces phénomènes de dégradation, une optimisation de ce protocole de décomplexation a été réalisé en réduisant tout d'abord la concentration en acide chlorhydrique et/ou en diminuant la température de réaction. En effet, des laques de garance retrouvées sur un site archéologique de Pompéi ont été analysées après l'hydrolyse acide des échantillons par un mélange méthanol-HCl 1N (5:5, v:v) plongé dans un bain à ultra-sons pendant une dizaine de minutes (Delamare et al., 2006). Cependant, des dégradations chimiques sont observées. C'est la raison pour laquelle, nous avons poursuivie cette optimisation aboutissant à l'utilisation d'acides faibles et d'agents complexants compétitifs. En effet, un mélange acide formique-méthanol (5:95, v:v) porté à 40°C pendant 30 min, ainsi qu'un mélange EDTA-acétonitrile-méthanol (2:10:88, v:v:v) à 60°C pendant 30 min, ont été employés pour l'extraction de colorants naturels à partir de fibres textiles (Zhang et Laursen, 2005). Ces conditions de décomplexation "douces" ont été comparées à celles utilisant l'acide chlorhydrique à chaud, et les conséquences évoquées ci-dessus ont été confirmées. Enfin, Sanyova et Reisse (2006), ont proposé un protocole d'extraction des colorants de la garance prélevés à partir de peintures anciennes par l'utilisation du mélange HF-DMF-AcOEt (8:1:1, v:v:v).

Le but de ce travail a été l'élaboration d'une autre méthode de décomplexation non dénaturante, susceptible de libérer de façon satisfaisante les aglycones tout en préservant les différents précurseurs. Pour cela, nous nous sommes intéressés au test de mise en évidence de l'aluminium (Al(III)) employé dans le cadre des analyses microchimique par voie humide utilisant un mélange aluminon-tampon acétique (AcOEt/AcO⁻) (Philippon, 1986) (**Figure 3.1**).

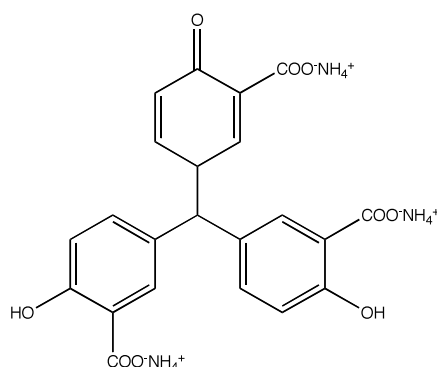


Figure 3.1. Structure chimique de l'aluminon.

Les premiers essais réalisés sur des laques ont traduit la mise en solution de molécules colorantes. Le test était donc concluant, cependant en approfondissant ces expérimentations, il a été démontré que la présence de l'aluminon n'était pas indispensable dans ce procédé. En effet, la seule présence du tampon acétique (AcOEt/AcO⁻, pH=4,3) est suffisante pour décomplexer les laques étudiées.

De plus, l'utilisation d'ultrasons [prototype SOLEX 180 (cf. Partie Exp., 2.1.2.)] à la solubilisation de la laque (ou de la fibre) dans le tampon acétique, permet une augmentation du rendement d'extraction ainsi que d'une diminution du temps et de la température de réaction.

Ce protocole a tout d'abord été appliqué à du Stil de grain (laque de jaune d'Avignon) réalisé au laboratoire avec les fruits immatures de *Rh. catharticus* commercialisés par la société Okhra (Roussillon, France) (cf. Partie Exp., 5.1.) et a été comparé à la décomplexation décrite par Wouters (HCl 37% -méthanol-eau (2:1:1, v:v)). Les extraits ont été analysés par CLHP-UV/Visible et les chromatogrammes obtenus sont décrits dans la **figure 3.2**.

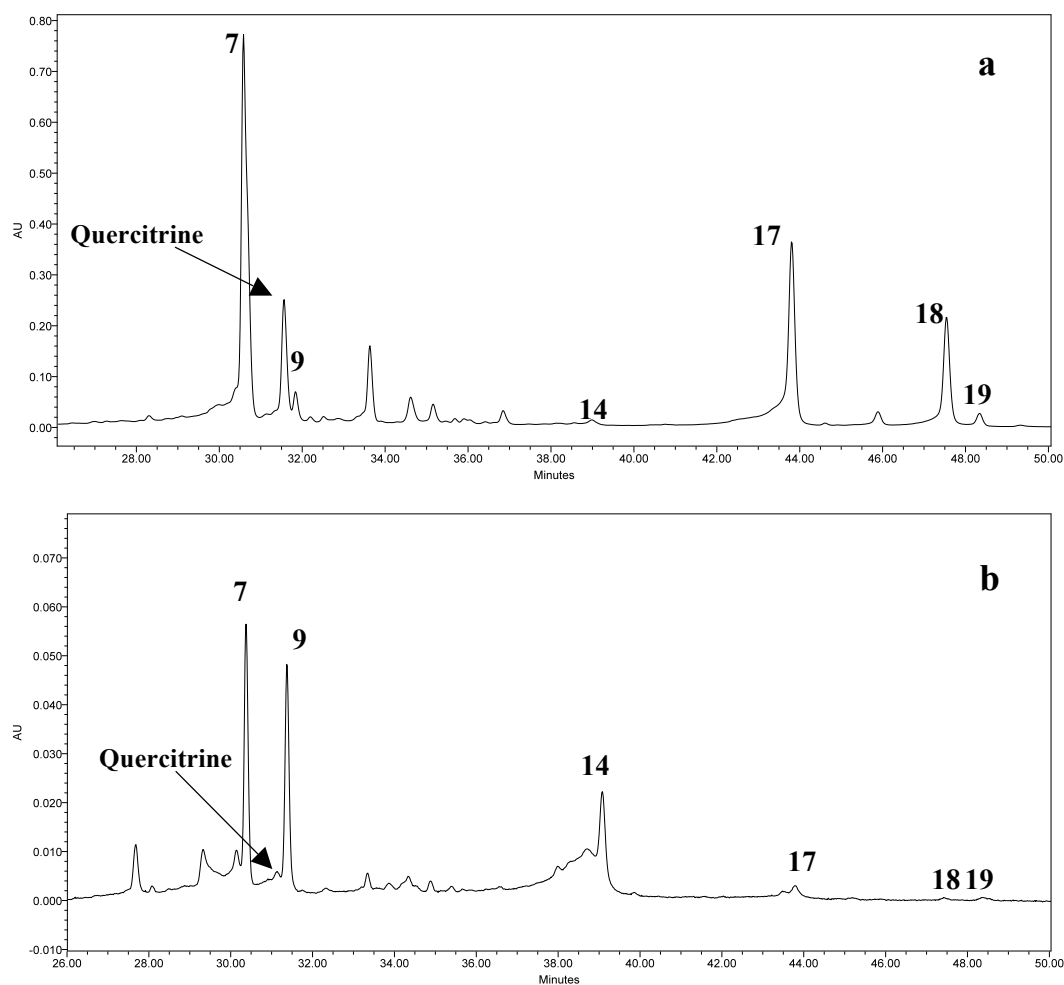


Figure 3.2. Chromatogrammes à 350 nm de l'extrait coloré après extraction par le tampon acétique (a) et par HCl à chaud (b).

Après analyse de la laque extraite par le tampon acétique (**Figure 3.2a**), des composés glycosylés ont été identifiés comme le 3-*O*-rhamninoside de rhamnétine (7), la quercitrine et le 3-*O*-rhamninoside de rhamnazine (9). Des flavonols aglycones sont également présents. Il s'agit de la quercétine (14), de la rhamnétine (17), de la rhamnazine (18) et de la rhamnocitrine (19). En ce qui concerne l'extraction de la laque jaune par HCl à chaud, on peut remarquer la perte de quercitrine au profit de la quercétine (14) (**Figure 3.2b**) ; à noter également la diminution du rapport entre le 3-*O*-rhamninoside de rhamnétine (7) et 3-*O*-rhamninoside de rhamnazine (9). Ce dernier est de 3/1 après l'extraction par le tampon acétique et de presque 1/1 après extraction par HCl. La comparaison des deux méthodes confirme donc les propriétés dénaturantes du procédé utilisant l'acide fort.

De même le chromatogramme issu de l'extraction avec le tampon acétique (**Figure 3.2a**) traduit la présence d'une population chimique beaucoup plus riche composée à la fois

de molécules hétérosidiques et aglycones. De plus, ces résultats sont en accord avec la composition chimique initiale des baies qui ont servi à la fabrication de cette laque.

Une étude complémentaire sur le rôle du tampon acétique dans ce protocole d'extraction a été effectuée dans notre laboratoire (Bourhis, 2008). Il a été démontré que son action dans la décomplexation n'est pas due à l'apport de proton dans le milieu, comme peut le faire l'acide chlorhydrique dans une décomplexation "dure". Le tampon acétique intervient en tant qu'agent complexant et rentrer en compétition avec les molécules colorantes. Cette hypothèse peut être validée par le calcul du diagramme de distribution des espèces en solution (**Figure 3.3**) basé sur les réactions de complexation de l'aluminium par l'ion acétate (Fein, 1991 ; Persson et al., 1998 ; Launay et al., 2001).

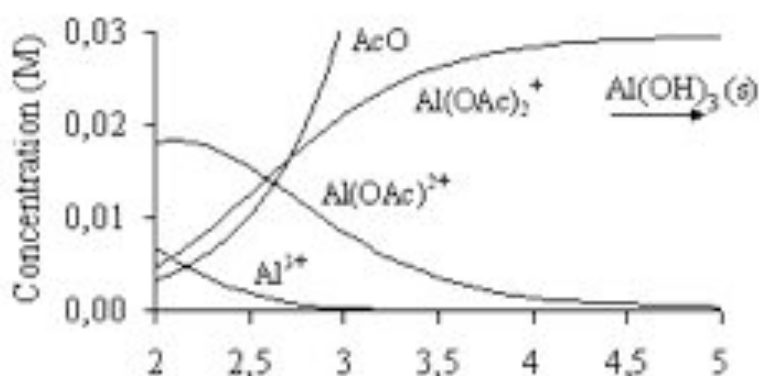


Figure 3.3. Courbes de distribution des espèces libres et complexées de l'acétate et de Al(III) en fonction du pH (Persson et al., 1998).

L'ion acétate a une activité de coordinant qui passe par la formation de complexes du type $[Al(OAc)]^{2+}$ et $[Al(OAc)_2]^{+}$. La valeur du pH est déterminante dans la quantité de complexe formé, ce qui influe sur la quantité de laque décomplexée et donc sur le rendement en colorants. En effet un pH trop élevé déplace l'équilibre du côté de l'hydroxyde d'aluminium, tandis qu'un pH trop bas limite la formation de complexes d'aluminium mais peut dégrader les colorants. Il convient dès lors de rester à des valeurs de pH proches de 4.

Ce protocole d'extraction des colorants a donc été utilisé sur une laque rose ancienne prélevée au Palais du Roure. Après traitement, l'échantillon a été analysé par chromatographie (**Figure 3.4**).

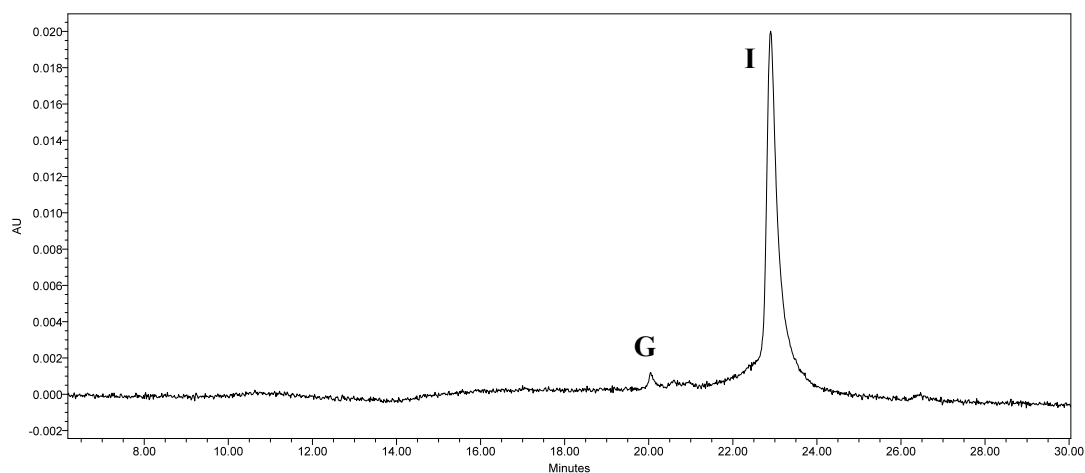


Figure 3.4. Chromatogramme à 450 nm de la laque de garance après décomplexation par le tampon acétique.

Dans cet extrait, la purpurine (**I**) ainsi que des traces d'alizarine (**G**) ont pu être identifiées. La présence d'alizarine permet d'affirmer que l'espèce utilisée, lors de la fabrication de cette laque, est la garance des teinturiers (*R. tinctorum*). Les laques roses, très prisées autrefois, sont composées d'une faible quantité de colorants rouges par rapport à l'alun (de couleur blanche). Malgré la faible concentration en colorant, la décomplexation de cette laque livre un chromatogramme convenable, permettant l'identification des composés et prouvant donc l'efficacité de la méthode de décomplexation employée.

Enfin, ce protocole d'extraction a pu être appliqué à l'analyse d'un tissu teint au laboratoire avec les fruits immatures de l'espèce *Rhamnus catharticus* (cf. Partie Exp., 5.2.1.). Le chromatogramme est présenté dans la **figure 3.5**.

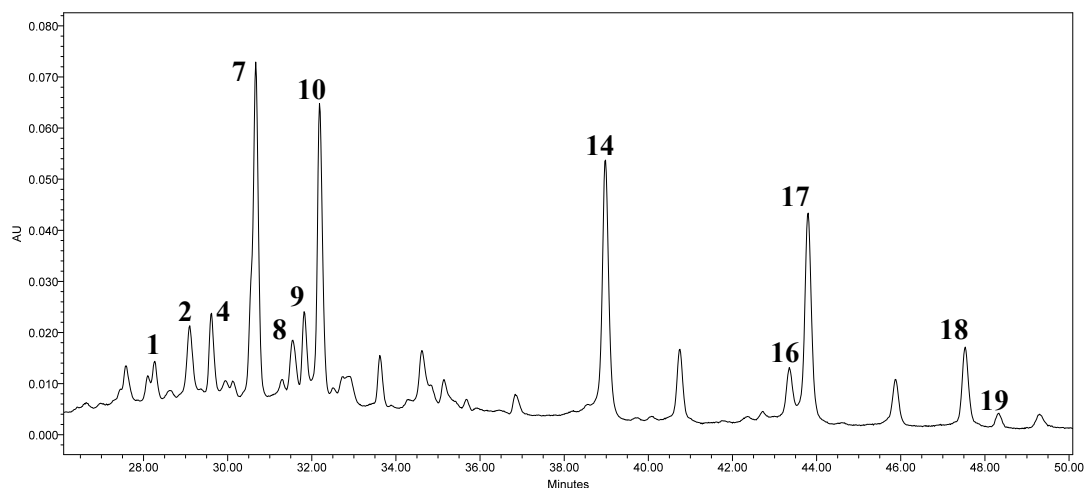


Figure 3.5. Chromatogramme à 350 nm des colorants extraits à partir d'un tissu après décomplexation par le tampon acétique.

Les colorants présents dans cet échantillon sont des composés glycosylés et aglycones. Les précurseurs sont des dérivés *O*-rhamnoside positionnés sur les flavonols en position 3 (composés **1**, **2**, **7**, **8** et **9**) et en position 4' (composés **4** et **10**). Les aglycones correspondent à la quercétine (**14**), le kaempférol (**16**), la rhamnétine (**17**), la rhamnazine (**18**) et la rhamnocitrine (**19**). Cette méthode de décomplexation “douce” est tout à fait applicable à l'extraction des colorants à partir de fibres textiles, puisque les composés identifiés sont en parfaite corrélation avec ceux initialement présents dans les baies employées pour teindre ce textile.

La mise en place de ce nouveau protocole de décomplexation des laques de garance présente un grand intérêt. En effet, il s'agit d'un procédé innovant, simple et rapide, réalisé dans des conditions douces ; de plus, il permet d'extraire avec succès et sans les dénaturer, les colorants anthraquinoniques contenus au sein des échantillons traités. Ceci engendre donc une étude chromatographique plus fine ainsi que la caractérisation de la composition réelle des colorants employée lors de la préparation des laques et des teintures, fournissant de plus amples renseignements sur leur nature chimique et botanique. Ces résultats ont pu être appliqués avec succès à un ensemble de textiles anciens provenant du musée Batha de Fès (Maroc). De plus, dans ce cadre, la validité du protocole établi a pu être vérifiée car appliquée à un ensemble de couleurs différentes identifiées à différentes sources colorantes végétales (Mathe et al., 2008).

Il est à noter qu'il existe de grands types de teinture de textiles : la première nécessite l'emploi préalable de mordant puis celle de colorant à mordant. La seconde se dispense de l'utilisation de mordant car le colorant subjectif se fixe directement sur la fibre textile. La teinture à l'indigo entre dans ce dernier cas de figure, alors que la plupart des autres colorants ont besoin d'un mordantage. En effet, les composés présents dans l'indigotier sont extraits puis fermentés dans le bain de teinture. C'est lors de leur oxydation par l'air que les colorants bleus, comme l'indigotine, apparaissent et sont fixés à la fibre. Ces substances sont totalement insolubles dans les solvants polaires et on doit employer des solvants comme le chloroforme, la pyridine, le diméthylformamide (DMF) ou le tétrahydrofurane (THF) pour les solubiliser avant leur étude par CLHP. Un protocole utilisant un mélange DMF-méthanol (1:1, v:v) a donc été choisi pour étudier les teintures à base d'indigo (Nowik et al., 2005 ; Surowiec et al., 2006). Les ultrasons (prototype à SOLEX 180) ont été appliqués à la solution afin d'en améliorer le rendement d'extraction.

I.2. IDENTIFICATION DES COLORANTS DE TEXTILES ANCIENS

Le Palais du Roure nous a donné la possibilité de prélever plusieurs échantillons de fibres textiles dans le but d'analyser voire d'identifier les colorants de deux indiennes. Le Museon Arlaten, quant à lui, nous a prêté six indiennes et nous a autorisé à prélever des fibres textiles issues d'un droulet et de divers jupons. Le descriptif de ces échantillons est présenté en **Annexe VI**. Les colorants ont donc été extraits à partir des fibres textiles en utilisant le tampon acétique et les chromatogrammes sont présentés en **Annexe VII**.

I.2.1. Le Palais du Roure

I.2.1.1. Indienne N° 7

La **figure 3.6** correspond à la photographie de la fibre textile analysée et permet de localiser précisément les lieux des différents prélèvements.

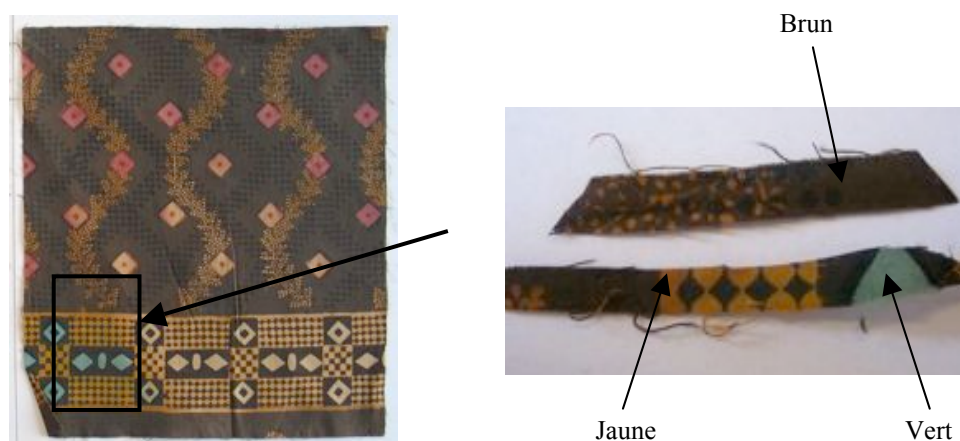


Figure 3.6. Représentation de l'Indienne N° 7.

L'analyse des fibres jaunes a permis d'identifier des composés flavonols caractéristiques du genre *Rhamnus*. Des flavonols *O*-rhamninoside liés en position 3 sont présents dont le 3-*O*-rhamninoside d'isorhamnétine. Comme il a été vu précédemment (cf. Partie 2, II.2.3.1.1.), ce composé n'est présent que dans l'espèce *Rh. saxatilis*. L'absence des composés *O*-acétyl-rhamninoside pourrait caractériser cette espèce en comparaison des deux autres également employées dans la fabrication jaune d'Avignon (*Rh. catharticus* et *Rh. alaternus*). De la même manière, les composés aglycones peuvent caractériser l'espèce *Rh.*

saxatilis avec la présence des six principaux flavonols : la quercétine, l'isorhamnétine, le kaempférol, la rhamnétine, la rhamnazine et la rhamnocitrine.

Dans la couleur brune, il a été identifié le 3-*O*-rhamninoside de quercétine, le 3-*O*-rhamninoside d'isorhamnétine, le 4'-*O*-rhamninoside de quercétine et le kaempférol. La quercitrine est également présente dans cet extrait et a été rencontrée dans un échantillon de *Rh. catharticus* (Romani et al., 2006). Cette couleur peut être un mélange de différents *Rhamnus* spp. Cette couleur brune peut être due à l'utilisation de baies mures ou d'un mordant ferrique.

Pour le colorant vert, il a été identifié le 3-*O*-rhamninoside de rhamnétine et le kaempférol. Ces deux composés sont présents dans le genre *Rhamnus* mais un manque d'information ne permet pas d'établir précisément l'espèce botanique utilisée. De plus, il a été identifié dans ce colorant vert, de l'indigotine. Ce composé, tout comme l'indirubine, sont présents dans différentes espèces d'Indigotier (*Indigofera* spp.) mais également dans les pastels (*Isatis* spp.) et les renouées (*Polygonum* spp.). En ce qui concerne la répartition géographique des différentes plantes à indigo, on peut observer que les indigotiers, plantes les plus utilisées pour l'extraction des composés indigoïdes, se localisent en Amérique Centrale, en Afrique, au Moyen-Orient ainsi qu'en Asie Orientale. Les pastels sont présents de l'Europe jusqu'à l'Asie de l'Est et les renouées en Chine et au Japon. De part la localisation de nos échantillons de tissus, nous pouvons supposer que les espèces utilisées pour la fabrication de bleu sont les pastels et/ou les indigotiers. Cette coloration verte a donc été identifiée à un mélange de *Rhamnus* spp. et d'*Isatis* spp. et/ou d'*Indigofera* spp.

Tableau 3.1. Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 7.

Matériaux	Couleurs	Identification
Coton	Jaune	<i>Rhamnus saxatilis</i> (nerprun des rochers)
	Brun	<i>Rhamnus</i> spp.
	Vert clair	<i>Rhamnus</i> spp. + <i>Isatis</i> spp. et/ou <i>Indigofera</i> spp.

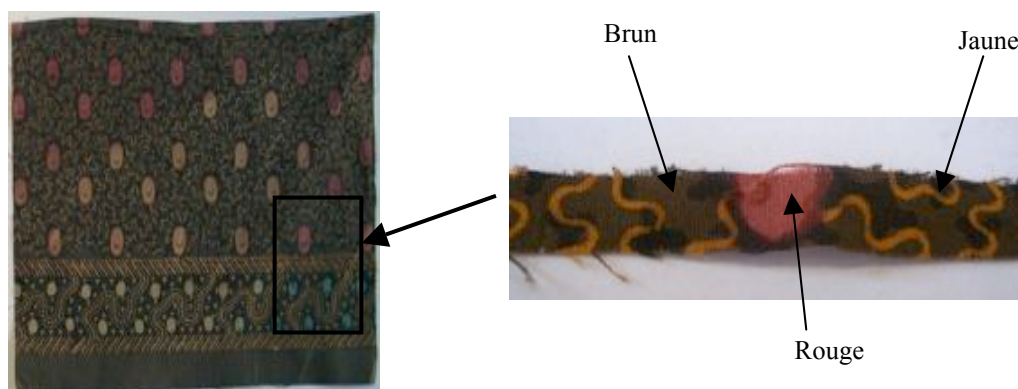
I.2.1.2. Indienne N°102

Figure 3.7. Représentation de l'Indienne N° 102.

Après analyse des fibres jaunes, des flavonols glycosylés ont été identifiés correspondant aux 3-*O*-rhamninosides de quercétine, de kaempférol, d'isorhamnétine, de rhamnétine et de rhamnazine. Leurs composés aglycones correspondants ainsi que la rhamnocitrine sont également présents dans l'échantillon. La présence du noyau de l'isorhamnétine ainsi que l'absence de dérivés 4'-*O*-rhamninoside permet de conclure à l'utilisation des fruits de l'espèce *Rh. saxatilis*. La couleur brune contient le 3-*O*-acétyl-rhamninoside de kaempférol, le 3-*O*-rhamninoside de rhamnétine, la quercitrine ainsi que la quercétine et le kaempférol. Cette teinture a pu être réalisée à partir des fruits matures des espèces *Rh. saxatilis* et *Rh. catharticus*. Enfin, le colorant rouge n'a pas pu être identifié toutefois l'hypothèse de la présence de garance ou de cochenille a pu être écartée.

Tableau 3.2. Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 102.

Matériaux	Couleurs	Identification
Coton	Jaune	<i>Rhamnus saxatilis</i> (nerprun des rochers)
	Brun	<i>Rhamnus saxatilis</i> (nerprun des rochers) + <i>Rhamnus catharticus</i> (nerprun purgatif)
	Rouge	Non identifié

I.2.2. Le Museon Arlaten

I.2.2.1. Les indiennes

I.2.2.1.1. Indienne N° 1997.14.1

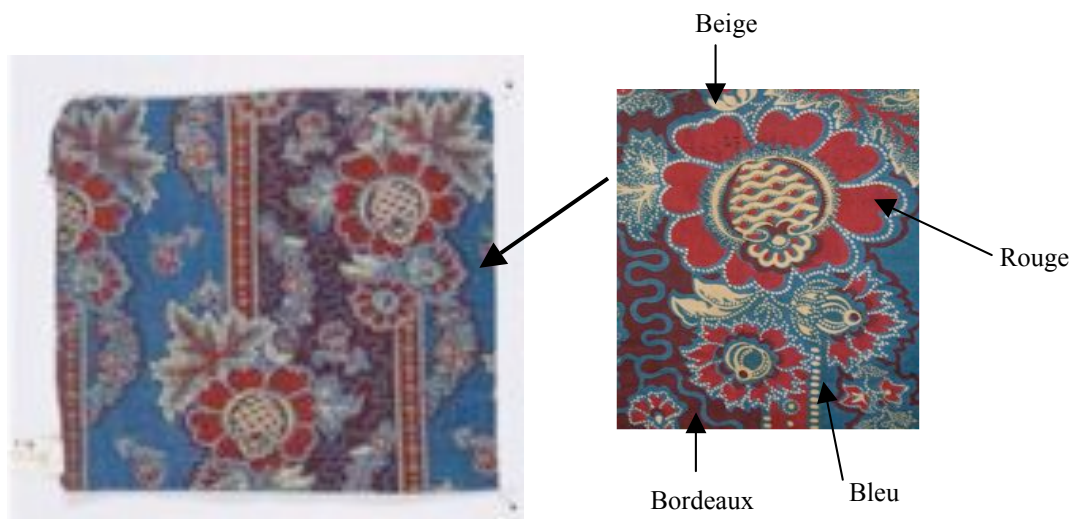


Figure 3.8. Représentation de l'Indienne N° 1997.14.1.

Après analyse, il a été identifié de l'alizarine dans la couleur bordeaux, et l'alizarine ainsi que de la purpurine dans la couleur rouge ont été identifiés. Cela nous permet de conclure que ces fibres textiles ont été imprimées avec l'espèce *R. tinctorum* (garance des teinturiers). De même, il a été identifié, dans les fibres bleues, de l'indigotine et de l'indirubine concluant à l'utilisation d'*Isatis* spp. et/ou d'*Indigofera* spp.

Tableau 3.3. Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 1997.14.1.

Matériaux	Couleurs	Identification
Coton	Rouge	<i>Rubia tinctorum</i> (Garance des teinturiers)
	Bleu	<i>Isatis</i> spp. et/ou <i>Indigofera</i> spp.
	Bordeaux	<i>Rubia tinctorum</i> (Garance des teinturiers)

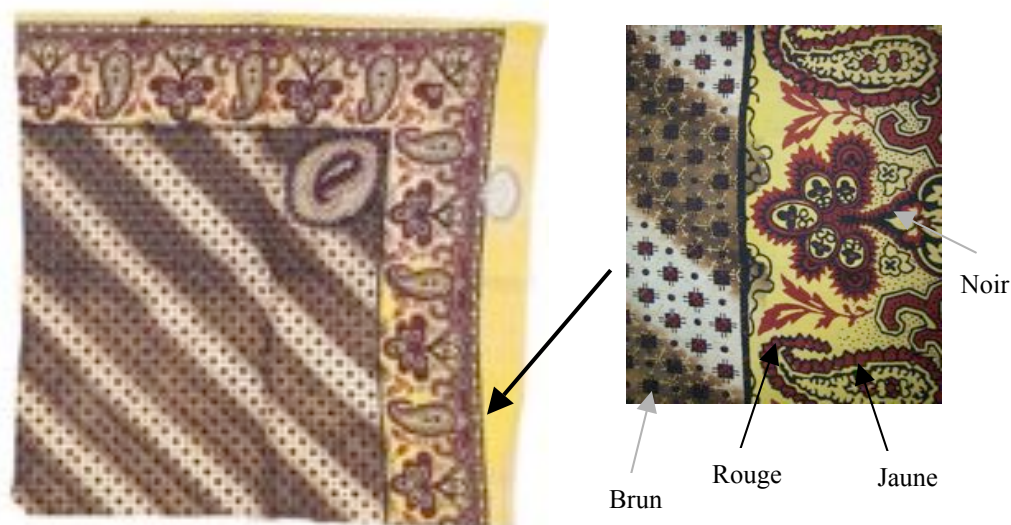
I.2.2.1.2. Indienne N° 2002.0.610

Figure 3.9. Représentation de l'Indienne N° 2002.0.610.

La présence d'alizarine et de purpurine dans les fibres rouges et noires, et de l'alizarine seule dans les fibres brunes, montre qu'elles ont été imprimées avec l'espèce *Rubia tinctorum* (garance des teinturiers) tout en utilisant différents mordants. En ce qui concerne les fibres jaunes, des flavonols glycosylés ont été identifiés comme les 3-*O*-rhamninosides de quercétine, de kaempférol et de rhamnétine, ainsi que les 3-*O*-acétyl-rhamninosides de rhamnocitrine et de rhamnazine. De plus, la rhamnazine aglycone a également été identifiée. La présence des dérivés 3-*O*-acétyl-rhamninoside permet d'affirmer que ce colorant provient des fruits immatures de *Rh. saxatilis* (nerprun des rochers).

Tableau 3.4. Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 2002.0.610.

Matériaux	Couleurs	Identification
Coton	Rouge	<i>Rubia tinctorum</i> (Garance des teinturiers)
	Jaune	<i>Rhamnus saxatilis</i> (Nerprun des rochers)
	Noir	<i>Rubia tinctorum</i> (Garance des teinturiers)
	Brun	<i>Rubia tinctorum</i> (Garance des teinturiers)

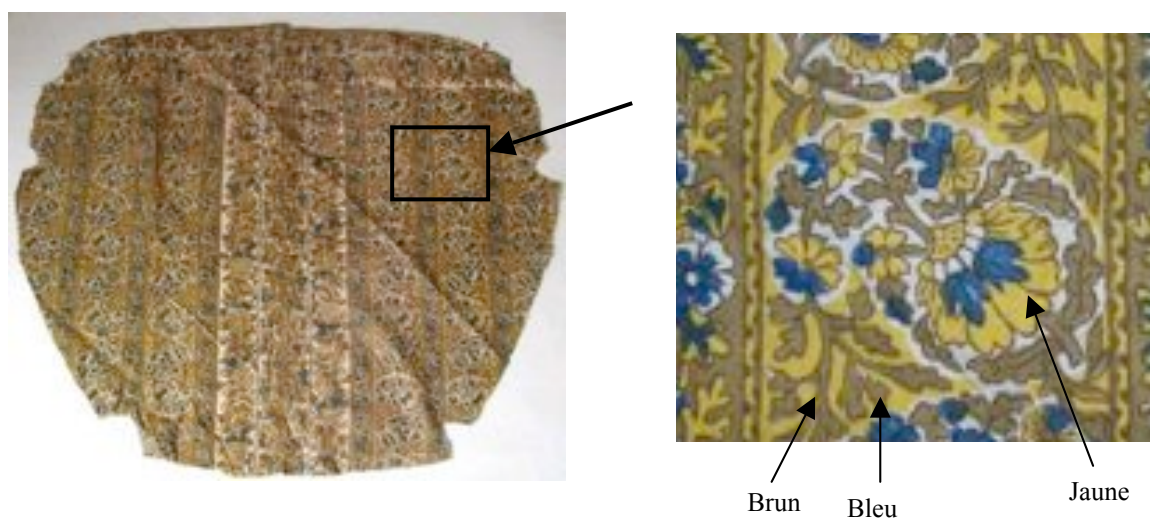
I.2.2.1.3. Indienne N° 2003.0.777

Figure 3.10. Représentation de l'Indienne N° 2003.0.777.

Le colorant utilisé pour l'impression des fibres textiles jaunes et brunes a été identifié à l'espèce *Reseda luteola* (gaude) de part la présence de lutéoline et de ses dérivés mono- et di-glucosilés, ainsi que d'apigénine. De plus, l'indigotine et l'indirubine ont été caractérisées lors de l'analyse des fibres bleues.

Tableau 3.5. Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 2003.0.777.

Matériaux	Couleurs	Identification
Coton	Jaune	<i>Reseda luteola</i> (Gaude)
	Brun	<i>Reseda luteola</i> (Gaude)
	Bleu	<i>Isatis</i> spp. et/ou <i>Indigofera</i> spp.

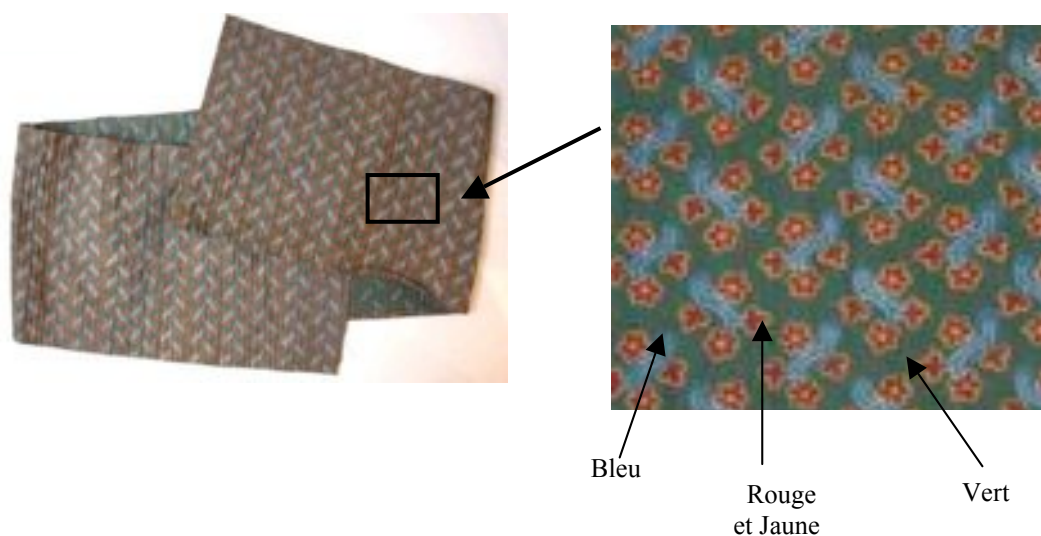
I.2.2.1.4. Indienne N° 2002.0.1458

Figure 3.11. Représentation de l'Indienne N° 2002.0.1458.

L'alizarine a été mise en évidence dans les fibres rouges indiquant une utilisation de *Rubia tinctorum* (garance des teinturiers). Dans le même sens l'indigotine, dans les fibres bleues, montre une impression avec un indigoïde. Dans les fibres jaunes et vertes, il a été identifié des composés flavonols comme le 3-*O*-acétyl-rhamninoside de kaempférol caractéristique du *Rh. saxatilis* (nerprun des rochers). De plus, on peut noter la présence du 4'-*O*-rhamninoside de kaempférol et de la quercitrine nous permettant de supposer l'emploi de *Rh. catharticus* (nerprun purgatif). Enfin, l'indigotine a été identifiée dans les fibres vertes montrant l'utilisation d'un mélange à base d'indigoïde et de nerprun dans cette couleur.

Tableau 3.6. Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 2002.0.1458.

Matériaux	Couleurs	Identification
Coton	Rouge	<i>Rubia tinctorum</i> (Garance des teinturiers)
	Jaune	<i>Rhamnus catharticus</i> (Nerprun purgatif) + <i>Rhamnus saxatilis</i> (Nerprun des rochers)
	Vert	Indigoïde + <i>Rhamnus catharticus</i> (Nerprun purgatif) + <i>Rhamnus saxatilis</i> (Nerprun des rochers)
	Bleu	<i>Isatis</i> spp. et/ou <i>Indigofera</i> spp.

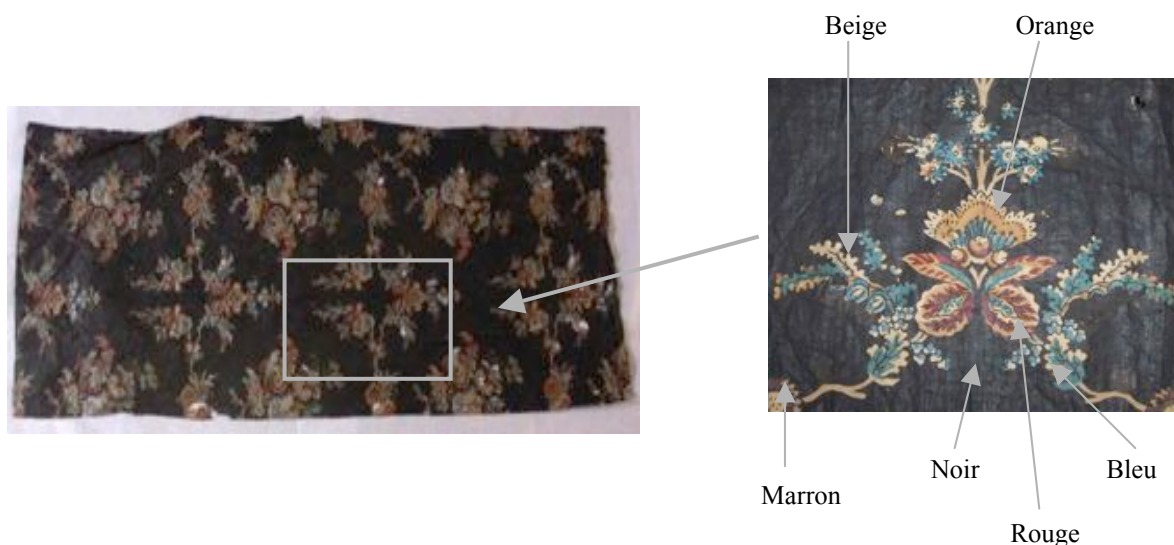
I.2.2.1.5. Indienne N° 2002.0.120

Figure 3.12. Représentation de l'Indienne N° 2002.0.120.

Les fibres rouges, noires et marrons contiennent de l'alizarine correspondant donc à l'espèce *Rubia tinctorum* (garance des teinturiers). Les fibres de couleur orange correspondent à un mélange de rouge et de jaune et identifiées à *R. tinctorum* (présence d'alizarine) et à *Rh. catharticus* (présence de dérivés 3-O-rhamninoside ainsi que de quercitrine). Enfin, les bleues ont été obtenues à l'aide d'indigoïde de part la présence d'indirubine.

Tableau 3.7. Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 2002.0.120.

Matériaux	Couleurs	Identification
Coton	Orange	<i>Rhamnus saxatilis</i> (Nerprun des rochers) + <i>Rubia tinctorum</i> (Garance des teinturiers)
	Marron	<i>Rubia tinctorum</i> (Garance des teinturiers)
	Noir	<i>Rubia tinctorum</i> (Garance des teinturiers)
	Rouge	<i>Rubia tinctorum</i> (Garance des teinturiers)
	Bleu	<i>Isatis</i> spp. et/ou <i>Indigofera</i> spp

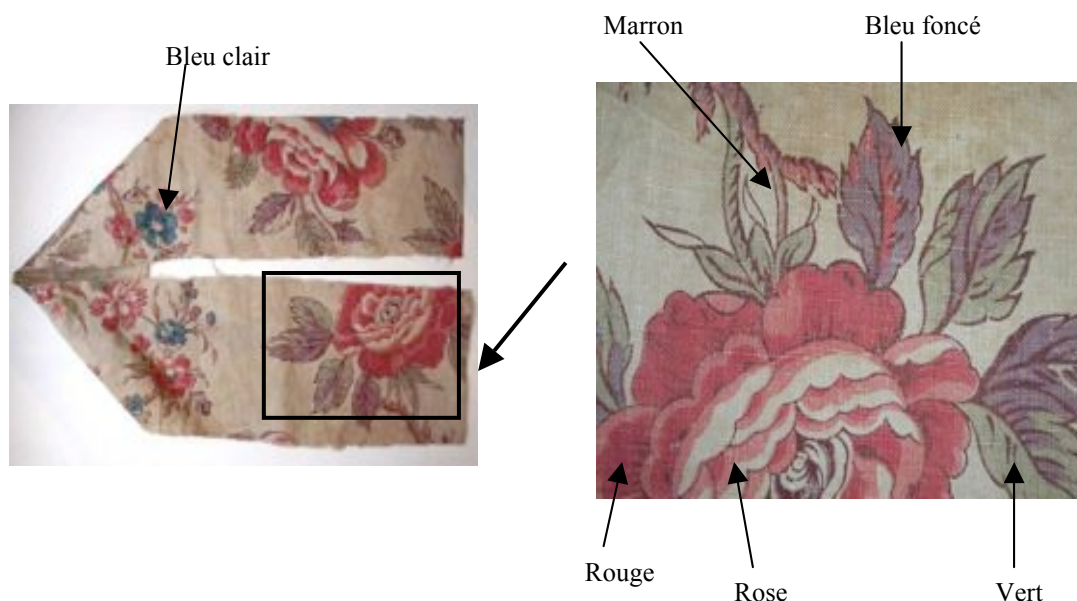
I.2.2.1.6. Indienne N° 2002.0.1452

Figure 3.13. Représentation de l'Indienne N° 2002.0.1452.

La présence d'alizarine dans les fibres rouges et roses nous permet de conclure qu'elles ont été imprimées avec l'espèce *Rubia tinctorum* (garance des teinturiers). Les fibres bleues proviennent d'un indigoïde de part la présence d'indirubine. On peut ajouter que le bleu foncé a été obtenu par ajout de *Rubia tinctorum* sur l'indigoïde. Enfin, le vert est un mélange de bleu (présence d'indigotine et d'indirubine) et de jaune, qui n'a pas pu être déterminé. Cependant la présence de nerprun et de gaude a pu être écartée.

Tableau 3.8. Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 2002.0.1452.

Matériaux	Couleurs	Identification
Coton	Bleu clair	Indigoïde
	Bleu foncé	<i>Isatis</i> spp. et/ou <i>Indigofera</i> spp. + <i>Rubia tinctorum</i> (Garance des teinturiers)
	Rouge	<i>Rubia tinctorum</i> (Garance des teinturiers)
	Rose	<i>Rubia tinctorum</i> (Garance des teinturiers)
	Vert	<i>Isatis</i> spp. et/ou <i>Indigofera</i> spp. + non identifié

I.2.2.2. Les droulets et les jupons

Figure 3.14. Représentation d'un droulet (à gauche) et d'un jupon (à droite).

La présence d'indigotine et d'indirubine dans la fibre bleue et d'alizarine dans les fibres rouges permet de conclure à l'utilisation respective d'un indigoïde et *Rubia tinctorum* (garance des teinturiers). Enfin dans les fibres de couleur violette, un indigoïde (2003.0.812) et un mélange indigoïde-garance des teinturiers (2003.0.835) ont été identifiés.

Tableau 3.9. Récapitulatif de l'identification des colorants sur l'Indienne N° 2002.0.1452.

N°	Modèle	Localisation	Couleurs	Identification
2003.0.835	Jupon	Surpiqûre basse	Rouge	<i>Rubia tinctorum</i> (Garance des teinturiers)
		Intérieur	Violet	<i>Rubia tinctorum</i> (Garance des teinturiers) + <i>Isatis</i> spp. et/ou <i>Indigofera</i> spp.
2003.0.802	Jupon	Inconnue	Bleu	<i>Isatis</i> spp. et/ou <i>Indigofera</i> spp.
2002.0.113	Droulet	Inconnue	Rouge	<i>Rubia tinctorum</i> (Garance des teinturiers)
2003.0.812	Jupon	Au niveau de la taille	Violet	<i>Isatis</i> spp. et/ou <i>Indigofera</i> spp.

Chapitre II. Essais de teinture en collaboration avec la société textiles Les Olivades®

II.1. LA SOCIÉTÉ LES OLIVADES

II.1.1. Historique

C'est Léonard Quinche, un protestant genevois, imprimeur sur tissus, qui est à l'origine de la société. En 1818, il s'associe avec deux Tarasconnais pour créer une fabrique d'indiennes à St Etienne-du-Grès. La société passe de main en main jusqu'en 1948, date à laquelle elle est transformée en Société Avignonnaise d'Impressions sur Tissus (S.A.I.T.) par Pierre Boudin associé à Charles Demery, chargé du style et de la commercialisation des tissus et des produits dérivés. En 1976, la collaboration initiée vingt et un ans plus tôt prend fin, et en 1977, Pierre et Paule Boudin créent Les Olivades, société actuellement dirigée par leur fils, Jean-François Boudin.

II.1.2. L'impression sur tissus

L'impression d'un tissu se réalise en différentes étapes. Avant impression le tissu brut est soumis à des traitements (flambage, blanchiment et caustification). Le flambage consiste à enlever le duvet de surface se trouvant sur le tissu en le faisant passer sur une rampe de gaz. Le blanchiment a pour but de retirer les résidus et les produits d'encollage qui ont servis au tissage. Cette opération est réalisée dans de l'eau complétée par du peroxyde d'hydrogène et des enzymes. Sous l'effet de ce mélange, le tissu va en 4 heures passer de l'écru au blanc. Le tissu est séché, puis enroulé pour subir la manipulation suivante. La caustification (ou mercerisage) consiste à faire passer le tissu de coton dans un bain de soude afin d'améliorer sa stabilité, son fini et son touché. Après ce bain de soude, le tissu doit à nouveau être lavé, séché puis repassé en rame pour sa transformation en imprimé.

Pour l'impression des tissus, nos ancêtres utilisaient une planche de bois selon un procédé ramené des Indes. Cette technique a été employée dans l'entreprise Les Olivades® jusqu'en 1950. À partir de 1936, le procédé utilisant un cadre métallique sur lequel est tendu un tissu polyester a été appliqué (**Figure 3.15**). Le textile du cadre est enduit d'un produit photosensible vernis sur lequel la zone d'impression a été formée.



Figure 3.15. Cadre métallique pour l'impression.

Chaque cadre correspond à une zone de dessin et il y a autant de cadres que de couleurs. Pour une nappe constituée de 11 zones où dans chacune la couleur imprimée va être identique, il faudra 11 cadres pour imprimer les 11 couleurs qui par juxtaposition et imbrication vont constituer la nappe imprimée.

L'automatisation de l'impression est réalisée à l'aide d'une table (**Figure 3.16**), dont le système est proche des anciennes techniques d'impressions manuelles. En effet, le tissu est posé sur la table mesurant 70 m de long. Cette table est chauffée pour permettre une meilleure adhérence du tissu et un meilleur séchage des couleurs déposées (**Figure 3.16**). À l'aide d'un chariot automatique, le cadre se déplace, se pose avec précision et par l'action d'un balayage de racle, la couleur est déposée sur le tissu à travers les zones non vernies du cadre.

Une technique alternative peut être utilisée, où à l'inverse de la table, les cadres ne se déplacent pas sur le tissu mais sont fixes. C'est le tissu qui se déroule sur le tapis et se déplace pas à pas sous les cadres.

Les colorants actuellement utilisés sont d'origine synthétique et sont solubilisés dans un mélange comprenant de l'alginate de sodium, qui sert de véhiculant aux colorants et participe à leur fixation sur la fibre textile.



Figure 3.16. Colorants (à gauche) et table (à droite) utilisés pour l'impression des tissus.

Après l'impression, la couleur déposée sur le tissu n'est pas fixée. Une étape de fixation est donc indispensable pour lier les colorants à la fibre textile. Pour cela, le tissu est placé dans une enceinte fermée remplie de vapeur où il va séjourner entre 10 et 40 min en fonction des colorants, fibres et procédés utilisés. Le tissu imprimé peut maintenant être lavé, séché, puis débité en petit rouleaux où il sera contrôlé visuellement pour savoir s'il correspond aux critères de qualité Les Olivades[®].

Différents imprimés sur coton, commercialisés par Les Olivades, sont présentés **figure 3.17**.



Figure 3.17. Motifs commercialisés par Les Olivades.

II.2. ESSAIS DE TEINTURE

Des essais de teinture ont été réalisés au laboratoire en utilisant les substances tinctoriales naturelles précédemment étudiées (garance, gaude et nerpruns) ainsi que l'indigo, la cochenille ou encore le fustet, nous permettant d'expérimenter l'association fibre-colorant d'un large éventail de colorants. Ces essais ont été effectués sur du coton (fibre cellulosique caractéristique des indiennes) et pourraient être appliqués, par la société Les Olivades[®], à la fabrication d'une collection de tissus imprimés à base de colorants naturels.

La technique de la teinture des fibres cellulosiques fut découverte tardivement en Europe, à la faveur des grandes navigations. Les techniques de la teinture sur coton, importées des Indes, inspirèrent les Occidentaux qui les adaptèrent à leur manière.

Contrairement à la laine et à la soie, l'alun ne s'accroche pas de lui-même sur les fibres cellulosiques. Dans ces conditions, une autre substance est utilisée pour faciliter la

fixation du mordant sur le coton : il s'agit des tannins. Les noix de galle ainsi que le sumac sont des matières végétales très riches en tannin et sont souvent employés pour effectuer cette étape. La préparation du coton, avant l'impression ou la teinture, consiste donc en une étape "d'alunage" suivie d'une étape "d'engallage" (Garcia, 2005).

Des essais de teintures (cf. Partie Exp., 5.2.1.) ont donc été réalisés en utilisant la garance des teinturiers (*Rubia tinctorum*), la gaude (*Reseda luteola*), le nerprun purgatif (*Rhamnus catharticus*), la cochenille (*Dactylopius coccus*) et le fustet (*Cotinus coggygria*) (Figure 3.19).

En ce qui concerne la couleur bleue, ce sont les plantes à indigo qui ont été majoritairement employées. Comme on a pu le voir précédemment, les colorants extraits de ces plantes tels que l'indigotine et l'indirubine, sont totalement insoluble dans l'eau. Ils sont considérés comme des pigments organiques. Donc, pour réaliser une teinture ou une impression avec ces composés, leur solubilisation est obligatoire pour lier le colorant à la fibre textile. Un protocole a été utilisé pour des essais de teinture à l'indigo (Cardon, 2003). Il implique un processus de réduction en milieu alcalin des composés indigoïdes formant du leuco-indigo (du grec *leukos*, blanc), forme peu colorée se transformant en sel par l'action d'une base. C'est sous cette forme soluble que la fibre textile s'imprègne du produit, lequel, à la sortie du bain de teinture, se transforme de nouveau en indigo sur la fibre, sous l'action de l'oxygène de l'air (Figure 3.18).

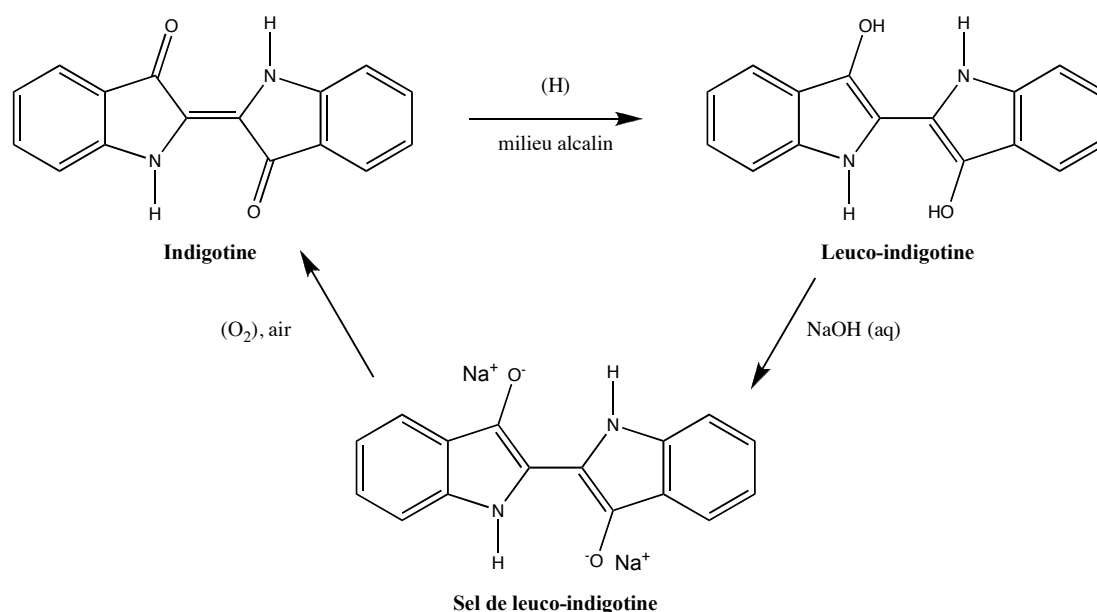


Figure 3.18. Réduction de l'indigo en sel de leuco-indigo et régénération par oxydation.

Ce procédé (cf. Partie Exp., 5.2.2.) a été appliqué à des essais de teinture utilisant un échantillon d'indigo (*Indigofera tinctoria*) (**Figure 3.19**).

Enfin, des teintures vertes ont été effectuées en mélangeant du jaune, produit par de la gaude ou par des nerpruns, et du bleu indigo (**Figure 3.19**).



Figure 3.19. Essais de teinture sur coton.

Toutes ces expérimentations sur l'impression et la teinture de colorants naturels sur des fibres cellulosiques ont pu être poursuivies au sein même de l'entreprise où nous avons pu concilier les recettes anciennes aux systèmes d'impression modernes. Des essais sur du coton pré-traité et utilisant l'alginate comme véhiculant ont été réalisés avec des extraits de garance et de nerprun dans le but de valider une possible automatisation de la teinture par des colorants naturels. Ils pourront être poursuivis par l'impression de motifs polychromes avant d'être appliqués à la fabrication de nouvelles collections.

BILAN ET PERSPECTIVES

Le sujet de cette thèse porte sur l'étude des colorants naturels anciennement employés dans la fabrication des indiennes. Trois colorants d'origine végétale ont été étudiés : ils proviennent de la garance pour le rouge, de divers nerpruns ou de la gaude pour le jaune.

La composition chimique de la garance (*Rubia tinctorum*) étant largement étudiée depuis de nombreuses années, nous nous sommes concentrés sur l'extraction des colorants anthraquinoniques à partir de ses racines. Un protocole utilisant les ultrasons a donc été établi avec succès pour l'extraction des différentes molécules responsables de la couleur rouge. De plus, les conditions d'extraction (temps, température et solvant) ont pu être optimisées en employant un modèle mathématique des plans d'expérience, dans le but de mettre en place un procédé d'extraction simple, rapide, efficace et non dénaturant pouvant être employé aussi bien pour l'analyse en laboratoire que pour l'obtention quantitative des colorants dans le domaine industriel.

La procédure optimisée a été comparée à la méthode conventionnelle, utilisant un chauffage au reflux, ainsi qu'à une méthode employant une simple agitation magnétique. La méthode utilisant les ultrasons permet un gain au niveau du rendement et du temps d'extraction, tout en opérant à faible température, comparativement au chauffage par reflux pouvant initier une dénaturation thermique des colorants. Dans un même temps, les racines de garance ont été étudiées d'un point de vue cytohistologique, afin d'examiner les effets des différents procédés d'extraction utilisés. Après extraction par ultrasons, les racines présentent une profonde perturbation de la structure du phloème, avec des parois cellulaires amorphes décrivant des sortes de saignées, caractérisant le phénomène de cavitation associé à ces ondes. Les canaux ainsi formés au niveau cellulaire par l'effet des ultrasons permet de mieux visualiser leur action à l'échelle microscopique et permet également une meilleure compréhension des résultats expérimentaux obtenus. En effet, les colorants de la garance étant essentiellement situés au cœur de la racine (phloème et parenchyme), il s'avère nécessaire de traverser les différentes parois afin de pouvoir libérer efficacement ces molécules.

La deuxième partie concerne l'étude de deux colorants jaunes issus, pour le premier, de différentes espèces de nerprun (genre *Rhamnus*) et de la gaude (*Reseda luteola*) pour le second. Le jaune d'Avignon est fabriqué à partir des fruits immatures des espèces *Rhamnus saxatilis*, *Rh. alaternus* et *Rh. catharticus*, composés majoritairement de flavonols glycosylés. Une étude chromatographique par CLHP/UV-Visible/SM a permis d'identifier les composés

présents dans ces trois espèces. Il a pu être déterminé que les trois espèces contiennent toutes des flavonols 3-*O*-rhamninosides. De plus, l'espèce *Rh. saxatilis* présente des composés 3-*O*-acétyl-rhamninosides pouvant caractériser cette espèce. Les deux autres espèces (*Rh. alaternus* et *Rh. catharticus*) renferment des composés glycosylés dont la partie rhamninoside est liée sur le flavonol en position 4'. Cependant, ces espèces n'ont pas pu être différenciées chimiquement. Les conditions chromatographiques établies permettent donc de distinguer chimiquement sans ambiguïté *Rh. saxatilis* des deux autres espèces. En ce qui concerne la différenciation de ces deux dernières espèces, une étude plus approfondie sur un plus grand nombre d'échantillons sera ultérieurement réalisée.

Les fruits matures des diverses espèces de *Rhamnus* ont été aussi par le passé utilisés en pharmacologie et en peinture. En effet, ces fruits étaient employés lors de la fabrication d'un vert, appelé vert de vessie. La composition chimique des fruits matures de plusieurs espèces de *Rhamnus* (commerciales, récoltées et fournies par différents botanistes) a été étudiée et comparée. La partie flavonol a, tout d'abord, été examinée. Elle présente toujours des composés glycosylés mais des flavonols aglycones, comme la quercétine ou la rhamnétine, ont aussi été identifiés. Ces derniers sont issus de l'hydrolyse enzymatique des précurseurs glycosylés. Ces fruits matures renferment également des anthraquinones qui ont été séparées des flavonols et concentrées par extraction sur phase solide (SPE). Après optimisation des conditions chromatographiques, les anthraquinones ont été isolées dans le but de les caractériser par RMN. Des dérivés rhamnoside et arabinoside acétylés de l'émodyne, jamais identifiés dans la littérature, ont été identifiés dont le 3', 4'-diacétyl-arabinopyranoside-6-*O*-émodyne et 2', 3', 4'-triacétyl-arabinopyranoside-6-*O*-émodyne présents seulement dans l'espèce *Rhamnus alaternus*. La différenciation des trois espèces est donc possible grâce à l'étude conjointe de la partie flavonoïdique et de la partie anthraquinonique.

De leur côté, les colorants jaunes de la gaude (*Reseda luteola*) ont également été étudiés par électrophorèse capillaire. En comparaison avec la CLHP, un gain important du temps d'analyse a été noté tout en conservant une séparation convenable. Ces premiers résultats sont très encourageants, cependant la diminution de la sensibilité en électrophorèse capillaire nécessite d'optimiser ce protocole, pour une application à l'analyse d'échantillons de textile anciens, souvent de très petite taille, et contenant très peu de matière colorante.

Enfin, l'ensemble de ces résultats expérimentaux a pu être transposé avec succès à l'étude des colorants extraits à partir d'échantillons d'indiennes du XIX^{ème} siècle. L'origine botanique de la majorité des colorants présents sur ces échantillons a pu être clairement déterminée ; ceci conforte l'efficacité des protocoles préalablement établis.

On peut donc noter que les fabricants d'indiennes utilisaient de nombreuses couleurs qui pour la majorité étaient issues de plantes tinctoriales régionales. De plus, ces artisans avaient développé certains savoir-faire pour la préparation de la couleur, comme la garance, ou au niveau de la fixation de la couleur sur la fibre textile. Ces techniques traditionnelles ont pu être appliquées lors d'essais de teinture dans le but de développer, en collaboration avec Les Olivades, une gamme de textiles à base de colorants naturels.

La poursuite de ces travaux sera réalisée dans le cadre d'un poste d'ATER et nous nous attacherons principalement à l'étude du vert de vessie, dont la préparation est très peu connue et très ancienne. Des essais ont déjà été réalisés au laboratoire dans le but de mettre en place un protocole de fabrication de ce vert. Il a ainsi été possible de précipiter une laque verte en traitant le jus des fruits matures des nerpruns par un sel d'aluminium en milieu basique. Il est intéressant de noter que ces premiers travaux montrent déjà que la couleur verte ne résulte pas de la présence d'un colorant vert, mais de l'association des flavonols de couleur jaune avec les anthocyanes, apparues dans les pellicules avec la maturation, et responsables d'une couleur bleue en milieu basique. De ce fait, la partie anthocyanique des fruits matures des nerpruns devra être particulièrement étudiée.

Enfin, notre intérêt pourra porter également sur l'extraction assistée par ultrasons d'autres colorants naturels utilisés en teinture.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. GÉNÉRALITÉS

1.1. Réactifs et solvants

Le méthanol est employé pour extraire les matières végétales (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). L'acétonitrile de grade analytique (Fisher Scientific) est utilisé comme éluant pour l'analyse chromatographique. Lors de l'analyse cytohistologique, les racines de garance ont été déshydratées avec de l'éthanol (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Enfin, l'extraction des colorants bleus à partir des fibres textiles a été réalisée avec du diméthylformamide (Acros Organics, Geel, Belgique). Les réactifs utilisés sont décrits dans le **tableau E.1**.

Tableau E.1. Réactifs utilisés.

Réactifs	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Numéro CAS	Fournisseur
acide chlorhydrique	36,46	[7647-01-0]	Acros Organics
acide trifluoroacétique	114,02	[76-05-1]	Acros Organics
acide périodique de Shiff	227,94	[10450-60-9]	Sigma Aldrich
noir amide 10B	616,50	[1064-48-8]	Sigma Aldrich
acide acétique	60,05	[64-19-7]	VWR
acétate de sodium	82,03	[127-09-3]	Carlo Erba
formol	30,02	[50-00-0]	Sigma Aldrich

1.2. Systèmes chromatographiques

1.2.1. CLHP/UV-Visible

Les analyses CLHP/UV-Visible ont été réalisées à l'aide d'une chromatographie liquide haute performance comprenant une pompe à gradient quaternaire Waters 600, un injecteur Rhéodyne 7125 équipé d'une boucle d'injection de 20 µL et une barrette de photodiodes Waters 2296. Le système est équipé d'une colonne C18-e (Symmetry Shield RP18, Waters 5 µm, 4,6 × 250 mm) et contrôlé par le logiciel Empower 2.

1.2.2. CLHP/UV/SM

Le matériel se compose d'une chromatographie liquide haute performance VWR-Hitachi incluant une pompe à gradient quaternaire L-2130, un passeur automatique (injection de 20 μL) L-2200 et un détecteur UV/Visible L-2455. La spectrométrie de masse a été réalisée en utilisant un détecteur Bruker Daltonics Esquire 6000 (Bruker Daltonik, Allemagne). Les spectres de masse ont été obtenus à l'aide d'une ionisation par électrospray en mode positif et négatif avec une fragmentation à bas et haut voltage (100 and 250 V) entre m/z 50-3000. Le système est équipé d'une colonne C18-e (Symmetry Shield RP18, Waters 5 μm , 4,6 \times 250 mm) et contrôlé par le logiciel Hystar (ver. 3.2).

2. ETUDE DE LA GARANCE

2.1. Étude des colorants

2.1.1. Étalons

Tableau E.2. Anthraquinones utilisées pour identifier les molécules extraites à partir de garance.

Étalon	Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Numéro CAS	Fournisseur
primevéroside de lucidine	592,59	-	Pr. Golikov V.
acide rubérythrique	564,54	-	Pr. Golikov V.
primevéroside de rubiadine	576,59	-	Pr. Golikov V.
lucidine	270,24	-	Hémisynthétisé
alizarine	240,21	[72-48-0]	Extrasynthèse
purpurine	256.21	[81-54-9]	Acros Organics

2.1.2. Extraction

Les racines de garance (10 mg) (Okhra, Roussillon, France), préalablement séchées et broyées, ont été placées dans un tube à hémolyse avec 2 mL d'un mélange méthanol-eau (8:2, v/v). Les racines sont ensuite soumises, pendant 10 min, aux ultrasons à l'aide du prototype SOLEX 180 (25 kHz, 120 W) commercialisé par la société R.E.U.S. (Contes, France). Il est composé d'un réservoir inoxydable avec une capacité maximum de 0,8 L, d'un serpentin pour réguler la température (**Figure E.1**). Après centrifugation, le surnageant a été directement analysé par CLHP.

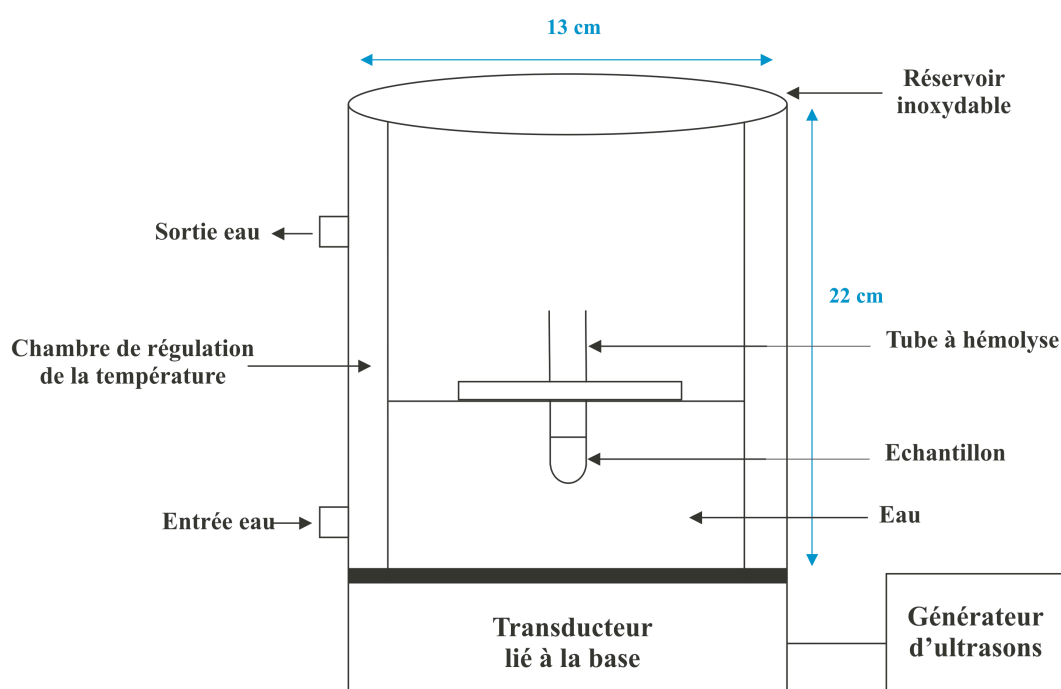


Figure E.1. Schéma du prototype SOLEX.

2.1.3. Étude de la garance par CLHP/UV-Visible

Le matériel CLHP/UV-Visible a été décrit précédemment (cf. Partie Exp., 1.2.1.). La séparation est effectuée pendant 30 min à un débit de 0,7 mL/min. La colonne est thermostatée à 35°C et le mélange d'élution binaire est composé d'acetonitrile (A) et d'eau distillée millipore (B) acidifiée à 0,01% avec de l'acide trifluoroacétique (TFA). Le gradient

d'élution est résumé dans le **tableau E.3**. Tous les chromatogrammes sont obtenus à $\lambda = 450$ nm, longueur d'onde d'absorbance des anthraquinones dans le domaine du visible.

Tableau E.3. Gradient CLHP pour l'analyse des colorants anthraquinoniques de la garance.

Temps (min)	% A	% B
0	30	70
5	30	70
10	70	30
20	70	30
25	100	0
30	100	0

2.2. Extraction des colorants par ultrasons

2.2.1. Séchage des racines

Les racines de garance des teinturiers (*Rubia tinctorum* L.) proviennent de la société Okhra (Roussillon, France). Après avoir été broyées, les racines ont été pesées précisément puis placées dans une étuve à convection à une température de 80°C. Toutes les 2h, les racines sont tempérées dans un dessiccateur, puis pesées. Le séchage se poursuit jusqu'à stabilisation de la masse des racines.

2.2.2. Matériel et procédure de tamisage

Une tamiseuse a été utilisée dans le but d'étudier l'influence de l'extraction par ultrasons en fonction de la granulométrie des racines. Celles-ci ont été broyées puis séparées par une tamiseuse à vibration Fritsch (Idar-Oberstein, Allemagne) composées de tamis d'analyse Prolabo (Paris, France) à différentes ouvertures de mailles (125 μm -1,25 mm).

2.2.3. Matériel et procédure pour l'extraction par ultrasons

Les ultrasons ont été appliqués sur les racines de garance en utilisant un PEX 3 (25 kHz, 150 W) commercialisé par la société R.E.U.S. (Contes, France). Il est composé d'un réservoir inoxydable avec une capacité maximum de 3 L, d'une chambre de régulation de la température et d'une agitation avec double pale (**Figure E.2**).

La puissance absorbée du PEX 3 a été déterminée expérimentalement et les résultats ont été détaillés dans la partie résultats (cf. Partie 1, II.2.1.1.1).

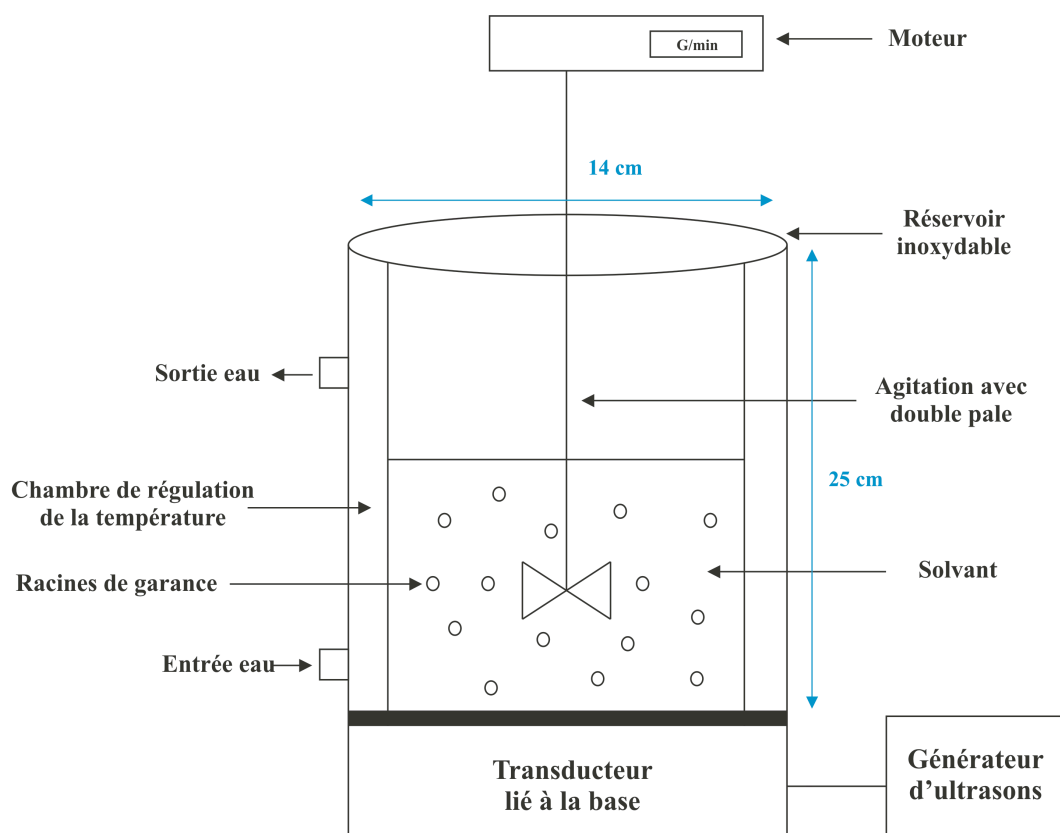


Figure E.2. Schéma du PEX 3.

20 g racines de garance préalablement séchées et broyées ont été extraites dans 500 mL d'un mélange méthanol-eau distillée. Après filtration de l'extrait, 1 mL a été injecté en CLHP/UV-Visible (cf. Partie Exp., 2.1.3.), et le restant a été évaporé à sec pour déterminer le rendement massique.

2.2.4. Procédure pour les extractions par reflux et par agitation

Pour les extractions par reflux et par agitation, 6 g de racines de garance préalablement séchées et broyées ont été extraites dans 150 mL d'un mélange méthanol-eau (8:2, v/v) pendant 1h. Comme précédemment, après filtration de l'extrait, 1 mL a été utilisé pour l'analyse par CLHP/UV-Visible (cf. Partie Exp., 2.1.3.), le reste a été évaporé à sec pour déterminer le rendement massique.

2.2.5. Approche statistique

2.2.5.1. Méthodologie des plans d'expérience

Une procédure expérimentale Box-Wilson (Box et Wilson, 1951) ou Plan Composite Centré (PCC) a été mise en place pour étudier la performance des ultrasons sur l'extraction des colorants de la garance. Une méthode multivariable a été choisie pour optimiser le nombre d'expérience et permettre d'identifier les interactions entre les différentes variables. Ce plan composite centré comprend 3 variables et 5 niveaux pouvant être représentés graphiquement sous forme d'un cube (**Figure E.3**).

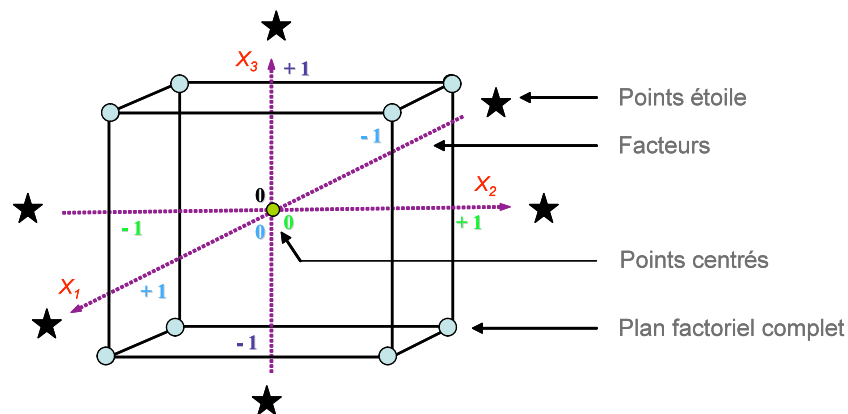


Figure E.3. Représentation graphique des points expérimentaux intervenant dans le PCC.

Le cube se divise en plusieurs parties :

- Un plan factoriel complet à deux niveaux (codés ± 1) : $N_F = 2^3$ expériences réalisées aux coins du cube. Ce plan permet de former la base du plan composite à partir de trois variables codées à leurs niveaux hauts et bas.

- Des répétitions au centre du domaine expérimental (codées 0) : $N_C = 6$ expériences permettant d'évaluer la répétabilité des essais.

- Des « points étoiles » (codés $\pm\alpha$) : $N_a = 2 \times 3$ expériences étoiles réalisées sur les axes des facteurs du cube à une distance α du centre du domaine. Ces points expérimentaux permettront de définir les paramètres quadratiques du modèle mathématique (effet pouvant impliquer la courbure des surfaces de réponses). Les points étoiles représentent une sphère circonscrite à un cube, permettant ainsi une répartition homogène de l'erreur de prévision.

Ainsi, nous aurons pour notre étude :

$$\alpha = \sqrt[4]{(N_F)} = \pm(2^3)^{1/4} = \pm 1,6818$$

Notre plan expérimental utilisera : $N_{exp} = N_F + N_C + N_a = 8 + 6 + 6 = 20$ expériences, comprenant donc 8 expériences représentant un plan factoriel à trois facteurs et deux niveaux, 6 expériences réalisées à l'extérieur du domaine expérimental et 6 expériences au centre (**Tableau E.4**). Ces expériences sont effectuées de façon aléatoire pour un souci de répétabilité.

Tableau E.4. Description des 20 expériences intervenant dans le PCC.

No	X1	X2	X3
1	+1	+1	+1
2	+1	+1	-1
3	+1	-1	-1
4	+1	-1	+1
5	-1	+1	+1
6	-1	-1	+1
7	-1	+1	-1
8	-1	-1	-1
9	$+\alpha$	0	0
10	$-\alpha$	0	0
11	0	$+\alpha$	0
12	0	$-\alpha$	0
13	0	0	$+\alpha$
14	0	0	$-\alpha$
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

2.2.5.2. Analyse statistique

Toutes les données obtenues à partir du PCC (rendement et composition chimique) ont été analysées par le logiciel informatique de plans d'expériences statistiques Statgraphics Plus 2000 (Statgraphics, Rockville, USA). La méthodologie des surfaces de réponses va permettre de modéliser les réponses étudiées sous la forme d'une équation polynomiale du second degré présentée ci dessous :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{\substack{j=2 \\ j>i}}^n \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

- Y représente la réponse (rendement, composition chimique...),
- β_0 illustre la moyenne des réponses obtenues aux réplifications du centre du domaine expérimental,
- n représente le nombre de variables impliquées dans le modèle,
- $\beta_{i,j}$ sont des constantes représentant les coefficients de régression du modèle mathématique adopté,
- X_i exprime les variables opératoires impliquées dans le modèle mathématique, X représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur afin de réaliser un essai.

2.2.5.3. Application à l'extraction des colorants par ultrasons

Une procédure d'extraction utilisant les ultrasons a été optimisée à l'aide d'une méthodologie expérimentale statistique. Une étude préliminaire a été réalisée pour définir trois facteurs influençant l'extraction. Ces paramètres opératoires ont pu être étudiés à l'aide du plan composite centré et sont définis ci-après :

- le temps d'extraction t (min)
- la température T (°C)
- le solvant d'extraction S (% MeOH)

Les variables codées appliquées aux valeurs naturelles des trois variables du plan composite centré sont représentées dans le **Tableau E.5**.

Tableau E.5. Valeurs des variables aux 5 niveaux utilisées lors du PCC.

Niveaux	Temps (min)	Température (°C)	Solvant (% MeOH)
- α	5	10	0
-1	10	18	20
0	18	30	50
+1	25	42	80
+ α	30	50	100

2.2.6. Analyse cytohistologique des racines de garance

Avant l'étude histologique proprement dite, l'anatomie générale des racines de garance a été déterminée sur des coupes à main levée d'échantillons frais. Pour cela, des sections fines ont été obtenues en utilisant une lame de rasoir neuve et directement montées entre lame et lamelle dans l'eau glycéinée (80%).

Après chaque procédé d'extraction, des échantillons de racine de garance ont été collectés et traités pour des observations cytohistologiques en microscopie optique. Ces échantillons ont été fixés dans le mélange : formol-acide acétique-éthanol (1:1:8, v/v/v) durant une nuit, puis rincés avec de l'eau et conservés dans une solution d'éthanol à 70%. Ils ont ensuite été déshydratés dans de l'éthanol (série de 80 à 100%) et inclus dans l'historesine (Kultzer, Wehrheim, Germany) selon les recommandations du fournisseur.

Les sections (3 μm d'épaisseur) ont été réalisées à l'aide du microtome rotatif Leica RM 2165 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), collectées sur des lames porte-objets et conservées à 40°C pendant 48h dans une étuve. Elles ont été traitées pour visualiser spécifiquement les polysaccharides et les protéines en utilisant respectivement le test histochimique PAS (acide périodique/réactif de Schiff et le noir amide) (El Maâtaoui et Pichot, 1999). Les polysaccharides (cellulose, amidon) apparaissent en rouge tandis que les protéines (nucléoprotéines) deviennent bleues. Après coloration, les lames sont séchées sur une plaque chauffante avant d'être montées dans le milieu Sugipath (Sugipath, Richmond, Canada).

Les observations et les micrographies ont été réalisées à l'aide du microscope Leica DM 2000 équipé d'une caméra numérique (Leica DFC 30 FX). Approximativement, 15 fragments ont été analysés pour chaque traitement.

2.3. Application à des objets de musée

2.3.1. Préparation des échantillons pour analyses CLHP

Les échantillons prélevés à partir de pots en verre au musée du Roure (Avignon, France) sont composés de cinq poudres rouges (n°1-5) et d'un échantillon de racines (n°6). 5 mg (n°1, 2 et 4) et 2 mg (n°3 et 5) de poudres ont été solubilisées dans 2 mL d'un mélange méthanol-eau (8:2, v/v). Pour l'échantillon n°6, les racines ont été extraites dans 2 mL du mélange méthanol-eau (8:2, v/v) sous ultrasons en utilisant le prototype SOLEX 180 (cf. Partie Exp., 2.1.2.). Après centrifugation, le surnageant a été analysé par CLHP/UV-Visible (cf. Partie Exp., 2.1.3.).

2.3.2. Analyse colorimétrique

La colorimétrie permet de caractériser une couleur par des valeurs numériques, conformes aux normes internationales, et de l'exprimer ainsi avec plus de facilité et de précision.

CIE $L^*a^*b^*$ est un modèle de représentation des couleurs développé en 1976 par la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE). Il a été spécialement étudié pour que les distances calculées entre couleurs correspondent aux différences perçues par l'œil humain.

Dans l'espace $L^*a^*b^*$ (**Figure E.4**), L^* indique la luminance (ou clarté) et sa valeur s'échelonne de 0 (noir) à +100 (blanc). Les composantes a^* et b^* indiquent les coordonnées de chromaticité, indiquant le sens des couleurs : $+a^*$ va vers le rouge, $-a^*$ vers le vert, $+b^*$ vers le jaune et $-b^*$ vers le bleu.

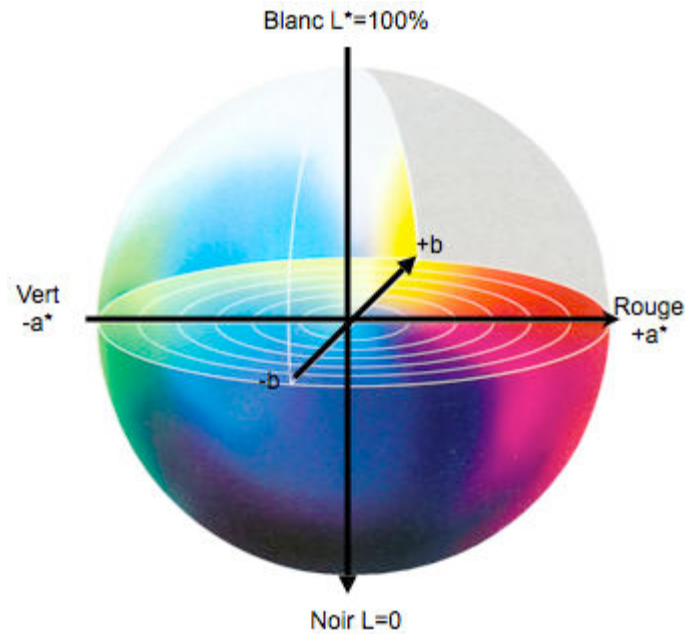


Figure E.4. Espace $L^*a^*b^*$.

Les coefficients $L^*a^*b^*$ sont obtenus à partir des valeurs tri stimulus XYZ d'après les équations suivantes :

$$\begin{aligned} L^* &= 116(Y/Y_n)^{1/3} - 16 \\ a^* &= 500[(X/X_n)^{1/3} - (Y/Y_n)^{1/3}] \\ b^* &= 200[(Y/Y_n)^{1/3} - (Z/Z_n)^{1/3}] \end{aligned}$$

où X_n , Y_n et Z_n sont les valeurs tri stimulus pour l'observateur standard d'un diffuseur par réflexion idéale et X , Y et Z celles de l'échantillon.

De plus, en utilisant les valeurs $L^*a^*b^*$, la teinte (H) et la saturation (S) ont été calculées d'après les équations suivantes :

$$H = \arctan\left(\frac{a^*}{b^*}\right) \quad S = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

Les poudres obtenues après extraction des colorants à partir de racines de garance, ont été analysées par un spectrocolorimètre Konica-Minolta CR 400 (Minolta, Carrières sur Seine, France), dont le capteur est équipé de cellules photoélectriques au silicium, et possédant une zone de mesure de 8 mm. Le système d'éclairage/lecture est d/0 (éclairage diffuse/angle de lecture 0°). Les mesures ont été effectuées en plaçant l'échantillon dans une capsule en plastique de 3 cm de diamètre.

3. ÉTUDE DES COLORANTS JAUNES

3.1. Étude des colorants présents dans le jaune d'Avignon

3.1.1. Étalons

Tableau E.6. Flavonols utilisés pour identifier les molécules extraites à partir de Rhamnus.

Étalon	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Numéro CAS	Fournisseur
quercitrine	448,38	[522-12-3]	Extrasynthèse
quercétine	302,25	[117-39-5]	Extrasynthèse
kaempferol	286,25	[520-18-3]	Extrasynthèse
rhamnétine	316,28	[90-19-7]	Extrasynthèse
isorhamnétine	316,28	[480-19-3]	Extrasynthèse

3.1.2. Échantillonnage

Les fruits immatures de trois différentes espèces de *Rhamnus*, entrant dans la recette du jaune d'Avignon, ont été étudiées : *Rhamnus saxatilis*, *Rhamnus alaternus* et *Rhamnus catharticus* (Tableau E.7).

Tableau E.7. Description des espèces de Rhamnus étudiées pour les fruits immatures.

Espèces	Provenance	Fournisseur
Rhamnus saxatilis	Caumont-sur-Durance, France	Récoltés
	Mont Ventoux, France	Récoltés
Rhamnus alaternus	Caumont-sur-Durance, France	Récoltés
	Mont Ventoux, France	Récoltés
Rhamnus catharticus	Roussillon, France	Okhra
	Pologne	Pr. A. Jagodzinski
	Allemagne	M. Cock
	Hongrie	M. Cock

Mr. A. Jagodzinski est Professeur d'écophysiologie végétale à l'Académie des Sciences Polonaises (Pologne) et Mr. M. Cock travaille à la société botanique (association) CABI Europe (Suisse).

3.1.3. Extraction des colorants et analyse par CLHP/UV-Visible et CLHP/UV/SM

5 mg de baies de *Rhamnus* immatures, préalablement séchées et broyées, ont été placées dans un tube à hémolyse avec 1 mL d'un mélange méthanol-eau (5:5, v/v). Les baies sont ensuite soumises, pendant 10 min, aux ultrasons à l'aide du prototype SOLEX 180 (cf. Partie Exp., 2.1.2.). Après centrifugation, le surnageant a été analysé par CLHP.

Une étude chromatographique préalable a été réalisée pour l'optimisation des conditions analytiques à l'aide de la CLHP/UV-Visible (cf. Partie Exp., 1.2.1). L'analyse et l'identification des colorants flavonoïdiques présents dans le genre *Rhamnus* a été effectuée par CLHP/SM (cf. Partie Exp., 1.2.2.). La séparation a été effectuée pendant 60 min à un débit de 0,7 mL/min. La colonne est thermostatée à 35°C et le mélange d'élution binaire est composé d'acétonitrile (A) et d'eau distillée millipore (B) acidifiée à 0,01% avec de l'acide trifluoroacétique (TFA). Les analyses chromatographiques ont été réalisées. Le gradient d'élution est résumé dans le **tableau E.8**. Tous les chromatogrammes sont obtenus à $\lambda = 350$ nm, longueur d'onde d'absorbance des flavonoïdes dans le domaine du visible.

Tableau E.8. Gradient CLHP pour l'analyse des flavonoïdes présents dans le genre *Rhamnus*.

Temps (min)	% A	% B
0	10	90
10	10	90
60	100	0

3.2. Étude de différents fruits de *Rhamnus* matures

3.2.1. Étalons

Tableau E.9. Les molécules standards d'antraquinones.

Étalon	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Numéro CAS	Fournisseur
franguline A	416,38	[521-62-0]	Extrasynthèse
franguline B	402,35	[14101-04-3]	Extrasynthèse
aloe-émodyne	270,25	[481-72-1]	Extrasynthèse
émodyne	270,25	[518-82-1]	Extrasynthèse
chrysophanol	254,25	[481-74-3]	Extrasynthèse
pariétine	284,28	[521-61-9]	Extrasynthèse

3.2.2. Échantillonnage

Seize échantillons de fruits matures, appartenant au genre *Rhamnus*, ont été analysés (cf. Partie II, 1.3.2.1.). Dr. V. De Micco est Maître de conférences à l'Université de Naples (Italie) et Mr. Bas Lay est Professeur de biologie animale à l'Université de Gérone (Espagne).

3.2.3. Extraction des colorants et séparation par SPE

25 mg de baies de *Rhamnus* matures, préalablement séchées et broyées, ont été placées dans un tube à hémolyse avec 3 mL d'un mélange méthanol-eau (5:5, v/v). Les baies sont ensuite soumises, pendant 20 min, aux ultrasons à l'aide du prototype SOLEX 180 (cf. Partie Exp., 2.1.2.). Le surnageant a été récupéré après centrifugation.

Les extraits ont été appliqués à une extraction sur phase solide (SPE) dans le but de séparer les flavonoïdes des anthraquinones. La cartouche SPE Strata C18-E (200mg, 3mL) (Phenomenex, CA, USA) a été conditionnée successivement avec 1,2 mL de méthanol de grade analytique et 1,2 mL d'eau distillée. Ensuite, l'extrait (2 mL) a été chargé dans la cartouche SPE, elle a été lavée avec 1,8 mL d'un mélange méthanol-eau (7:3, v/v). Enfin, les anthraquinones ont été éluées avec 0,9 mL de méthanol.

3.2.4. Analyse par CLHP/UV-Visible et CLHP/UV/SM

Les différents extraits ont été analysés par CLHP/UV-Visible et CLHP/SM (cf. Partie Exp., 1.2.). La séparation a été effectuée à l'aide d'une colonne C18-e (Symmetry Shield RP18, Waters 5 μm , 4,6 \times 250 mm) pendant 90 min à un débit de 0.7 mL/min. La colonne est thermostatée à 35°C et le mélange d'élution binaire est composé d'acétonitrile (A) et d'eau distillée millipore (B) acidifiée à 0,01% avec de l'acide trifluoroacétique (TFA). Tous les chromatogrammes sont obtenus à $\lambda = 350 \text{ nm}$ et $\lambda = 450 \text{ nm}$, longueurs d'onde d'absorbance respectives des flavonoïdes et des anthraquinones dans le domaine du visible. Le gradient d'élution pour l'analyse des flavonoïdes est résumé **tableau E.8** (cf. Partie Exp., 3.1.3.) tandis que celui des anthraquinones est décrit ci-dessous (**Tableau E.10**).

Tableau E.10. Gradient CLHP pour l'analyse des anthraquinones présentes dans le genre *Rhamnus*.

Temps (min)	% A	% B
0	10	90
10	10	90
60	100	0

3.2.5. Caractérisation d'anthraquinones par RMN

3.2.5.1. Séparation par CLHP/UV-Visible

Les fruits matures de *Rhamnus alaternus* ont été extraits et les anthraquinones séparées par SPE (cf. Partie Exp., 3.3.3.). Les composés ont été purifiés à l'aide de la CLHP/UV-Visible Waters (cf. Partie Exp., 1.2.1). L'analyse est réalisée pendant 90 min à un débit de 0,7 mL/min. La colonne est thermostatée à 35°C et le mélange d'élution binaire est composé d'acétonitrile (A) et d'eau distillée millipore (B) acidifiée à 0,01% avec de l'acide trifluoroacétique (TFA). Le gradient d'élution est résumé dans le **tableau E.10** (cf. Partie Exp., 3.2.4.).

3.2.5.2. Analyse par RMN

Les analyses RMN ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre BRUKER Avance DRX-500 (aimant de 11,75 teslas), muni d'une Cryosonde (sonde à antennes refroidies) : c'est une sonde triple résonance TXI 500MHz inverse ^1H - ^{13}C / ^{15}N de diamètre de 5 mm, de gradient Z et de lock ^2H .

Les échantillons ont été solubilisés dans 40 μL de méthanol deutérié CD_3OD -100% (^1H $\delta=3,31$ ppm – $^{13}\text{C}=49,00$ ppm) puis ont été placés dans des tubes de diamètre 1,7 mm pour les analyses RMN. Ces analyses ont été effectuées au Spectropôle de Marseille.

3.2.6. Dosage

Le dosage des six anthraquinones commerciales (franguline A, franguline B, aloé-émodyne, émodyne, chrysophanol et pariétine) présentes dans plusieurs espèces du genre *Rhamnus* a été effectué par calibration externe. Les six composés ont été préparés en les solubilisant dans du méthanol de grade analytique (VWR, France) et dilués à six concentrations différentes. Une partie des solutions diluées (20 μL) a été injecté en CLHP/UV-Visible. Les solutions ont été analysées 4 fois réparties en 2 fois 2 injections successives sur 2 jours différents. Les courbes d'étalonnage ont été construites en traçant l'aire des pics en fonction de la concentration de chaque composé. La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) ont été déterminées par le rapport signal/bruit de fond multiplié respectivement par 3 et par 10.

3.2.7. Classification hiérarchique

La classification hiérarchique ascendante (CHA) permet d'organiser en groupes les différentes données (ici les espèces botaniques) de façon à ce que les données similaires soient dans le même groupe. Dans le cas de notre étude chaque espèce contient n coordonnées (composés chimiques) et est classée en fonction de la distance à laquelle elle se trouve des autres données. Pour le calcul de la distance, la distance Euclidienne au carré (méthode de Ward) a été utilisée par la formule ci-dessous :

$$D(X,Y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}$$

- X et Y représentent deux espèces de *Rhamnus* à comparer,
- x_i et y_i expriment les coordonnées respectives de l'espèce X et Y . Ces coordonnées correspondent aux composés chimiques présent dans les espèces botaniques.

Après avoir calculé les distances entre toutes les espèces, ces dernières vont être placées dans le dendrogramme. Ces classifications hiérarchiques ont été réalisées par le logiciel informatique statistique Statgraphics Plus 2000 (Statgraphics, Rockville, USA).

3.3. Étude des colorants de la gaude

3.3.1. Étalons

Tableau E.11. Flavones utilisées pour identifier les molécules extraites à partir de la gaude.

Étalon	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Numéro CAS	Fournisseur
apigénine-7-<i>O</i>-glucoside	432,38	[578-74-5]	Extrasynthèse
lutéoline-3',7-di-<i>O</i>-glucoside	610,53	[52187-80-1]	Extrasynthèse
lutéoline-7-<i>O</i>-glucoside	448,38	[5373-11-5]	Extrasynthèse
diosmétine	300,28	520-34-3]	Extrasynthèse
lutéoline	286,25	[491-70-3]	Extrasynthèse
apigénine	270,25	[520-36-5]	Extrasynthèse

3.3.2. Extraction des colorants et analyse par ECZ/UV-Visible et CLHP/UV-Visible

8 mg d'un mélange de feuilles et tiges de gaude (Okhra, Roussillon, France), préalablement séchées et broyées, ont été placées dans un tube à hémolyse avec 1 mL d'un mélange méthanol-eau (5:5, v/v). Le végétal est ensuite soumis, pendant 20 min, aux ultrasons à l'aide du prototype SOLEX 180 (cf. Partie Exp., 2.1.2.). Après centrifugation, le surnageant a été analysés par électrophorèse capillaire de zone à l'aide d'un appareil Beckman P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Fullerton, USA) équipé d'un tube capillaire de silice fondue (43 cm

x 75 μm). L'électrolyte support était constitué par un tampon borate (Beckman Coulter, Fullerton, USA) auquel 20% de méthanol de grade analytique a été ajouté (pH 9,2). La tension de séparation a été fixée à 29 kV et l'échantillon injecté du côté de l'anode en 4 secondes. Toutes les analyses ont été effectuées à une température de 25°C et les électrophérogrammes ont été obtenus à 350 nm. Les données électrophorétiques ont été enregistrées et analysées grâce au logiciel 35 Karat.

Les analyses chromatographiques ont été effectuées par CLHP/UV-Visible (cf. Partie Exp., 1.2.1.). La séparation a été effectuée pendant 60 min à un débit de 0,7 mL/min. La colonne est thermostatée à 35°C et le mélange d'élution binaire est composé d'acetonitrile (A) et d'eau distillée millipore (B) acidifiée à 0,01% avec de l'acide trifluoroacétique (TFA). Les analyses chromatographiques ont été réalisées Le gradient d'élution est résumé dans le **tableau E.8**. Tous les chromatogrammes sont obtenus à $\lambda = 350$ nm.

3.4. Application à un échantillon d'une pharmacie du XVIIIème siècle

L'échantillon prélevé dans une ancienne pharmacie située à l'Université d'Avignon (Avignon, France) est annoté "Stil de grain" et composé de petits comprimés de couleur noire. L'échantillon est broyé et extrait (25 mg) dans 3 mL du mélange méthanol-eau (5:5, v/v) sous ultrasons en utilisant le prototype SOLEX 180 (cf. Partie Exp., 2.1.2.). Après centrifugation, une partie du surnageant (~100 μL) a été analysé par CLHP/UV-Visible pour l'identification de la partie flavonoïdique (cf. Partie Exp., 3.1.3.). L'autre partie a été appliquée à une extraction sur phase solide et analysée par CLHP/UV-Visible (cf. Partie Exp., 3.3.4.).

4. EXTRACTION DES COLORANTS A PARTIR DE FIBRES TEXTILES

4.1. Extraction

Différents échantillons d'indiennes (tissus provençaux) ont été prélevés au Palais du Roure (Avignon, France) ainsi qu'au Museon Arlaten (Arles, France). Les tissus ont soigneusement été découpés afin d'extraire chaque couleur contenue sur la fibre textile. Les méthodes d'extraction ont également été appliquées pour l'analyse d'une laque de garance prélevée au Palais du Roure.

4.1.1. Conditions “dures”

Quelques millimètres carrés de fibres ont été placés dans un tube à hémolyse avec un mélange HCl/MeOH/H₂O (2:1:1, v/v/v) jusqu'à immersion totale de l'échantillon (~500 µL). La solution a été chauffée à 100°C pendant 10 min (Wouters, 1985).

4.1.2. Conditions “douces”

Quelques millimètres carrés de fibres ont été placés dans un tube à hémolyse avec une solution de tampon acétique CH₃COOH/CH₃COO⁻ jusqu'à immersion totale de l'échantillon (~500 µL). La solution de tampon acétique (pH ~4,3) a été préparée avec 10 g d'acétate de sodium CH₃COONa, 75 mL d'eau distillée et 20 mL d'acide acétique glacial CH₃COOH. Les fibres de coloration bleues sont extraites avec du diméthylformamide (DMF). L'échantillon est soumis aux ultrasons pendant 10 min en utilisant le prototype SOLEX 180 (cf. Partie Exp., 2.1.2.).

4.2. Analyse par CLHP/UV-Visible

L'extrait est ensuite analysé à l'aide de la CLHP/UV-Visible Waters (cf. Partie Exp., 1.2.1.). Pour les couleurs rouges et bleues, le gradient d'élution est celui utilisé pour l'analyse de la garance et décrit dans le **tableau E.3** (cf. Partie Exp., 2.1.3.). Les jaunes sont analysés en utilisant le gradient d'élution décrit dans le **tableau E.8** (cf. Partie Exp., 3.1.3.). Enfin, les fibres de couleur verte, correspondant à un mélange de jaune et bleu, ont été extrait deux fois (tampon acétique + DMF) pour l'analyse de chaque colorant.

5. ESSAIS DE COLORATION

5.1. Fabrication d'une laque Stil de grain

Les baies immatures (30 g) de l'espèce *Rh. catharticus* (Okhra, Roussillon, France), préalablement séchées et broyées, ont été extraites dans un mélange méthanol-eau (8:2, v/v) en utilisant le chauffage au reflux. Après filtration, 2 g d'alun (KAl(SO₄)₂, 12 H₂O) a été

ajouté à la solution colorée préalablement portée à 65°C. Il se produit alors une floculation due à la formation de complexes entre l'aluminium et les colorants jaunes. Ces complexes sont ensuite précipités par ajout d'une solution de carbonate de sodium à 9.10^{-2} mol.L⁻¹ jusqu'à l'obtention d'un pH voisin de 10.

Après filtration sur Büchner, une pâte jaune est obtenue qui a été levée à l'eau, séchée puis finement divisée en poudre.

5.2. Essais de teinture

5.2.1. Colorants à "mordant"

5.2.1.1. Prétraitement de la fibre cellulosique

Alunage : 10 g de tissu découpés (6 cm × 6 cm) ont macérés dans un mélange d'alun (2 g), de tartrate de potassium-sodium (1 g) et de carbonate de sodium (0,2 g), pendant 24 h. Les fibres ont ensuite été égouttées puis séchées.

Engallage : 2,5 g de noix de galle ont été extraits, par décoction, dans 250 mL d'eau. Les tissus, préalablement alunés, ont été trempés dans la décoction tiède (~ 40°C) pendant 2 h. Ils ont ensuite été essorés puis séchés.

Enfin, les fibres ont été plongées, une nouvelle fois, dans la solution d'alunage pendant 2 h, avant d'être rincées puis séchées.

5.2.1.2. Teinture

4 g des différentes matières tinctoriales ont été extraits, par chauffage au reflux, dans 400 mL d'eau. Après filtration sur coton, la solution a été portée à une température avoisinant 80°C où les fibres textiles prétraitées ont été plongées pendant 1 h. Les tissus ont ensuite été essorés puis séchés.

5.2.2. Indigo

25 mg d'indigo (Okhra, Roussillon, France) ont été broyés finement et mélangés dans 100 mL d'hydroxyde de sodium (4%). De plus, 2 g d'hydrosulfite de sodium (Na₂S₂O₄) ont

été ajoutés avant de fermer le bécher. La solution a ensuite été maintenue à une température d'environ 55°C pendant 30 min, au bout duquel elle est devenue jaune limpide.

1,5 g d'hydrosulfite de sodium ont été solubilisés dans 1,5 L d'eau. Cette opération a pour but de supprimer l'oxygène contenu dans le bain. La solution contenant l'indigo a été ajoutée. Le pH du bain de teinture doit être supérieure à 8,2.

La fibre textile non prétraitée est plongée dans le bain, bien mouillée d'avance, pendant 10 min. La fibre a ensuite été sortie, essorée et exposée à l'air et au soleil dans le but de favoriser l'oxydation. Pour finir, le tissu a été rincé dans une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N afin de neutraliser l'alcalinité du bain.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abegaz B.M., Peter M.G. (1995). "Emodin and emodinanthrone rhamnoside acétates from fruits of *Rhamnus prinoides*". *Phytochemistry* 39 : 1411-1414.

Abou-Chaar C., Shamlan S.N. (1980). "A chromatographic study of the anthraquinones of *Rhamnus alaternus* L. I. Extraction, isolation and identification of the aglycones." *Quart. J. Crude Drug Res.* 18, 49-55.

Ammar R.B., Sghaier M.B., Boubaker J., Bhourri W., Naffeti A., Skandrani I., Bouhlel I., Kilani S., Ghedira K., Chekir-Ghedira L. (2008). "Antioxydant activity and inhibition of aflatoxin B₁-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L.". *Chemico-Biological Interactions* 174: 1-10.

Angelini L.G., Pistilli L., Belloni P., Bertoli A., Panconesi S. (1997). "*Rubia tinctorum* a source of natural dyes: agronomic évaluation, quantitative analysis of alizarin and industrial essays". *Industrial Crops and Products* 6: 303-311.

Boldizsár I., Szűcs Z., Füzfa Zs., Molnár-Perl I. (2006). "Identification and quantification of the constituents of madder root by gas chromatography and high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A* 1133: 259-274.

Bourhis K. (2008). "Les laque de jaune d'Avignon : préparation et analyse spectrale". *Rapport de Master 2*, Pau.

Box G.E.P., Wilson K.B. (1951). "On the expérimental attainment of optimum conditions". *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 13: 1-45.

Burnett A.R., Thomson R.H. (1968). "Naturally occurring quinones. Part XV. Biogenesis of the anthraquinones in *Rubia tinctorum* L. (madder)". *Journal of the Chemical Society* : 2437-2441.

Cardon D., du Chatenet G. (1990). "Le guide des teintures naturelles". Delachaux et Niestlé, Neuchâtel-Paris.

Cardon D. (2003). "Le monde des teintures naturelles". Belin, Paris.

Chassagne S. (1991). “Le coton et ses patrons”. Éditions de l'EHESS, Paris.

Chastel S. (2006). “Laque de garance : approche esthétique et technique”. *Mémoire pour l'obtention du diplôme supérieur en Conservation-Restauration d'œuvres peintes*, Avignon.

Chen X.J., Guo B.L., Li S.P., Zhang Q.W., Tu P.F., Wang Y.T. (2007). “Simultaneous détermination of 15 flavonoids in *Epimedium* using pressurized liquid extraction and High-performance liquid chromatography”. *Journal of Chromatography A* 1163: 96-104.

Choi J.S., Chung H.Y., Jung H.A., Park H.J., Yokozawa T. (2000). “Comparative évaluation of antioxydant potential of alaternin (2-hydroxyemodin) and emodin”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 6347-6351.

Clementi C., Nowik W., Romani A., Cibin F., Favaro G. (2007). “A spectrometric et chromatographic approach to the study of ageing of madder (*Rubia tinctorum* L.) dyestuff on wool”. *Analytica Chimica Acta* 596: 46-54.

Colin A., Robiquet P. (1827). “Nouvelles recherches sur la matière colorante de la garance”. *Ann. Chim. Phys.* 34: 225-253.

Coşkun M., Satake T., Hori K., Saiki Y., Tanker M. (2001). “Anthraquinone glycosides from *Rhamnus libanoticus*”. *Phytochemistry* 29: 2018-2020.

Cristea D., Bateau I., Vilarem G. (2003). “Identification and quantitative HPLC analysis of the main flavonoids present in weld (*Reseda luteola* L.)”. *Dyes and Pigments* 57: 267-272.

Cuoco G., Mathe C., Vieillescazes C. (2008). “La couleur de l'Avant-garde russe. Étude de la caractérisation physico-chimique de la matière picturale”. *Actualité Chimique* 318: 28-29.

Cuoco G., Mathe C., Archier P., Vieillescazes C. (2009 a). “A multivariate study of the performance of an ultrasound-assisted madder dyes extraction and characterization by liquid chromatography-photodiode array detection”. *Ultrasonics Sonochemistry* 16: 75-82.

Cuoco G., Mathe C., Archier P., El Maâtaoui M., Vieillescazes C. (2009 b). "Cytohistological and phytochemical study of madder root extracts obtained by ultrasonic and classical extractions". *Phytochemical Analysis* (sous presse).

De Graaff J.H.H. (2004). "The colourful past: origins chemistry and identification of natural dyestuffs". Abegg-Stiftung et Archetype Publications Ltd., Riggisberg-London.

Delamare F., Hovaneissian M., Repoux M., Archier P., Vieillescazes C. (2006). "Analyse de deux pigments roses trouvés à Pompéi". *Rivista di Studi Pompeiani* XVII: 39-43.

Delormois M. (1770). "L'art de faire l'indienne à l'instar d'Angleterre". Librairie du Roi, Paris.

De Santis D., Moresi M. (2007). "Production of alizarin extracts from *Rubia tinctorum* and assessment of their dyeing properties". *Industrial Crops and Products* 26: 151-162.

Derksen G.C.H. (2001). "Red, redder, madder. Analysis and isolation of anthraquinones from madder roots (*Rubia tinctorum*)". *Thèse de doctorat*, Bruxelles.

Derksen G.C.H., van Beek T.A., de Groot Æ., Capelle A. (1998). "High-performance liquid chromatographic method for the analysis of anthraquinone glycoside and aglycones in madder root (*Rubia tinctorum* L.)". *Journal of Chromatography A* 816: 277-281.

Derksen G.C.H., Niederländer H.A.G., van Beek T.A. (2002). "Analysis of anthraquinones in *Rubia tinctorum* L. by liquid chromatography coupled with diode-array UV and mass spectrometric detection". *Journal of Chromatography A* 978: 119-127.

Dixon A.D., Hoyte D.A.N. (1963). "A comparison of autoradiographic and alizarin techniques in the study of bone growth". *Anatomical Record* 145: 101-113.

El-Emary N.A., Backheet E.Y. (1998). "Three hydroxymethylanthraquinone glycosides from *Rubia tinctorum*". *Phytochemistry* 49: 277-279.

El Maâtaoui M., Pichot C. (1999). "Nuclear and cell fusion cause polyploidy in the megagametophyte of common cypress, *Cupressus sempervirens* L.". *Planta* 208: 345-351.

Fabre J.H. (1860). "Description du perfectionnement apporté par le soussigné au procédé de fabrication de la garancine". *Brevé sur la garance 44034*. <http://www.e-fabre.com/>

Fein J.B. (1991). "Experimental study of aluminum-, calcium-, and magnesium-acetate complexing at 80°C". *Geochimica et Cosmochimica Acta* 55: 955-964.

Ferreira E.S.B., Quye A., McNab H., Hulme A.N. (2002). "Photo-oxidation products of quercetin and morin as markers for the characterisation of natural flavonoid yellow dyes in ancient textiles". *Dyes in History and Archaeology* 18: 63-72.

Fujii H. (2008). "Étude chromatographique d'une plante tinctoriale : la gaude (*Reseda luteola*)". *Rapport de Master 2*, Avignon.

Galton F. (1883). "Inquiries into human faculty and development". MacMillan, London.

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

García-Ayuso L.E., Luque De Castro M.D. (1999). "A multivariate study of the performance of a microwave-assisted Soxhlet extractor for olive seeds". *Analytica Chimica Acta* 382: 309-316.

Graebe C., Liebermann A. (1868). "Ueber alizarin and anthracen". *Berichte der Detschen Chemischen Gesellschaft* 49: 279-281.

Gril-Mariotte A. (2007). "Les toiles imprimées à la manufacture de Jouy-en-Josas (1760-1821). Apparition et développement d'un nouvel art décoratif". *Thèse de doctorat*, Aix-Marseille.

Hagenson L.C., Doraiswamy L.K. (1998). "Comparison of the effects of ultrasound and mechanical agitation on a reacting solid-liquid system". *Chemical Engineering Science* 53: 131-148.

Han Y.S., Van der Heijden R., Lefeber A.W.M., Erkelens C., Verpoorte R. (2002). "Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of *Cinchona robusta* proceeds via the methylerythritol 4-phosphate pathway". *Phytochemistry* 59: 45-55.

Harborne J.B. (1994). "The flavonoids; advances in research since 1986". Chapman & Hall, London.

Hemwimol S., Pavasant P., Shotipruk A. (2006). "Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*". *Ultrasonics Sonochemistry* 13: 543-548.

Hill R., Richter D. (1937). "Anthraquinone pigments in *Galium*". *Proceeding of the Royal Society* 121: 547-560.

Hovaneissian M. (2005). "Différenciation de substances naturelles par diverses techniques analytiques : spectroscopie IRTF, CLHP-UV-Visible-Fluorimétrie et CPG-SM. Application à l'étude d'échantillons officinaux et archéologiques". *Thèse de doctorat*, Avignon.

Hovaneissian M., Archier P., Vieillescazes C. (2007). "Influence of cetophenolic and diphenolic intramolecular hydrogen bonding on the chromatographic and spectroscopic properties of hydroxyanthraquinones". *Dyes and Pigments* 74: 706-712.

Hsiao G., Ko F.N., Lin C.N., Teng C.M. (1996). "Antioxydant properties of isotorachryson isolated from *Rhamnus nakaharai*". *Biochimica et Biophysica Acta* 1298: 119-130.

Jacques R.A., Freitas L.S., Pérez V.F., Dariva C., de Oliveira A.P., de Oliveira J.V., Caramão E.B. (2007). "The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration". *Ultrasonics Sonochemistry* 14: 6-12.

Kamel M.M., El-Shishtawy R.M., Youssef B.M., Mashaly H. (2007). "Ultrasonic assisted dyeing. IV. Dyeing of cationised cotton with lac natural dye". *Dyes and Pigments* 73: 279-284.

Kawasaki Y., Goda Y., Yoshihira K. (1988). "Anthraquinones from *Rubia tinctorum*". *Shoyakugaku Zasshi* 42: 166-167.

Kawasaki Y., Goda Y., Yoshihira K., Noguchi H. (1990). "A new anthraquinone from *Rubia tinctorum*". *Shoyakugaku Zasshi* 44: 95-97.

Kawasaki Y., Goda Y., Maitani T., Yoshihira K., Takeda M. (1992 a). "Determination of madder color in foods by high-performance liquid chromatography". *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 33: 563-568.

Kawasaki Y., Goda Y., Yoshihira K. (1992 b). "The mutagenic constituents of *Rubia tinctorum*". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 40: 1504-1509.

Kawasaki Y., Goda Y., Noguchi H., Yamada T. (1994). "Identification of adducts formed by reaction of purine bases with a mutagenic anthraquinone, lucidin: mechanism of mutagenicity by anthraquinones occurring in Rubiaceae plants". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 42: 1971-1973.

Launay F., Alain V., Destandau E., Ramos N., Bardez E., Baret P., Pierre J.L. (2001). "From 8-hydroxy-5-sulfoquinoline to new related fluorogenic ligands for complexation of aluminium(III) and gallium(III)". *New Journal of Chemistry* 25: 1269-1280.

Lazic Z.R. (2004). "Design of experiments in chemical engineering: A practical guide". Wiley, Weinheim.

Leistner E., Zenk M.H. (1967). "Incorporation of shikimic acid into 1,2-dihydroxyanthraquinone by *Rubia tinctorum* L.". *Tetrahedron Letters* 5: 475-476.

Li H.J., Jiang Y., Li P. (2009). "Characterizing distribution of steroidal alkaloids in *Fritillaria* spp. and related compound formulas by liquid chromatography-mass spectrometry combined with hierarchial cluster analysis". *Journal of Chromatography A* 1216: 2142-2149.

Lin C.N., Chung M.I., Lu C.M. (1990). "Anthraquinones from *Rhamnus formosana*". *Phytochemistry* 29: 3903-3905.

Lin C.N., Chung M.I., Gan K.H., Lu C.M. (1991). "Flavonol and anthraquinone glycosides from *Rhamnus formosana*". *Phytochemistry* 30: 3103-3106.

Lin L.Z., Harnly J.M. (2007). "A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 1084-1096.

Lin Z.E., Chen P., Ozcan M., Harnly J.M. (2008). "Chromatographic profiles and identification of new phenolic components of *Ginkgo biloba* leaves and selected products". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6671-6679.

Longo L., Vasapollo G., Rescio L. (2005). "Identification of anthocyanins in *Rhamnus alaternus* berries". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1723-1727.

Lucchesi M.E., Smadja J., Bradshaw S., Louw W., Chemat F. (2007). "Solvent-free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil". *Journal of Food Engineering* 79: 1079-1086.

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

Mai L.P., Guéritte F., Dumontet V., Try V.M., Hill B., Thoison O., Guénard D., Sévenet T. (2001). "Cytotoxicity of rhamnosylanthraquinones and rhamnosylanthrones from *Rhamnus nepalensis*". *Journal of Natural Products* 64: 1162-1168.

Manojlovic N.T., Solujic S., Sukdolak S., Milosev M. (2005). "Antifungal activity of *Rubia tinctorum*, *Rhamnus frangula* and *Caloplaca cerina*." *Fitoterapia* 76: 244-246.

Marques R., Sousa M.M., Oliveira M.C., Melo M.J. (2009). "Characterization of weld (*Reseda luteola* L.) and spurge flax (*Daphne gnidium* L.) by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry in Arraiolos historical textiles". *Journal of Chromatography A* 1216: 1395-1402.

Marzouk M.S., El-Toumy S.A.A., Merfort I., Nawwar M.A.M. (1999). "Polyphenolic metabolites of *Rhamnus disperma*". *Phytochemistry* 52, 943-946.

Mason T.J. (1989). "Sonochemistry: the uses of ultrasound in chemistry". Royal Society of Chemistry, Angleterre.

Mason T.J. (1990). "Chemistry with ultrasound". Elsevier Science Publishers Ltd, Angleterre.

Mathe C., Cuoco G., Vieillescazes C. "Analytical study of ancient Moroccan carpets from Batha museum (Fez)". Med Colour Tech - Workshop - Technology & conservation of ancient Artworks, 26-27 novembre 2008, Fez (Morocco).

Mathe C. Fujii H., Vieillescazes C. (2009). "Chromatographic study of a yellow matter historically employed in Cultural Heritage: *Reseda luteola* (weld)". *Dyes in History and Archéologie*.

Mazanek M., Kaml I., Kenndler E. (2006). "Capillary electrophoresis: an alternative to chromatography for analysis of natural organic binders". *Studies in Conservation* 51: 139-151.

Mazawaki T., Taya M., Tone S. (1996). "Selective solvent extraction of ruberythric acid from madder roots and subsequent hydrolysis with β -glucosidase". *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81: 567-569.

- Miliani C., Romani A., Favaro G. (1998). "A spectrophotometric and fluorimetric study of some anthraquinoid and indigoid colorants used in artistic paintings". *Spectrochimica Acta Part A* 54: 581–588.
- Mongrand S., Badoc A., Patouille B., Lacomblez C., Chavent M., Bessoule J.J. (2005) "Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition". *Phytochemistry* 66: 549-559.
- Nakanishi F., Nagasawa Y., Kabaya Y., Sekimoto H., Shimomura K. (2005). "Characterization of lucidin formation in *Rubia tinctorum* L". *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 921-928.
- Neppiras E.A. (1984). "Acoustic cavitation series: part one: Acoustic cavitation: an introduction". *Ultrasonics* 22: 25-28.
- Nindi M.M., Kgarebe B.V., Wolfender J.L., Abegaz B.M. (1999). "Electrospray liquid chromatography-mass spectrometry of the leaf extract of *Rhamnus prinoides*". *Phytochemical Analysis* 10, 69-75.
- Norton S.A. (1998). "Useful plants of dermatology IV. Alizrin red and madder". *Journal of the American Academy of Dermatology* 39: 484-485.
- Novotná P., Pacáková V., Bosáková Z., Štulík K. (1999). "High-performance liquid chromatographic determination of some anthraquinone and naphthoquinone dyes occurring in historical textiles". *Journal of Chromatography A* 863: 235-241.
- Nowik W. (1996). "Application de la chromatographie en phase liquide à l'identification des colorants naturels des textiles anciens". *Analisis Magazine* 24: 37-40.
- Nowik W., Desrosiers S., Surowiec I., Trojanowicz M. (2005). "The analysis of dyestuffs from first- to second-century textile artefacts found in the Martres-de-Veyre (France) excavations". *Archaeometry* 47: 835-848.

Özipek M., Çalis I., Ertant M., Rüedi P. (1994). "Rhamnetin 3-p-coumaroylrhamninoside from *Rhamnus petiolaris*." *Phytochemistry* 37, 249-253.

Peggie D.A., Hulme A.N., McNab H. Quye A. (2007). "Towards the identification of characteristic minor components from textiles dyed with weld (*Reseda luteola* L.) and those dyed with Mexican cochineal (*Dactylopius coccus* Costa)". *Microchimica Acta* 162: 371-380.

Pérégo F. (2005). "Dictionnaire des matériaux du peintre". Belin, Paris.

Persson P., Karlsson M., Öhman L.O. (1998). "Coordination of acetate to Al(III) in aqueous solution and at the water-aluminum hydroxide interface: a potentiometric and attenuated total reflectance FTIR study". *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62: 3657-3668.

Petsalo A., Jalonen J., Tolonen A. (2006). "Identification of flavonoids of *Rhodiola rosea* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A* 1112: 224-231.

Philippon J. (1986). "Microanalyse des pigments et des liants par voie humide". Institut français de restauration des œuvres d'arts.

Poginsky B., Westendorf O.J., Kraus L., Marquardt H. (1987). "Detection of lucidin, a genotoxic principle in root extracts of *Rubia tinctorum* and the conversion to its ethyl ether during ethanol extraction". *Pharmaceutische Weekblad Scientific Edition* 9: 242.

Poginsky B., Westendorf O.J., Blomeke B., Marquardt H., Hewer A., Grover P.L., Philips D.H. (1991). "Evaluation of DNA-binding activity of hydroxyanthraquinones occurring in *Rubia tinctorum* L.". *Carcinogenesis* 12: 303-311.

Prasad D., Pant G., Rawat M.S.M., Nagatsu A. (2000). "Constituents of *Rhamnus virgatus* (Rhamnaceae)". *Biochemical Systematics and Ecology* 28: 1027-1030.

Pratt L.S. (1947). "The chemistry and physics of organic pigments". New York.

- Rafaëly L., Héron S., Nowik W., Tchapla A. (2008). "Optimisation of ESI-MS detection for the HPLC of anthraquinone dyes." *Dyes and Pigments* 77: 191-203.
- Rath G., Ndonzoa M., Hostettmann K. (1995). "Antifungal anthraquinones from *Morinda lucida*". *International Journal of Pharmacognosy* 33: 107-114.
- Richter D. (1936). "Anthraquinone colouring matters: ruberythric acid". *Journal of Chemical Society* 1701-1703.
- Riess-Maurer I., Wagner H. (1982). "Structur und synthese von flavonol-triosiden aus *Rhamnus*-arten". *Tetrahedron* 38: 1269-1278.
- Rodrigues S., Pinto G.A.S. (2007). "Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder". *Journal of Food Engineering* 80 : 869-872.
- Romani A., Zuccaccia C., Clementi C. (2006). "An NMR and UV-visible spectroscopic study of the principal colored component of Stil de grain lake". *Dyes and Pigments* 71: 218-223.
- Sanyova J., Reisse J. (2006). "Development of a mild method for the extraction of anthraquinones from their aluminium complexes in madder lakes prior to HPLC analysis". *Journal of Cultural Heritage* 7: 229-235.
- Satake T., Hori K., Kamiya K., Saiki Y., Fujimoto Y., Kimura Y., Maksut C., Mekin T. (1993). "Studies on the constituents of Turkish plants. I. Flavonol triglycosides from the fruits of *Rhamnus thymifolius*". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 41: 1743-1745.
- Schels H., Zinsmeister H.D., Pflieger K. (1977). "Mass spectrometry of silylated flavonol *O*-glycosides". *Phytochemistry* 16: 1019-1023.
- Schweppe H. (1993). "Anthrachinonfarbstoffe. Handbuch der Naturfarbstoffe: Vorkommen, Verwendung, Nachweis". Ecomed, Hamburg.

Sharp H., Latif Z., Bartholomew B., Thomas D., Thomas B., Sarker S.D., Nash R.J. (2001). "Emodin and syringaldehyde from *Rhamnus pubescens* (Rhamnaceae)." *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 113-115.

Shotipruk A., Kaufman P.B., Wang H.Y. (2001). "Feasibility study of repeated harvesting of menthol from biologically viable *Mentha x piperita* using ultrasonic extraction". *Biotechnology Progress* 17: 924-928.

Sivakumar V., Rao P.G. (2003). "Studies on the use of power ultrasound in leather dyeing". *Ultrasonics Sonochemistry* 10: 85-94.

Smith D.M., Glennie C.W., Harborne J.B. (1971). "Identification of eupalitin, eupatolitin and patuletin glycosides in *Ipomopsis aggregata*". *Phytochemistry* 10: 3115-3120.

Soubayrol P. (1996 a). "Préparation et étude structurale des complexes formés entre l'aluminium et l'alizarine". *Thèse de doctorat*, Paris.

Soubayrol P., Dana G., Man P.P. (1996 b). "Aluminium-27 solid-state NMR study of aluminium coordination complexe of alizarin". *Magnetic Resonance Chemistry* 34: 638-645.

Surowiec I., Quye A., Trojanowicz M. (2006). "Liquid chromatography determination of natural dyes in extracts from historical Scottish textiles excavated from peat bogs". *Journal of Chromatography A* 1112: 209-217.

Szostek B., Orska-Gawrys J., Surowiec I., Trojanowicz M. (2003). "Investigation of natural dyes occurring in historical Coptic textiles by high-performance liquid chromatography with UV-Vis and mass spectrometric detection". *Journal of Chromatography A* 1012: 179-192.

Trojanowicz M., Orska-Gawryś J., Surowiec I., Szostek B., Urbaniak-Walczak K., Kehl J., Wróbel M. (2004). "Chromatographic investigation of dyes extracted from Coptic textiles from the National Museum in Warsaw". *Studies in Conservation* 49: 115-130.

Tsimogiannis D., Samiotaki M., Panayotou G., Oreopoulou V. (2007). “Characterization of flavonoids subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS”. *Molecules* 12: 593-606.

Vaidyanathan A. (1985). “A new C-glycosylanthraquinone from madder root”. *Dyes and Pigments* 6: 27-30.

Vallejo F., Tomás-Barberán F.A., Ferreres F (2004). “Characterisation of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry”. *Journal of Chromatographie A* 1054: 181-193.

Vila D.H., Miran F.J.H., Lucena R.B., Recamales M.A.F. (1999). “Optimization of an extraction method of aroma compounds in white wine using ultrasound”. *Talanta* 50: 413-421.

Vilkhu K., Mawson R., Simons L., Bates D. (2008). “Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry”. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9:161-169.

Vinatoru M. (2001). “An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs”. *Ultrasonics Sonochemistry* 8: 303-313.

Wagner H., Demuth G. (1972). “6-O-(D-apiofuranosyl)-1,6,8-trihydroxy-3-methyl-anthrachinon, ein neues glykosid (Frangulin B) aus der rinde von *Rhamnus frangula* L.”. *Tetrahedron Letters* 13: 5013-5014.

Wang J., Kasai R., Sakimori M., Miyakoshi M., Tanaka O., Jia M.R., Ling Y.K. (1988). “Flavonol glycosides from the fruits of *Rhamnus leptophylla*”. *Phytochemistry* 27, 3995-3996.

- Wang L., Li D., Bao C., You J., Wang Z., Shi Y., Zhang H. (2008). "Ultrasonic extraction and separation of anthraquinones from *Rheum palmatum* L.". *Ultrasonics Sonochemistry* 15: 738-746.
- Westendorf O.J., Marquardt H., Poginsky B., Dominiak M., Schmidt J. (1990). "Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones". *Mutation Research Letters* 240: 1-12.
- Wouters J. (1985). "High performance liquid chromatography of anthraquinones: Analysis of plant insect extracts dyed textiles". *Studies in Conservation* 30: 242-245.
- Wouters J., Rosario-Chirinos N. (1992). "Dye analysis of pre-columbian peruvian textiles with High-performance liquid chromatography and diode-array detection". *Journal of the American Institute for Conservation* 31: 237-255.
- Wouters J. (2001). "The dye of *Rubia peregrina*. Preliminary Investigations". *Dyes in History and Archaeology* 145-157.
- Xiao W., Han L., Shi B. (2008). "Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix Astragali*". *Separation and Purification Technology* 62: 614-618.
- Yang Y., Zhang F. (2008). "Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb". *Ultrasonics Sonochemistry* 15: 308-313.
- Yasui Y., Takeda N. (1983). "Identification of a mutagenic substance in *Rubia tinctorum* L. (madder) root as lucidin". *Mutation Research Letters* 121: 185-190.
- Zhang X., Laursen R.A. (2005). "Development of mild extraction methods for the analysis of natural dyes in textiles of historical interest using LC-Diode Array Detector-MS". *Analytical Chemistry* 77: 2022-2025.
- Zhang Z.S., Wang L.J., Li D., Jiao S.S., Chen X.D., Mao Z.H. (2008). "Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed". *Separation and Purification Technology* 62: 192-198.

ANNEXES

ANNEXE I
SPECTRES UV/VISIBLE
DES MOLÉCULES ÉTUDIÉES

Tableau A.1. Spectres UV/Visible des anthraquinones de la garance.

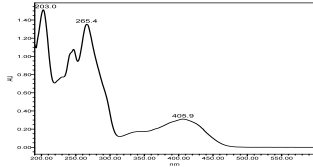
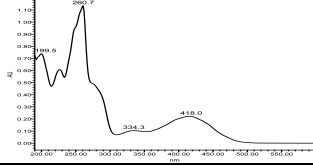
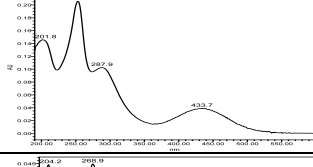
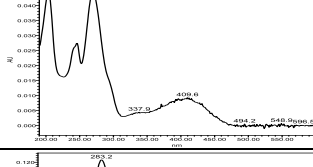
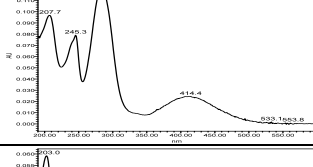
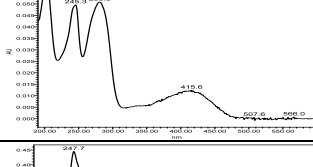
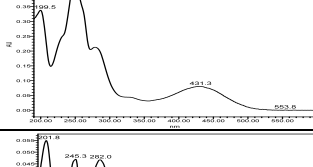
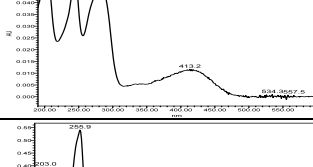
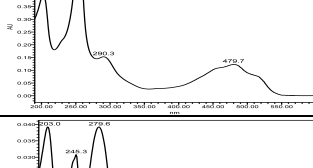
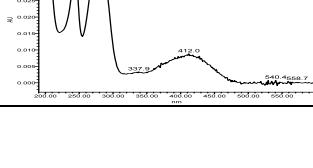
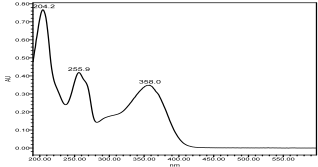
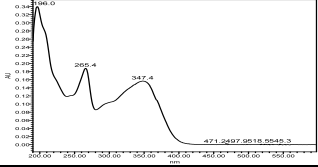
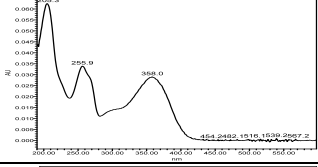
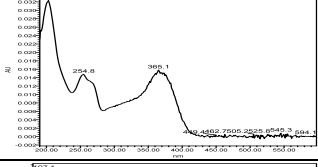
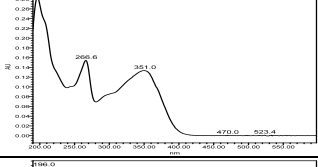
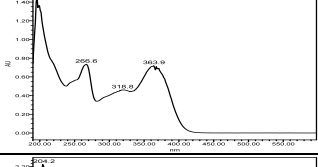
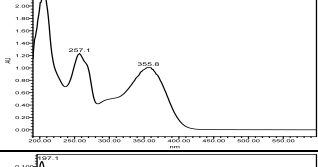
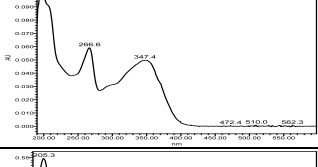
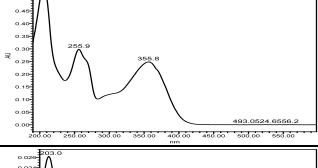
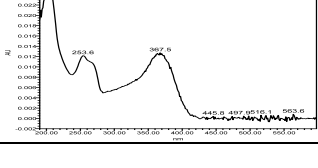
Nom	t _R (min)	Spectre UV-Visible
3- <i>O</i> -primevéroside de lucidine	5,4	
Acide rubérythrique	6,0	
Galiosine	10,1	
3- <i>O</i> -primevéroside de rubiadine	12,3	
Anthragallol	18,0	
Lucidine	18,6	
Alizarine	19,8	
Xanthopurpurine	21,6	
Purpurine	22,7	
Rubiadine	26,9	

Tableau A.2. Spectres UV/Visible des flavonols des nerpruns.

Nom	t _R (min)	Spectre UV-Visible
3- <i>O</i> -rhamninoside de quercétine	28,2	
3- <i>O</i> -rhamninoside de kaempférol	28,9	
3- <i>O</i> -rhamninoside de isorhamnétine	29,2	
4'- <i>O</i> -rhamninoside de quercétine	29,5	
3- <i>O</i> -acétyl-rhamninoside de kaempférol	30,0	
4'- <i>O</i> -rhamninoside de kaempférol	30,1	
3- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnétine	30,5	
3- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnocitrine	31,3	
3- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnazine	31,6	
4'- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnétine	32,0	

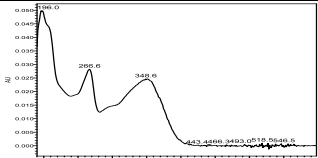
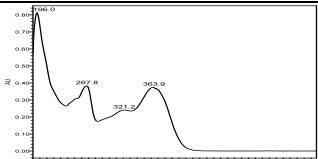
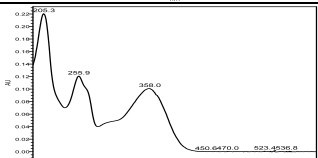
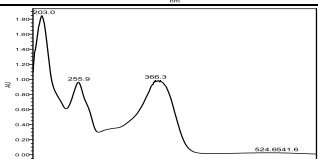
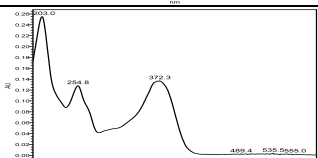
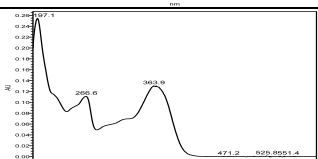
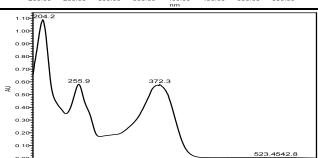
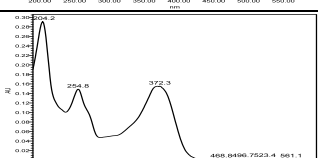
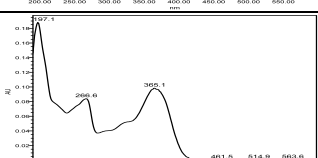
3- <i>O</i> -acétyl-rhamminoside de rhamnocitrine	32,4	
4'- <i>O</i> -rhamminoside de rhamnocitrine	32,5	
3- <i>O</i> -acétyl-rhamminoside de rhamnazine	32,7	
quercétine	39,1	
isorhamnétine	42,7	
kaempférol	43,5	
rhamnétine	43,8	
rhamnazine	47,4	
rhamnocitrine	48,4	

Tableau A.3. Spectres UV/Visible des anthraquinones des nerpruns.

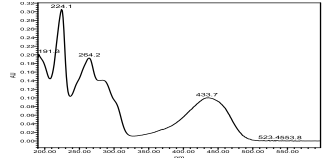
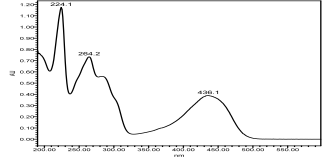
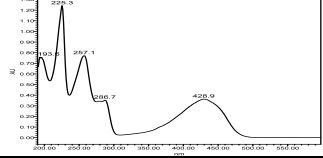
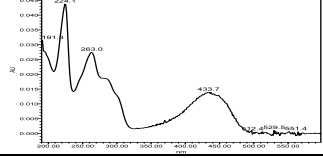
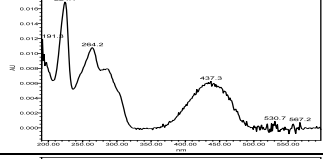
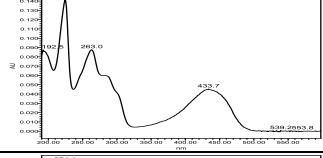
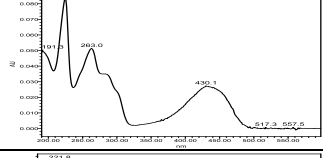
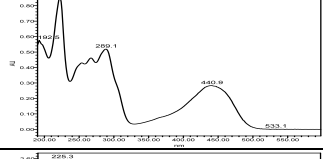
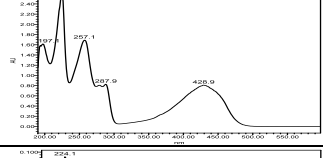
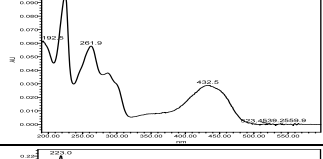
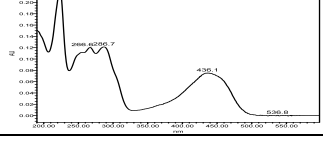
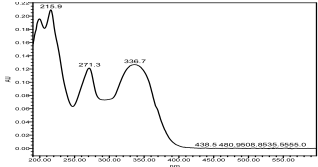
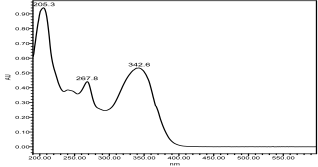
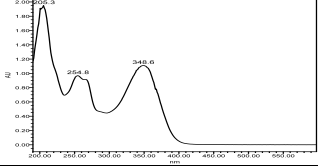
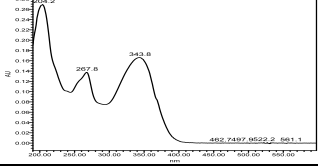
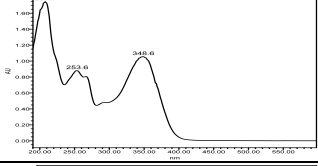
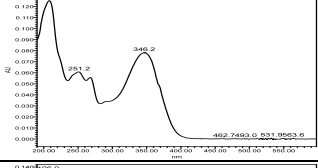
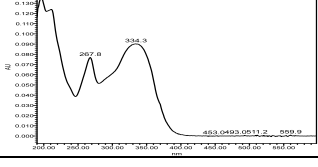
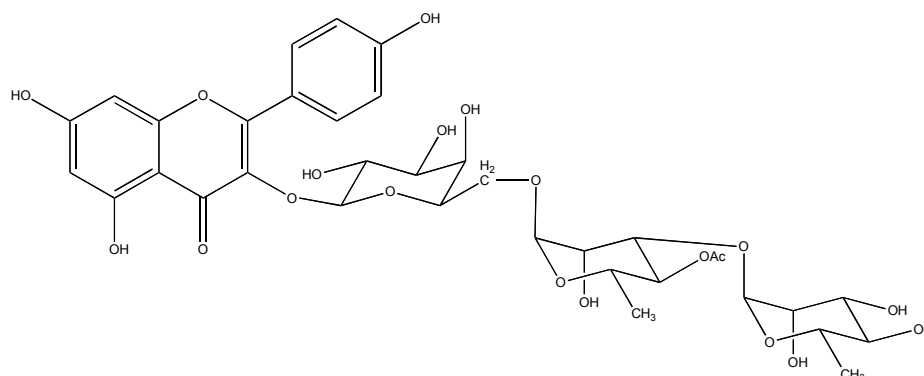
Nom	t _R (min)	Spectre UV-Visible
Franguline A	29,7	
Franguline B	30,6	
Aloe-émودية	32,4	
6-O-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émودية	35,6	
6-O-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émودية	41,2	
6-O-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émودية	50,8	
6-O-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émودية	59,2	
Éمودية	61,0	
Chrysophanol	62,6	
6-O-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émودية	66,8	
Pariétine	71,9	

Tableau A.4. Spectres UV/Visible des flavones de la gaude.

Nom	t _R (min)	Spectre UV-Visible
6,8-di-C-glucoside d'apigénine	24,0	
3',7-di-O-glucoside de lutéoline	25,1	
7-O-glucoside de lutéoline	28,8	
7-O-glucoside d'apigénine	30,5	
lutéoline	38,2	
diosmétine	41,2	
apigénine	42,0	

ANNEXE II
SPECTRES DE MASSE
DES FLAVONOLS PRÉSENTS
DANS LES NERPRUNS

3-O-acétyl-rhamninoside de kaempférol



Formule brute : $C_{35}H_{42}O_{20}$ - Masse molaire : 782 g.mol^{-1}

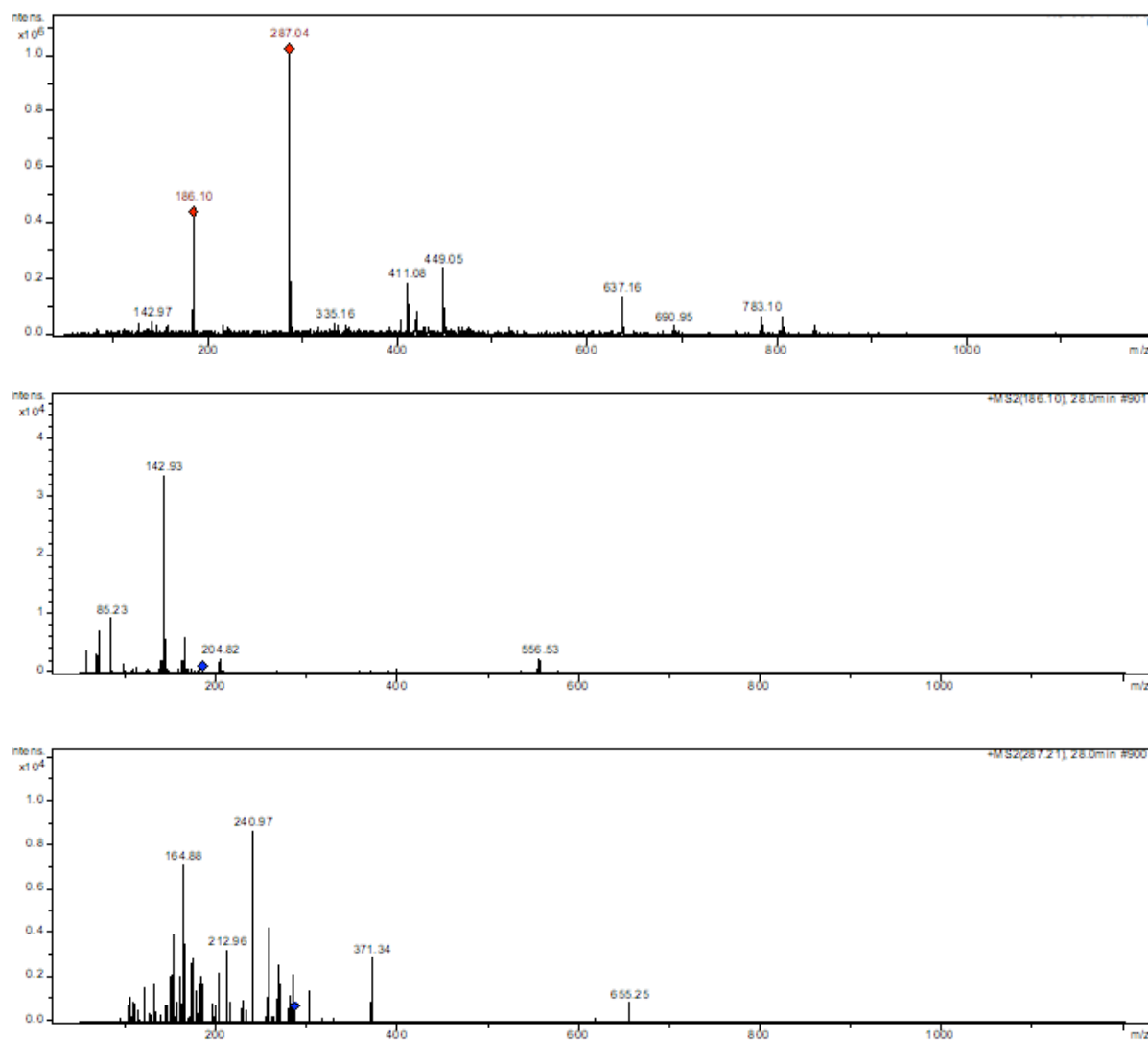
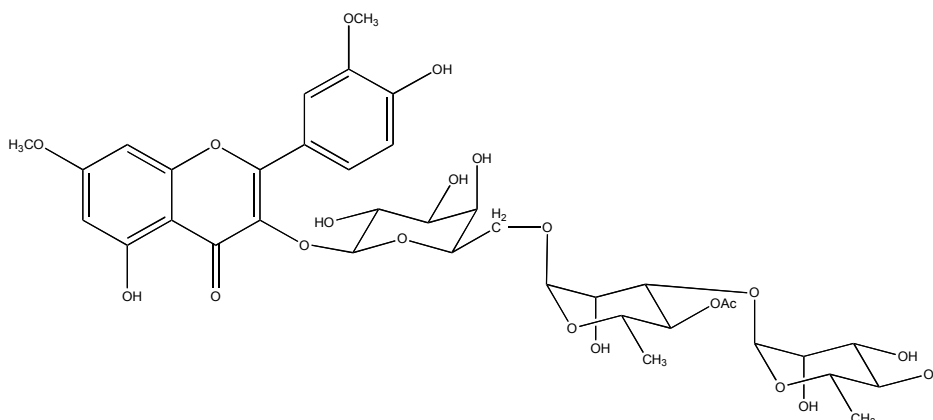


Figure A.1. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-acétyl-rhamninoside de kaempférol.

3-O-acétyl-rhamninoside de rhamnazine



Formule brute : $C_{37}H_{46}O_{21}$ - Masse molaire : $826 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

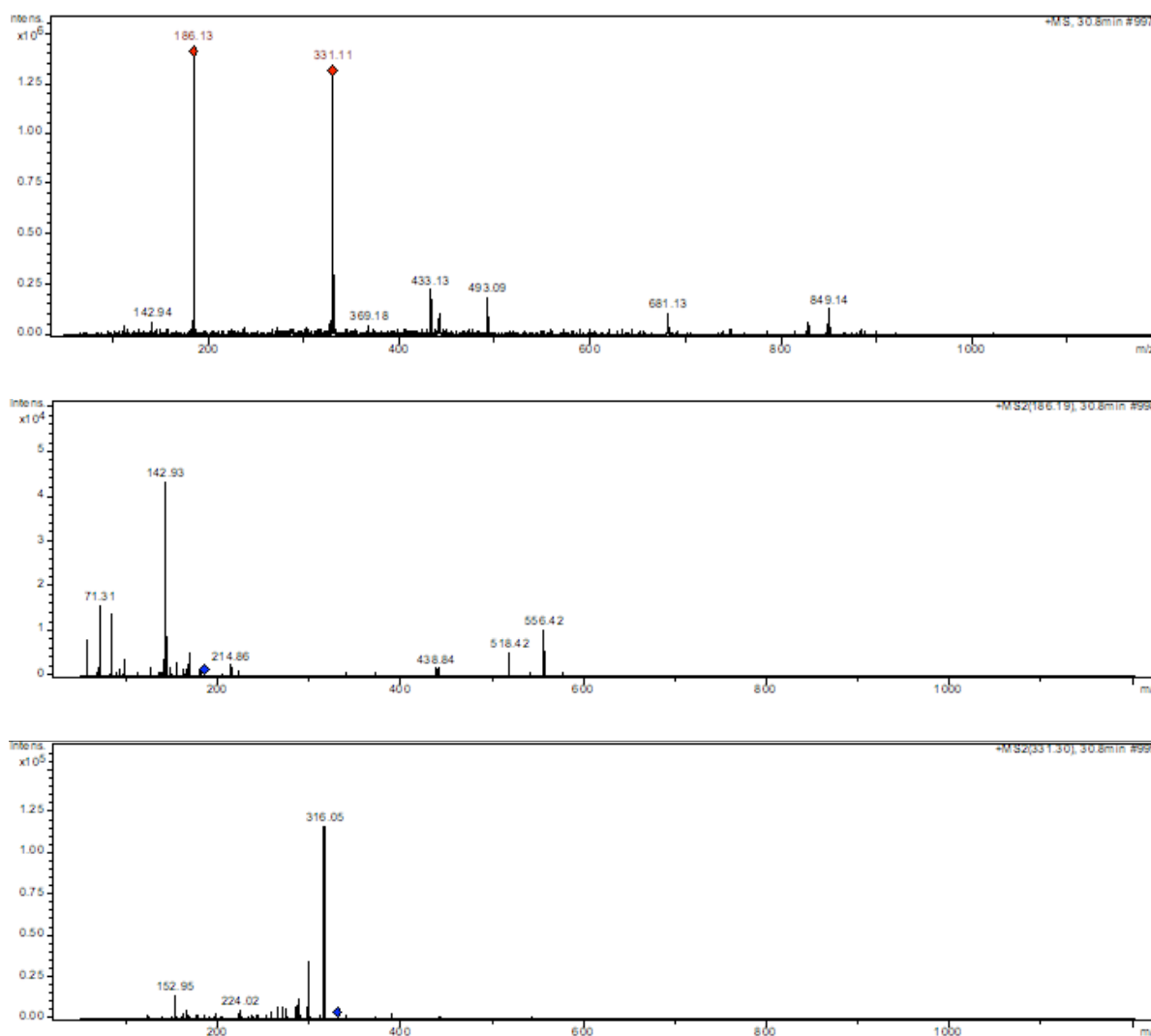
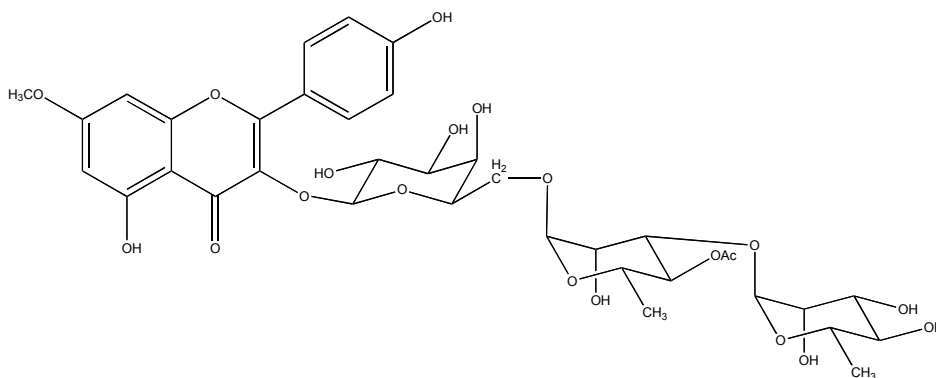


Figure A.2. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-acétyl-rhamninoside de rhamnazine.

3-O-acétyl-rhamninoside de rhamnocitrine



Formule brute : $C_{36}H_{44}O_{20}$ - Masse molaire : 796 g.mol^{-1}

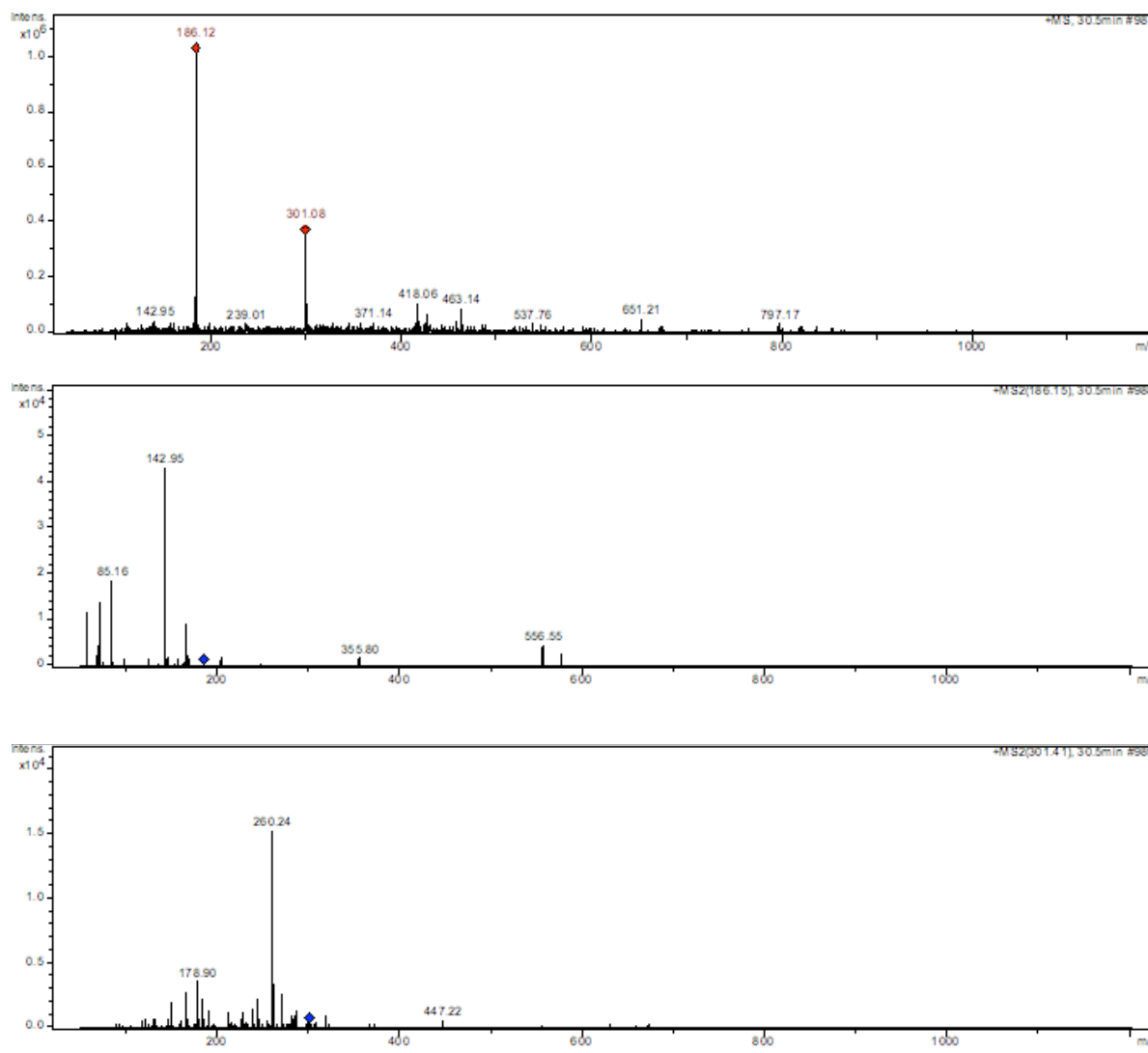
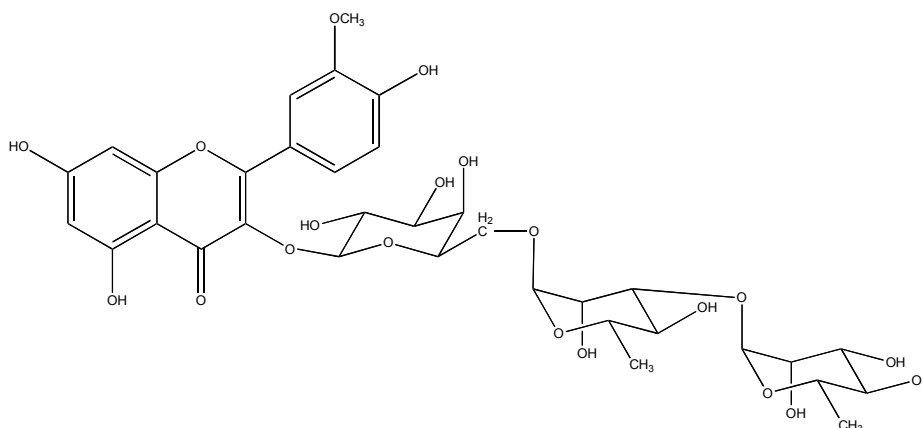


Figure A.3. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-acétyl-rhamninoside de rhamnocitrine.

3-O-rhamninoside d'isorhamnétine



Formule brute : $C_{34}H_{42}O_{20}$ - Masse molaire : $770 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

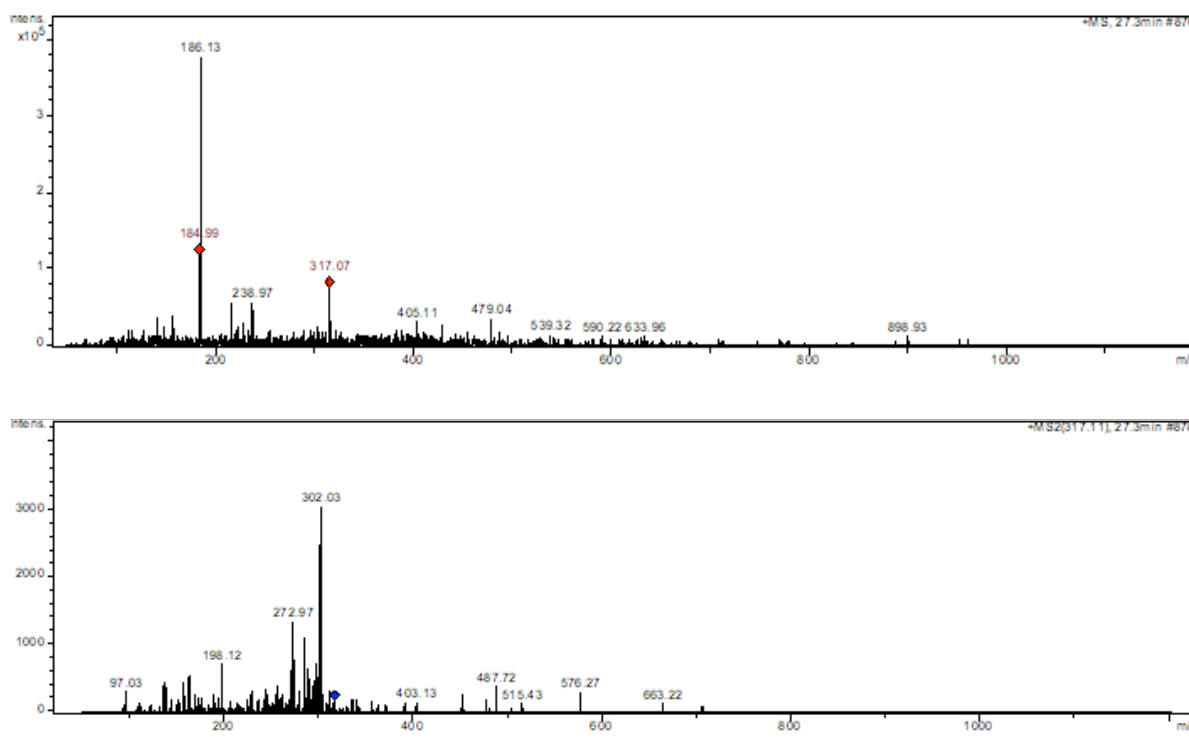
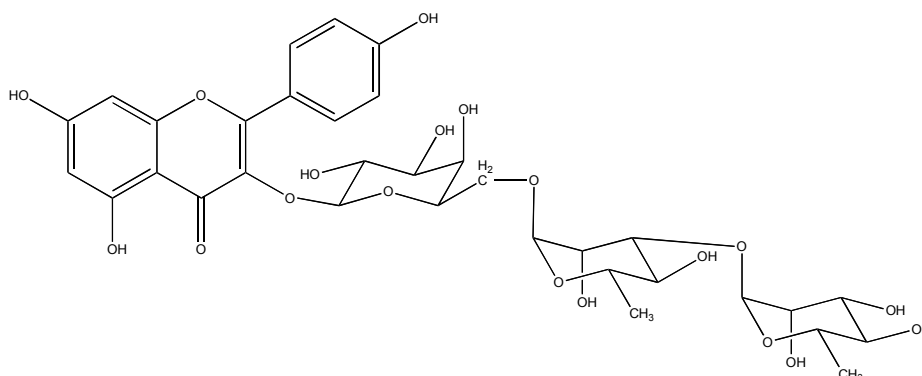


Figure A.4. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-rhamninoside d'isorhamnétine.

3-O-rhamninoside de kaempférol



Formule brute : $C_{33}H_{40}O_{19}$ - Masse molaire : $740 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

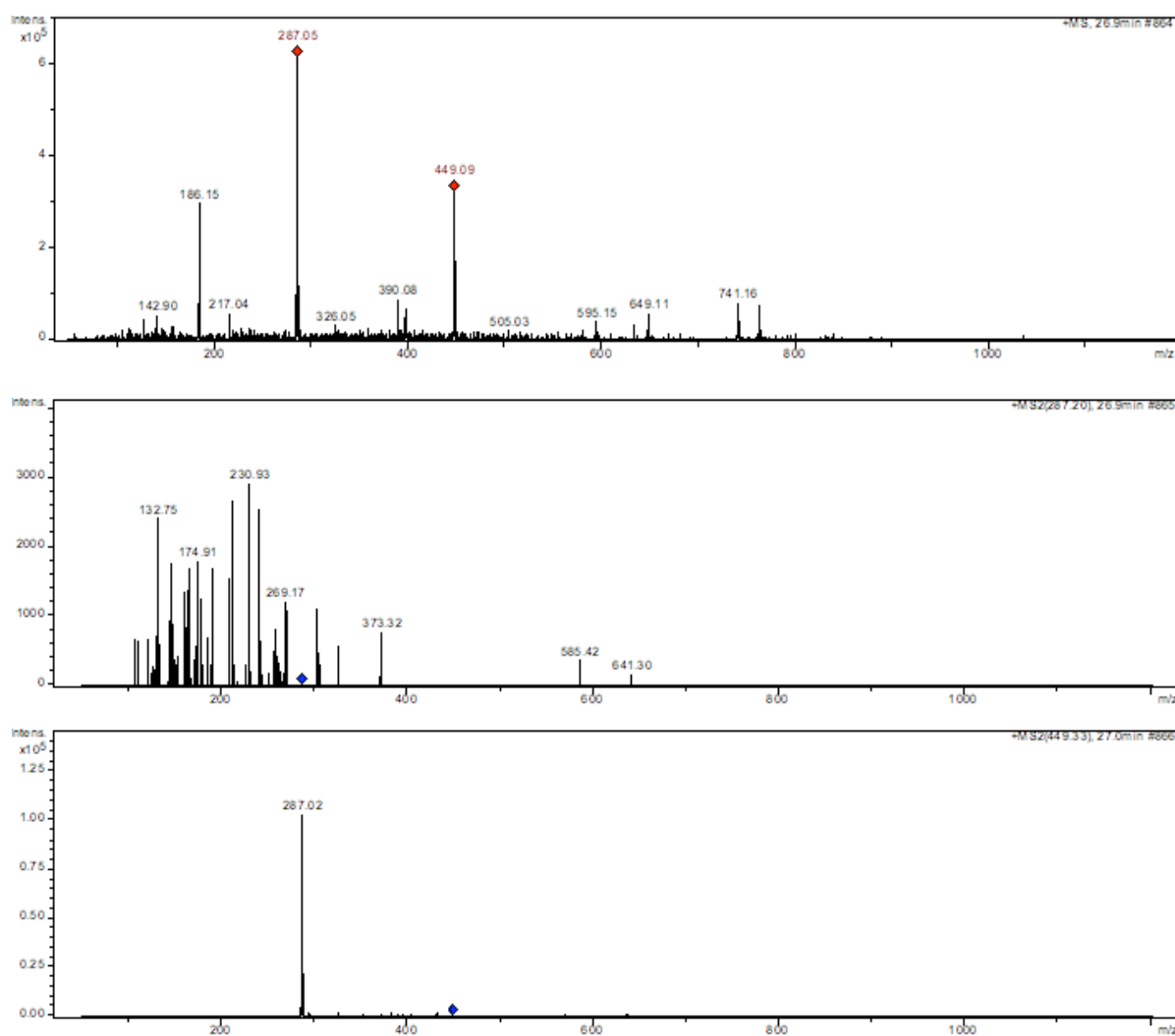
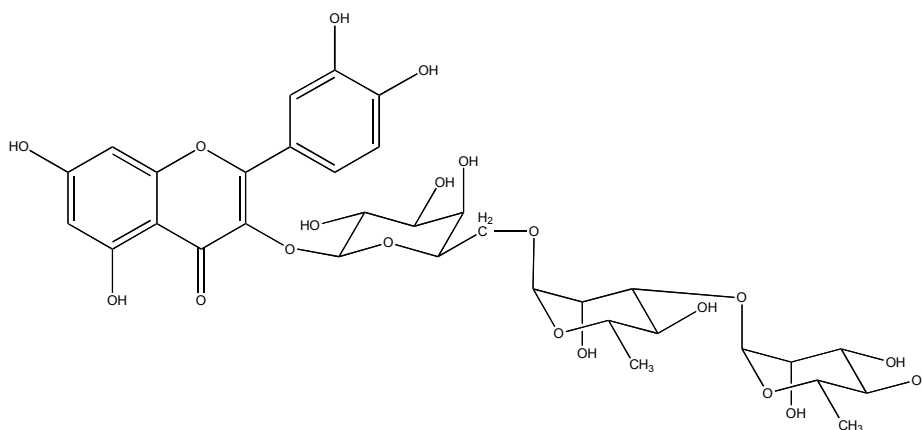


Figure A.5. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-rhamninoside de kaempférol.

3-O-rhamninoside de quercétine



Formule brute : $C_{33}H_{40}O_{20}$ - Masse molaire : $756 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

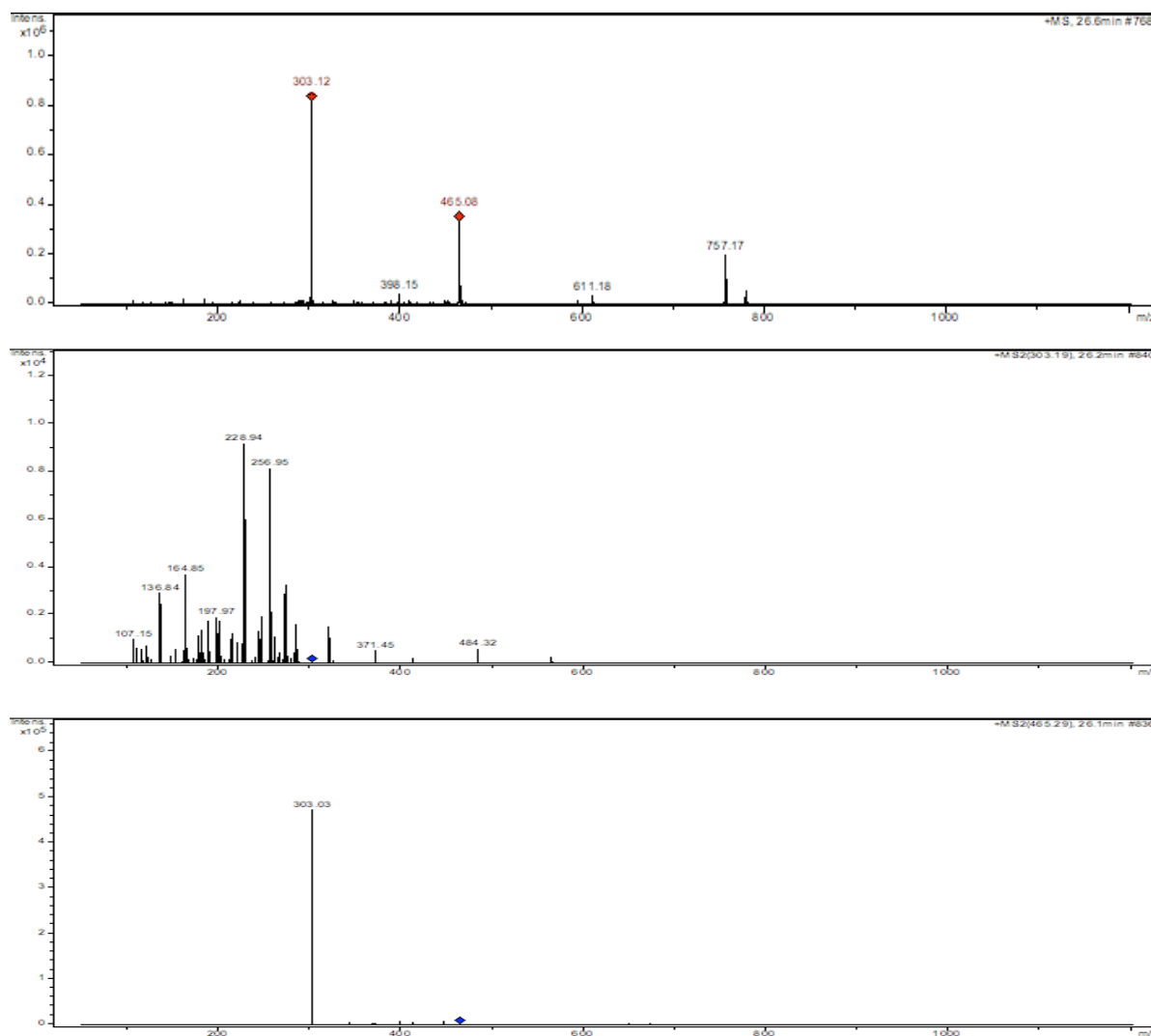
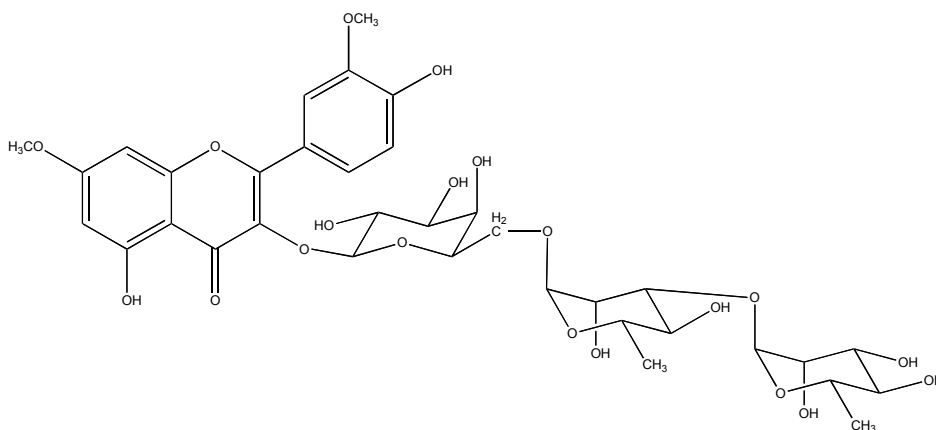


Figure A.6. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-rhamninoside de quercétine.

3-O-rhamninoside de rhamnazine



Formule brute : $C_{35}H_{44}O_{20}$ - Masse molaire : $784 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

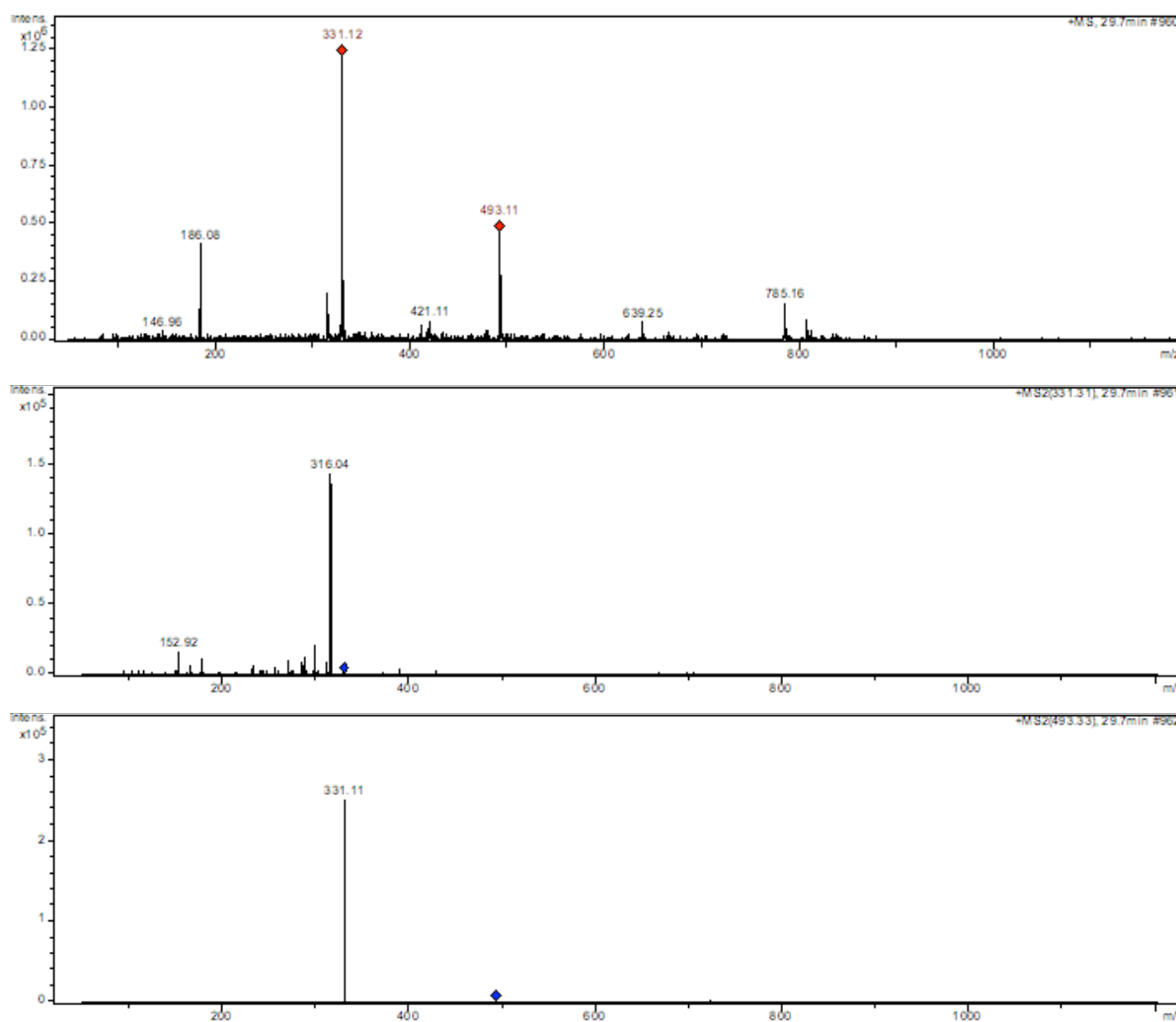
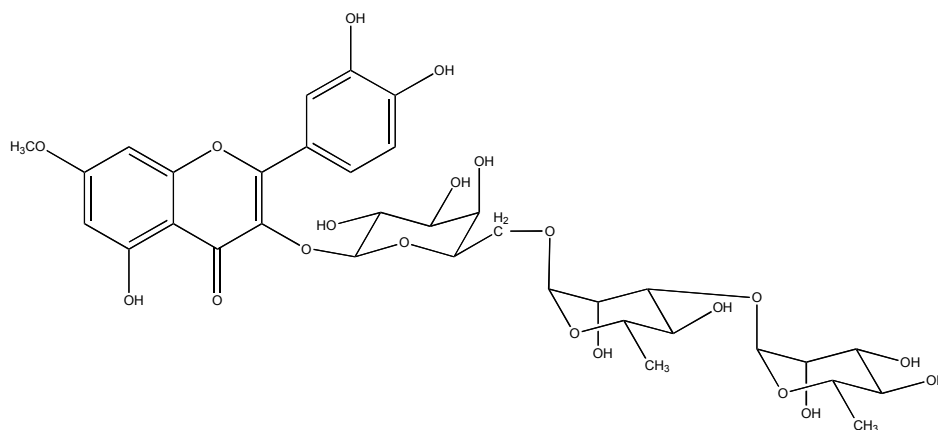


Figure A.7. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-rhamninoside de rhamnazine.

3-O-rhamninoside de rhamnétine



Formule brute : $C_{34}H_{42}O_{20}$ - Masse molaire : $770 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

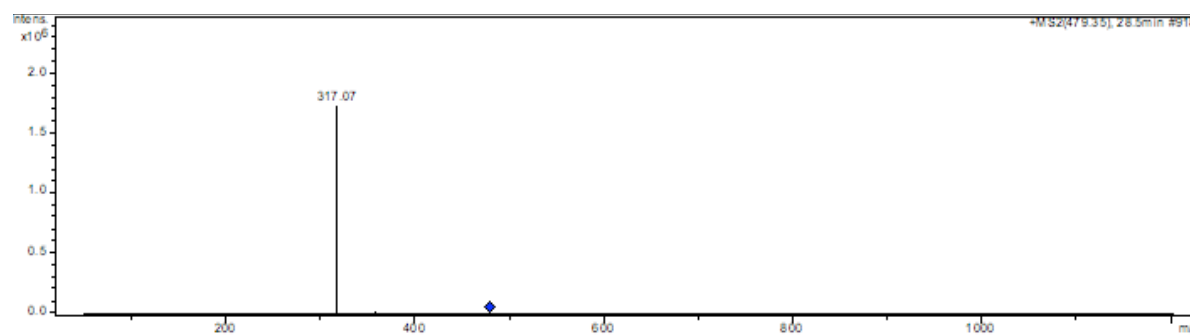
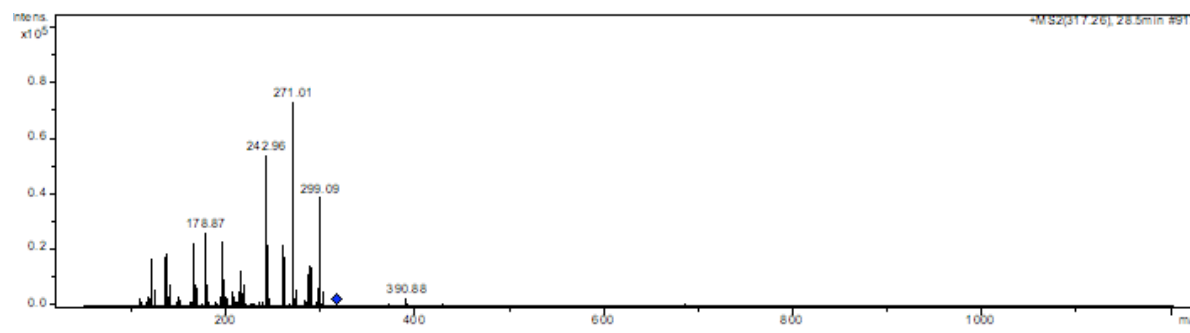
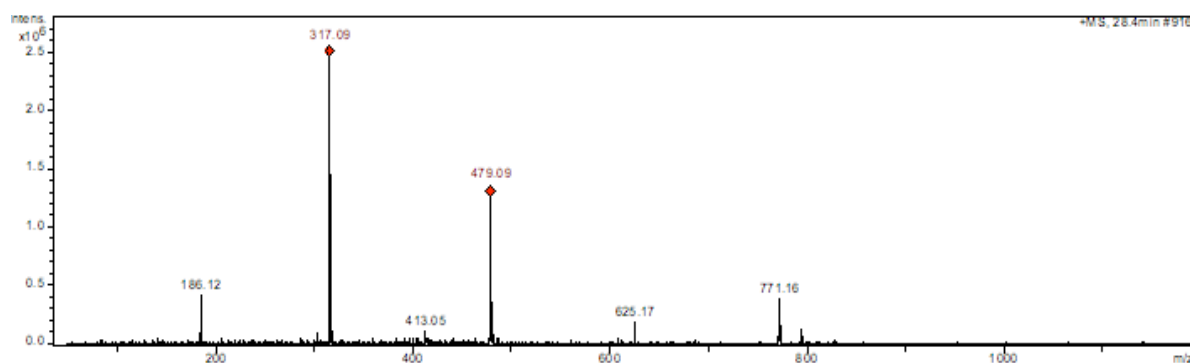
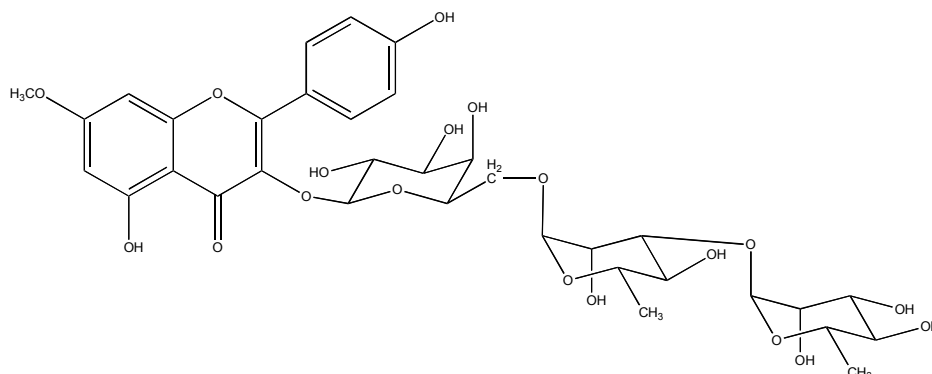


Figure A.8. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-rhamninoside de rhamnétine.

3-O-rhamninoside de rhamnocitrine



Formule brute : $C_{34}H_{42}O_{19}$ - Masse molaire : 754 g.mol^{-1}

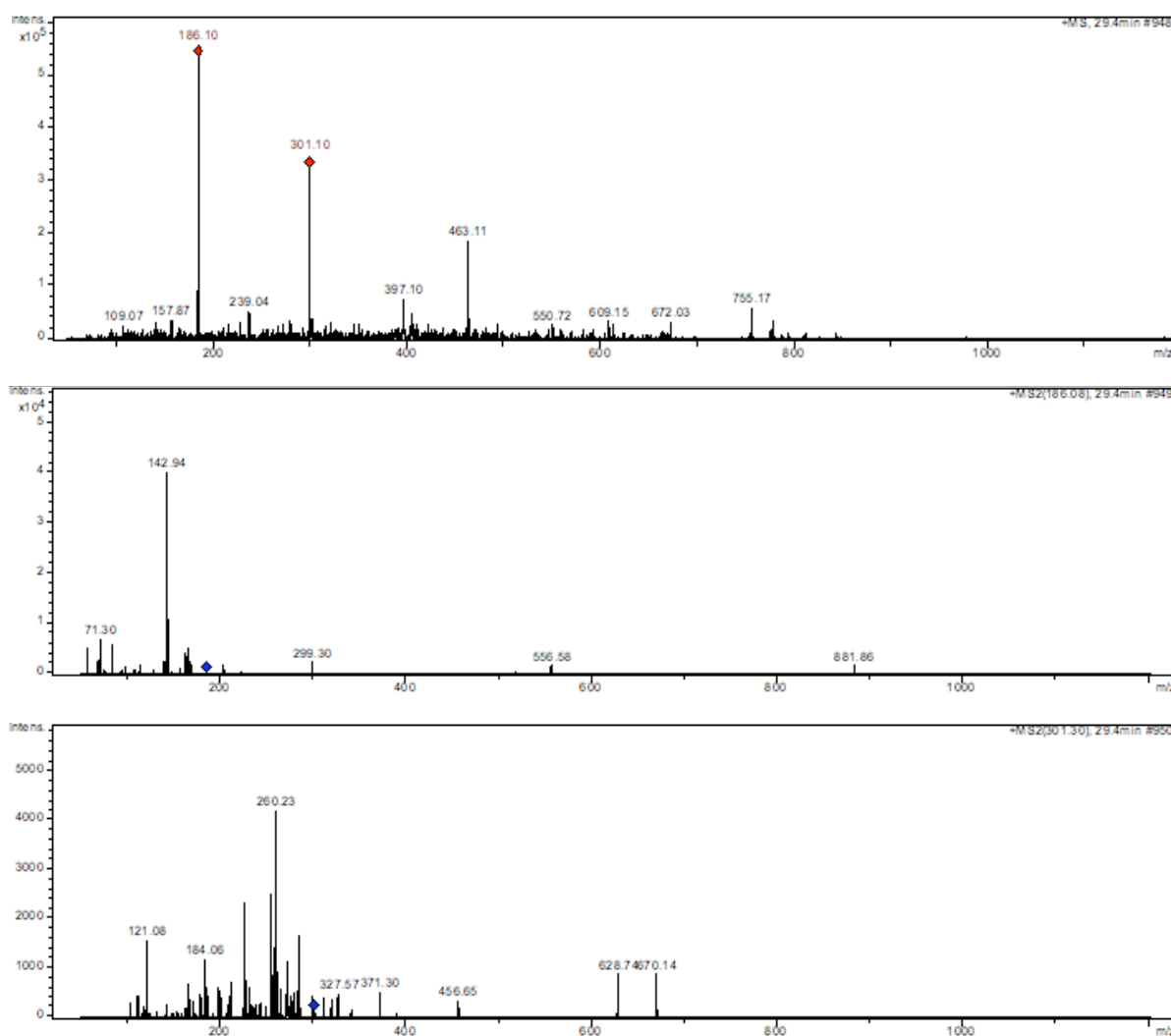
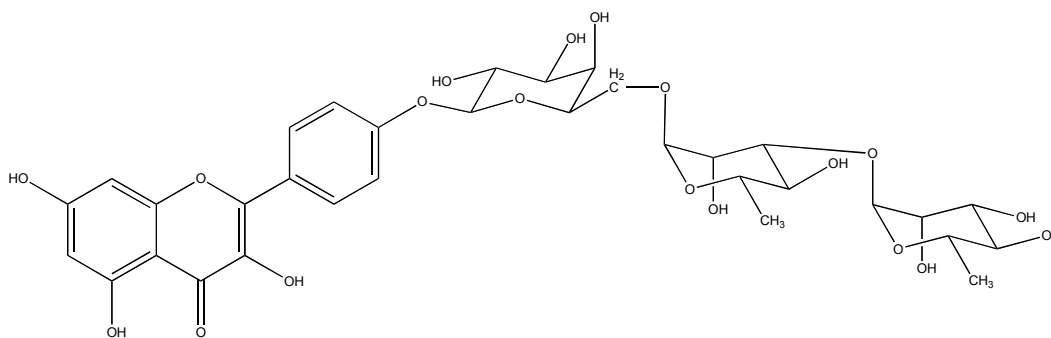


Figure A.9. Spectres de masse, en mode positif, du 3-O-rhamninoside de rhamnocitrine.

4'-*O*-rhamninoside de kaempférol



Formule brute : $C_{33}H_{40}O_{19}$ - Masse molaire : $740 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

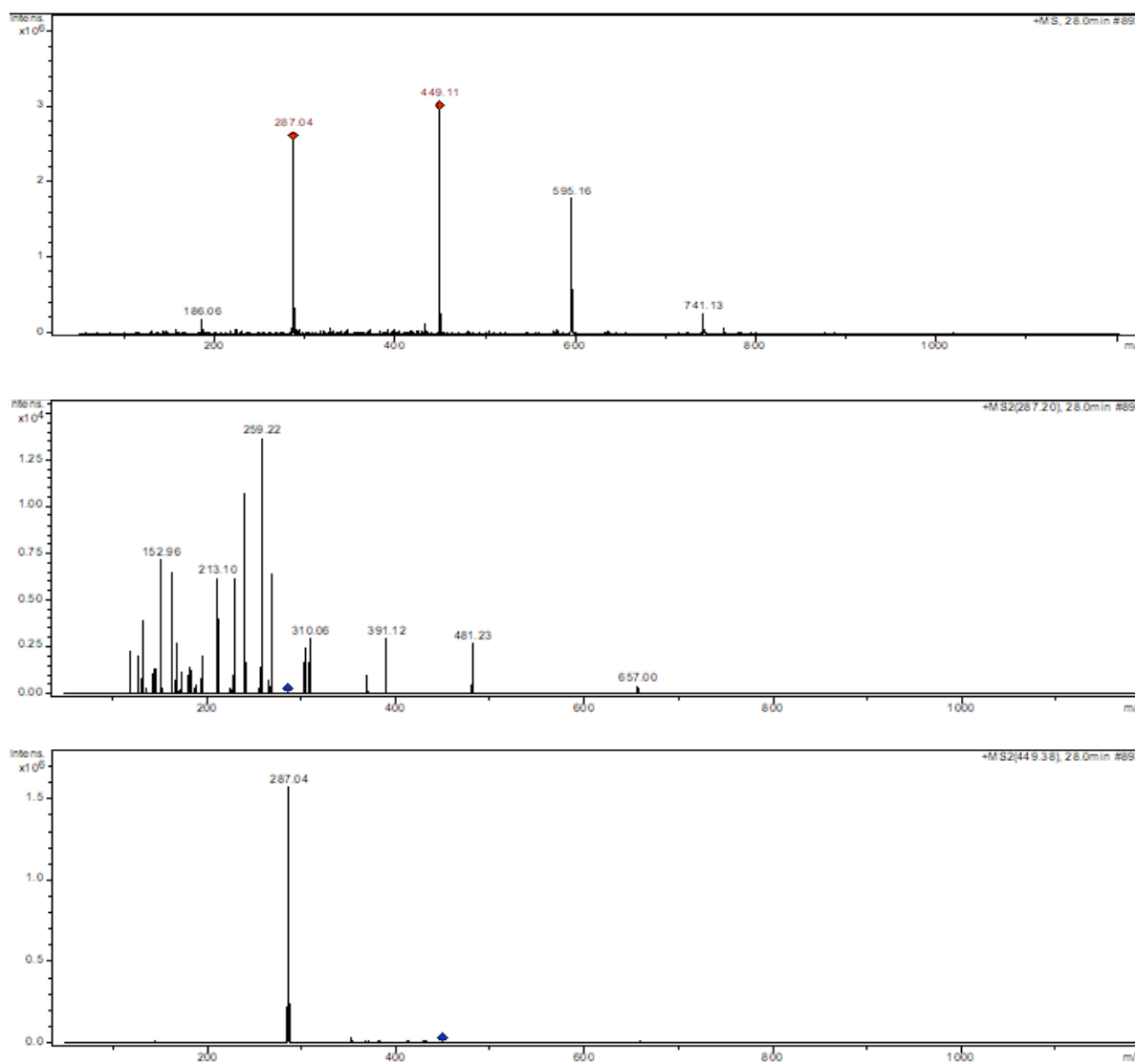
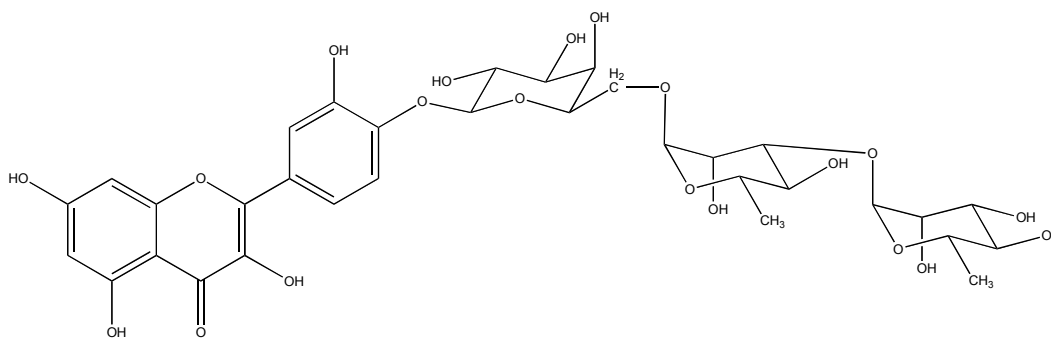


Figure A.10. Spectres de masse, en mode positif, du 4'-*O*-rhamninoside de kaempférol.

4'-*O*-rhamninoside de quercétine



Formule brute : $C_{33}H_{40}O_{20}$ - Masse molaire : 756 g.mol^{-1}

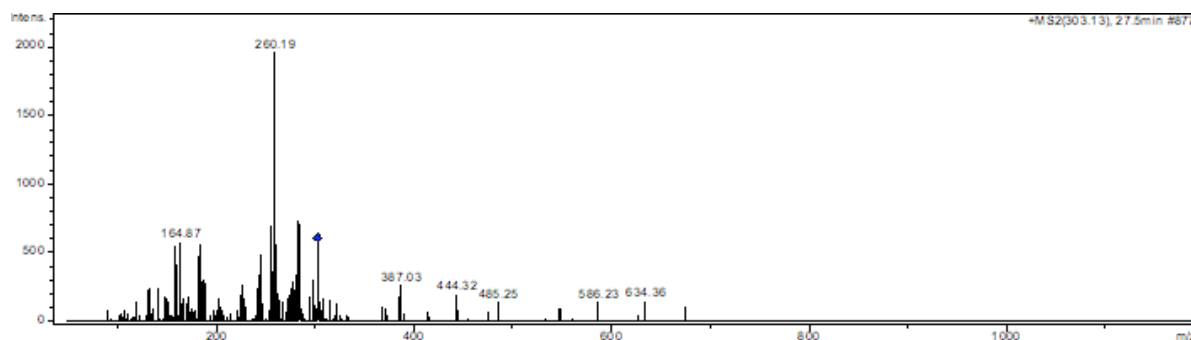
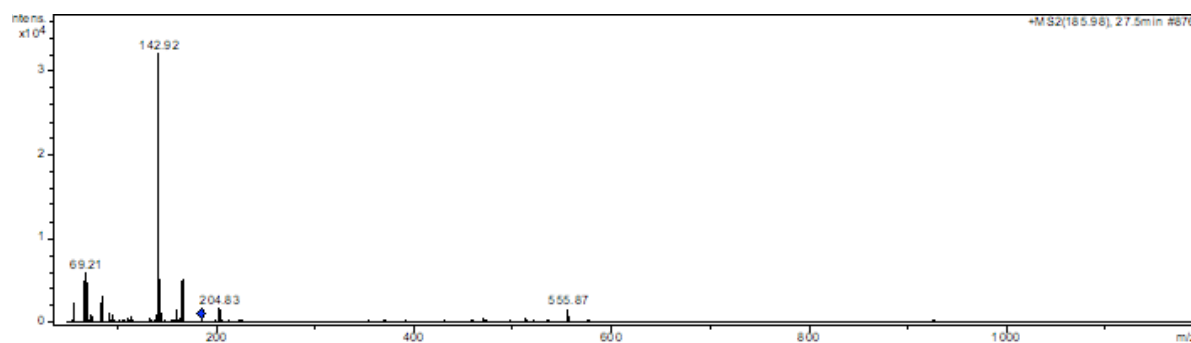
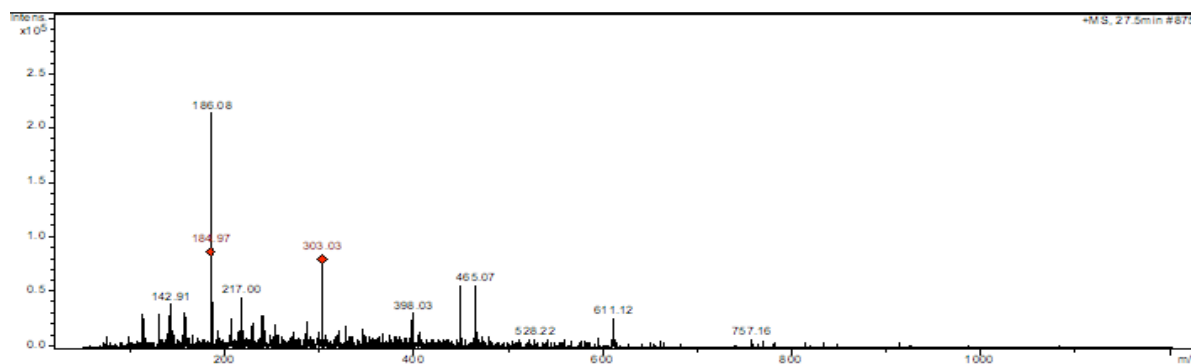
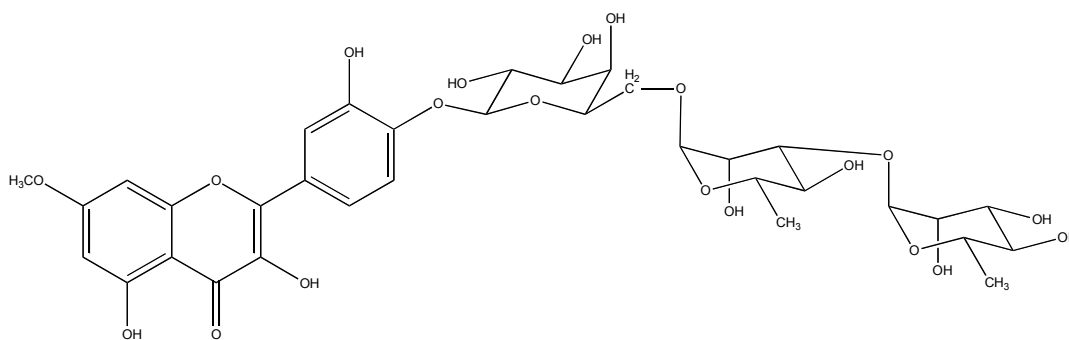


Figure A.11. Spectres de masse, en mode positif, du 4'-*O*-rhamninoside de quercétine.

4'-*O*-rhamninoside de rhamnétine

Formule brute : $C_{34}H_{42}O_{20}$ - Masse molaire : 770 g.mol^{-1}

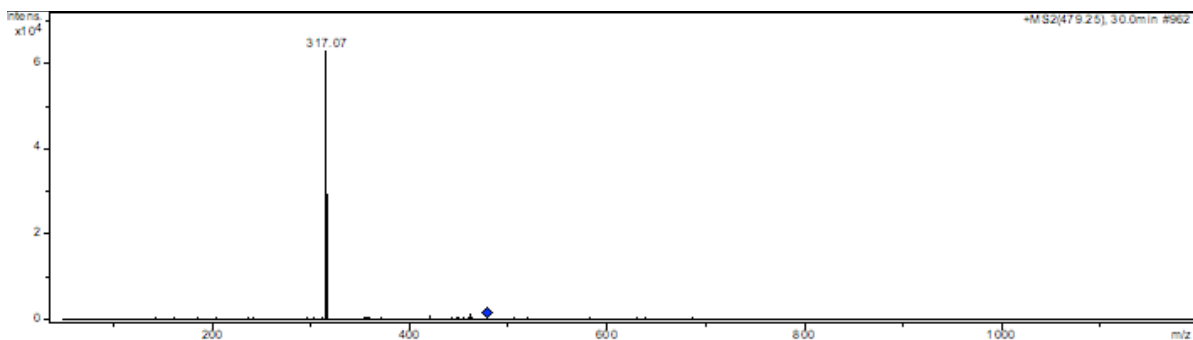
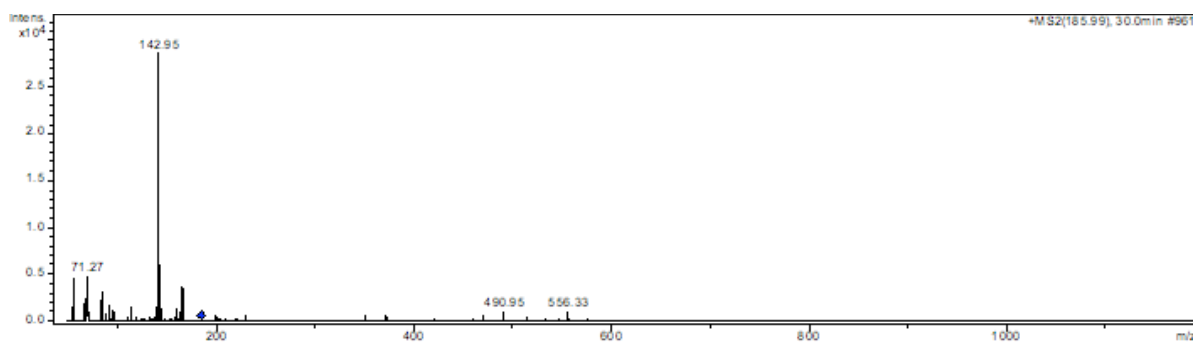
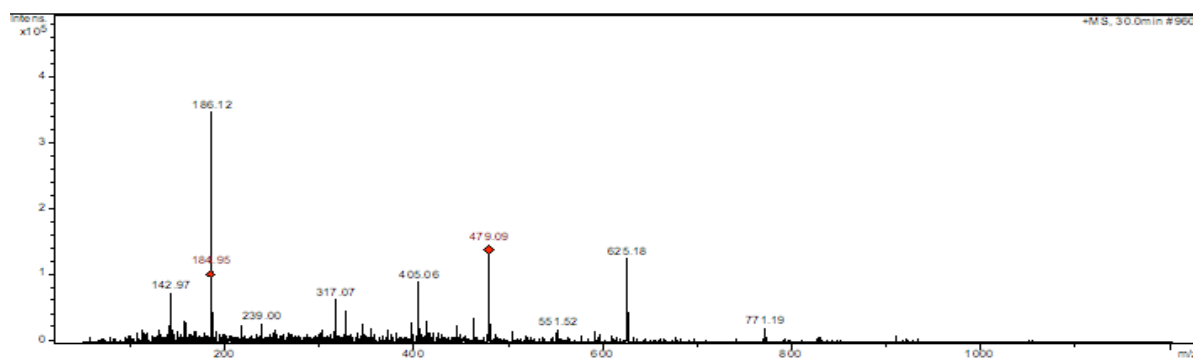
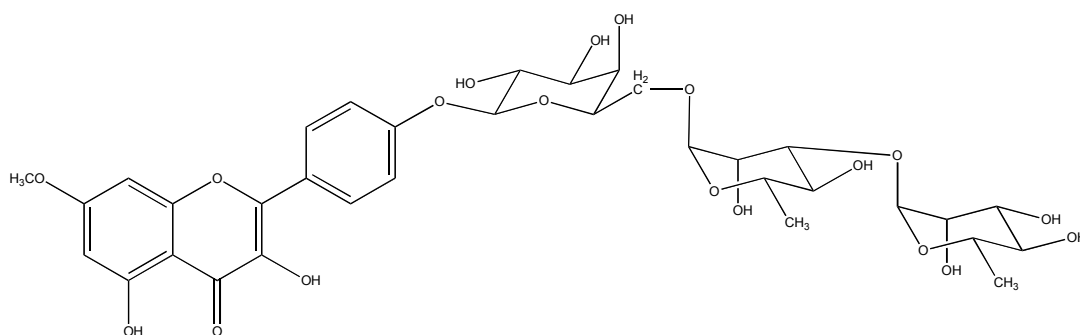


Figure A.12. Spectres de masse, en mode positif, du 4'-*O*-rhamninoside de rhamnétine.

4'-*O*-rhamninoside de rhamnocitrine

Formule brute : $C_{34}H_{42}O_{19}$ - Masse molaire : 754 g.mol^{-1}

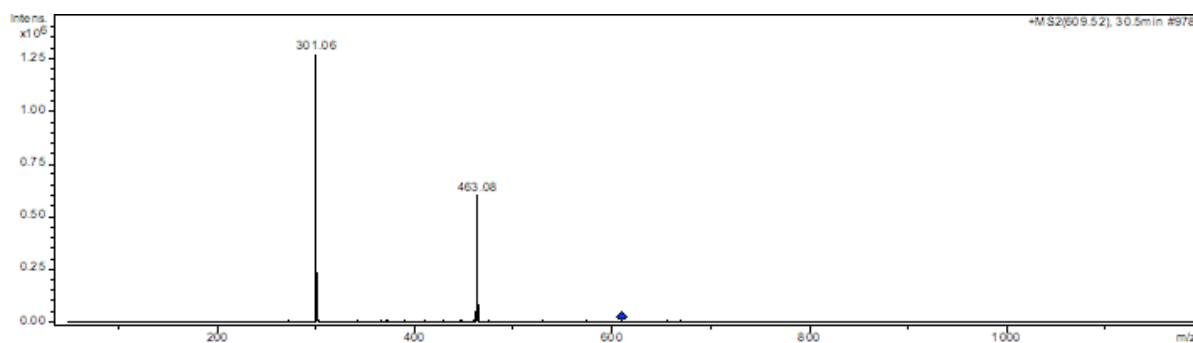
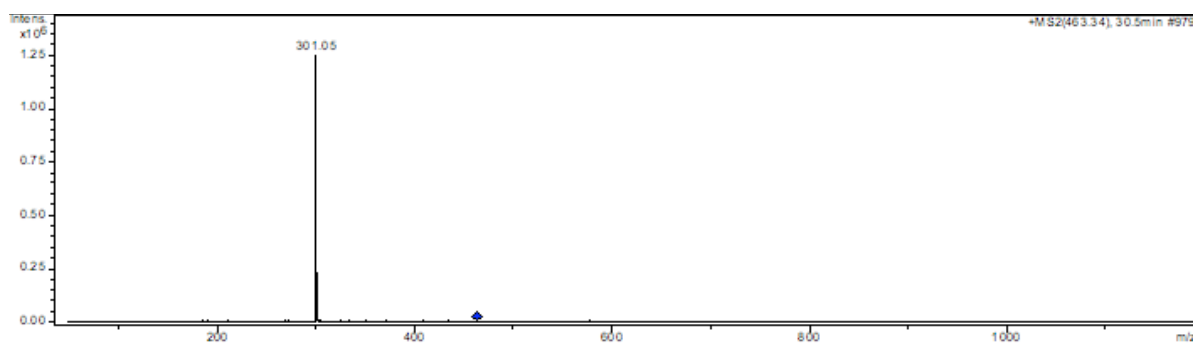
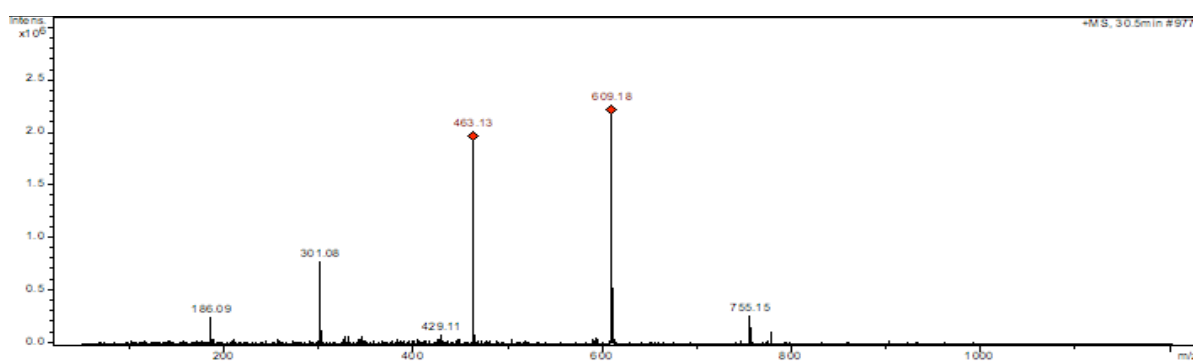
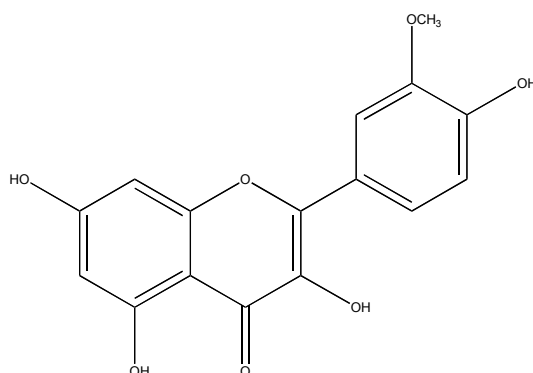


Figure A.13. Spectres de masse, en mode positif, du 4'-*O*-rhamninoside de rhamnocitrine.

Isorhamnétine



Formule brute : $C_{16}H_{12}O_7$ - Masse molaire : 316 g.mol^{-1}

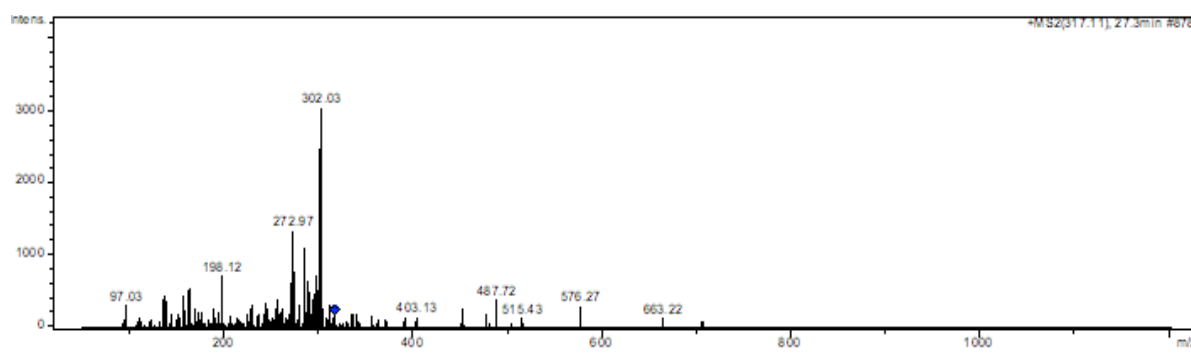
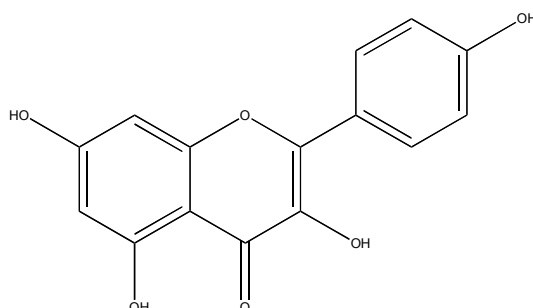


Figure A.14. Spectres de masse, en mode positif, de l'isorhamnétine.

Kaempférol



Formule brute : $C_{15}H_{10}O_6$ - Masse molaire : 286 g.mol^{-1}

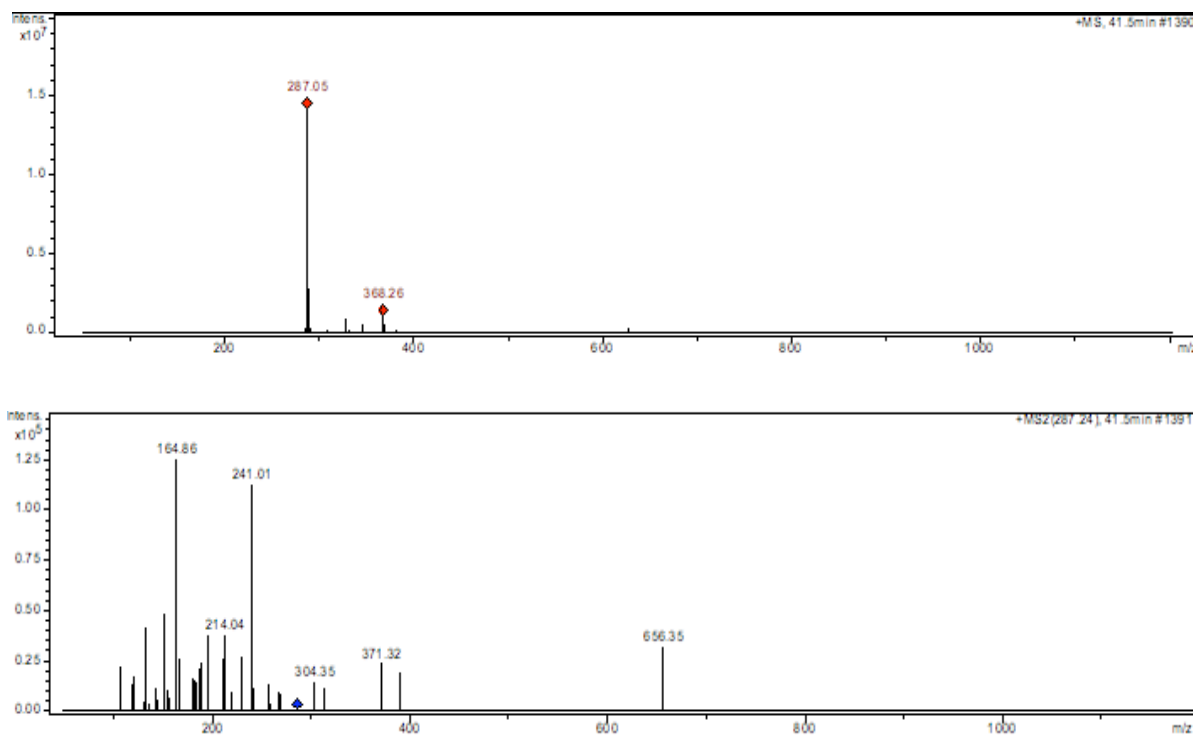
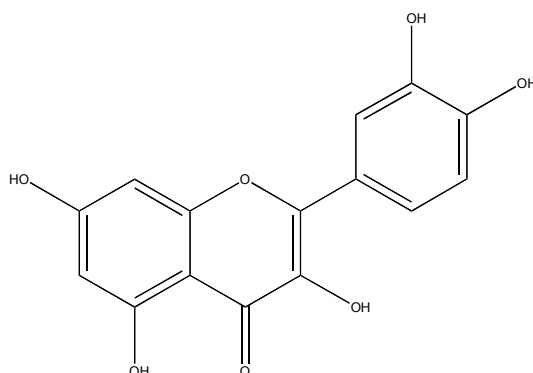


Figure A.15. Spectres de masse, en mode positif, du kaempférol.

Quercétine



Formule brute : $C_{15}H_{10}O_7$ - Masse molaire : 302 g.mol^{-1}

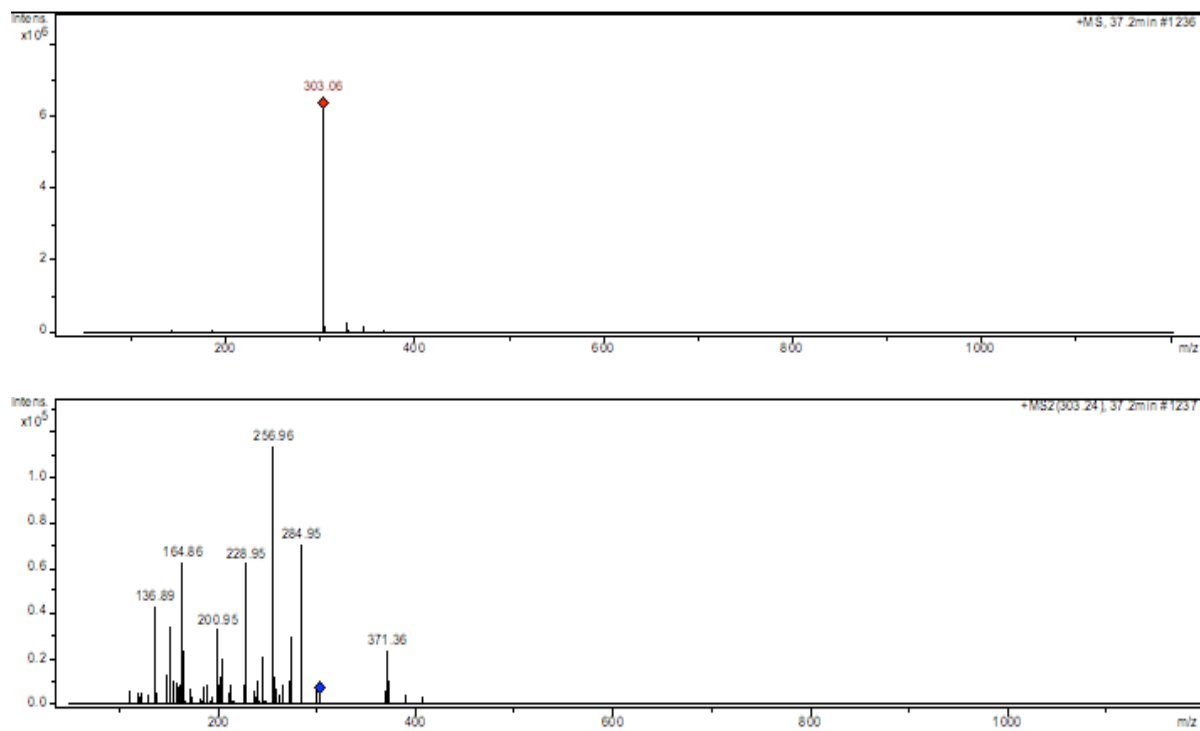
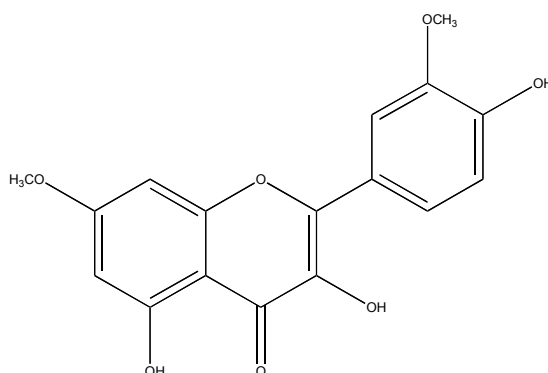


Figure A.16. Spectres de masse, en mode positif, de la quercétine.

Rhamnazine



Formule brute : C₁₄H₁₄O₇ - Masse molaire : 330 g.mol⁻¹

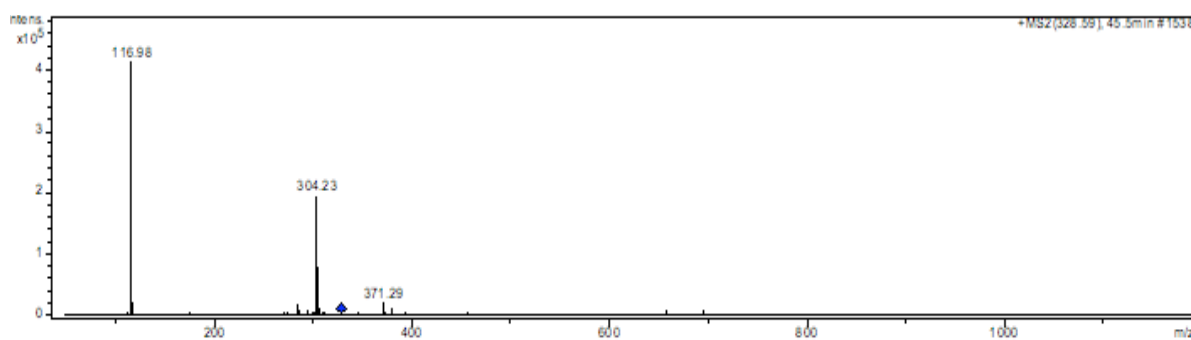
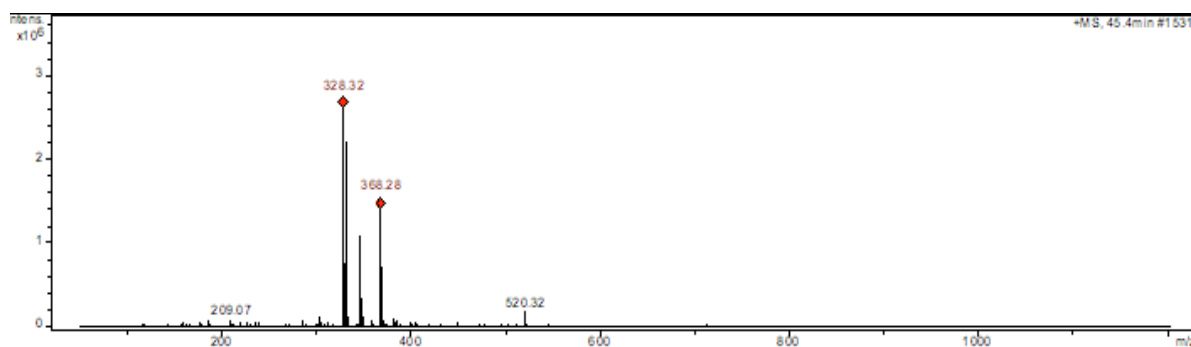
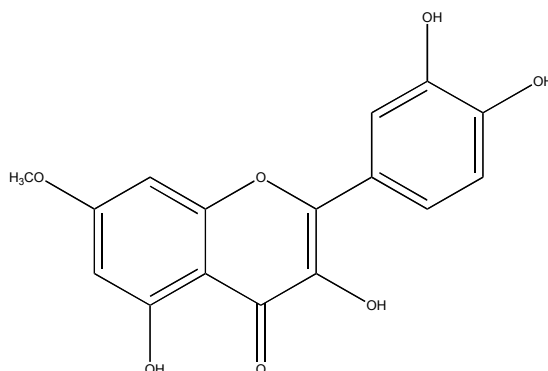


Figure A.17. Spectres de masse, en mode positif, de la rhamnazine.

Rhamnétine



Formule brute : $C_{16}H_{12}O_7$ - Masse molaire : 316 g.mol^{-1}

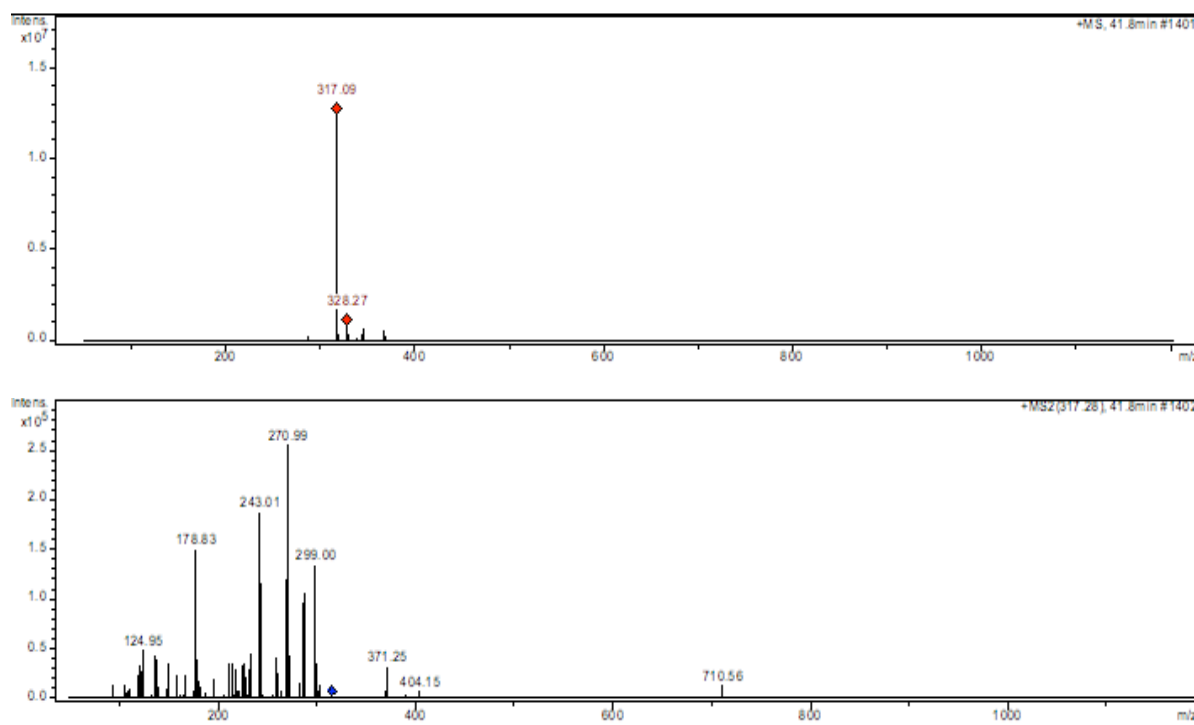
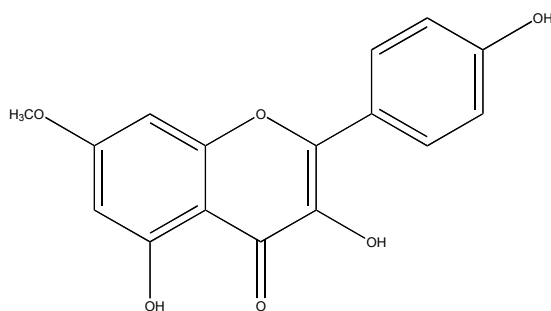


Figure A.18. Spectres de masse, en mode positif, de la rhamnétine.

Rhamnocitrine



Formule brute : C₁₆H₁₂O₆ - Masse molaire : 300 g.mol⁻¹

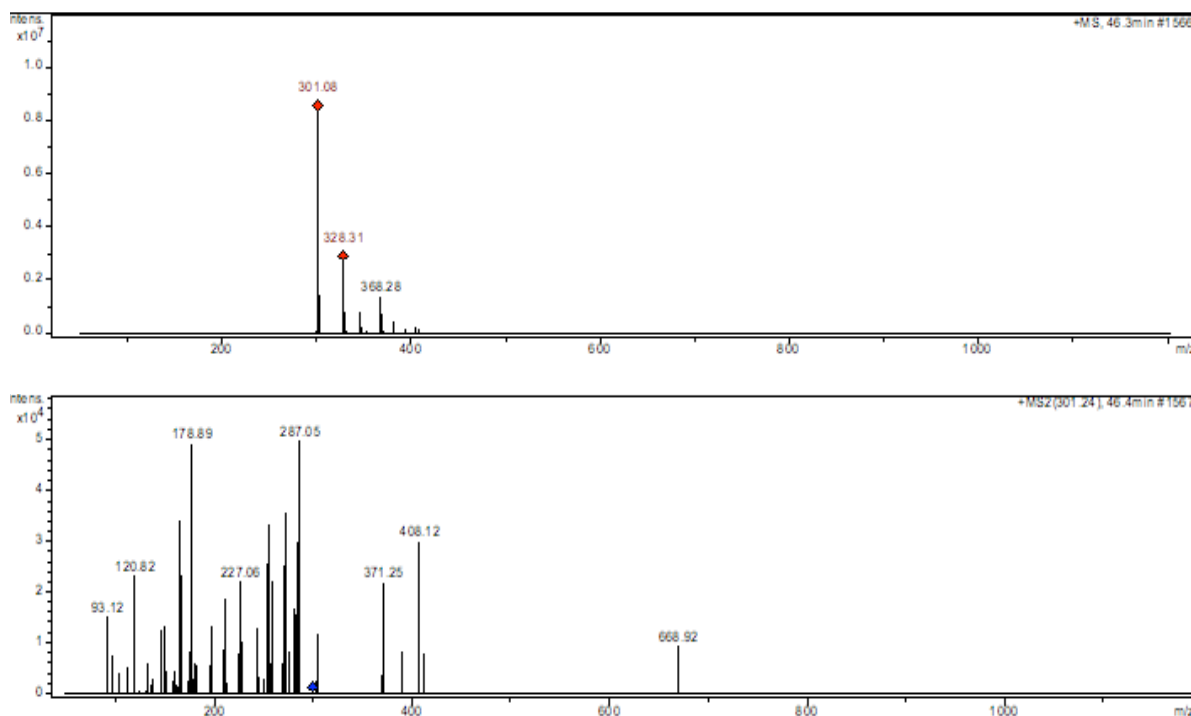
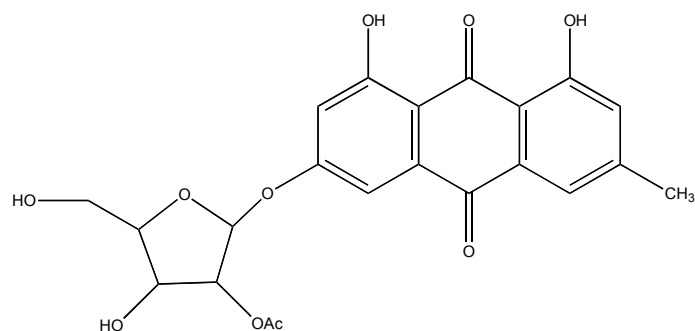


Figure A.19. Spectres de masse, en mode positif, de la rhamnocitrine.

ANNEXE III
SPECTRES DE MASSE
DES ANTHRAQUINONES PRÉSENTES
DANS LES NERPRUNS

6-*O*-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émodyne



Formule brute : $C_{22}H_{20}O_{10}$ - Masse molaire : $444 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

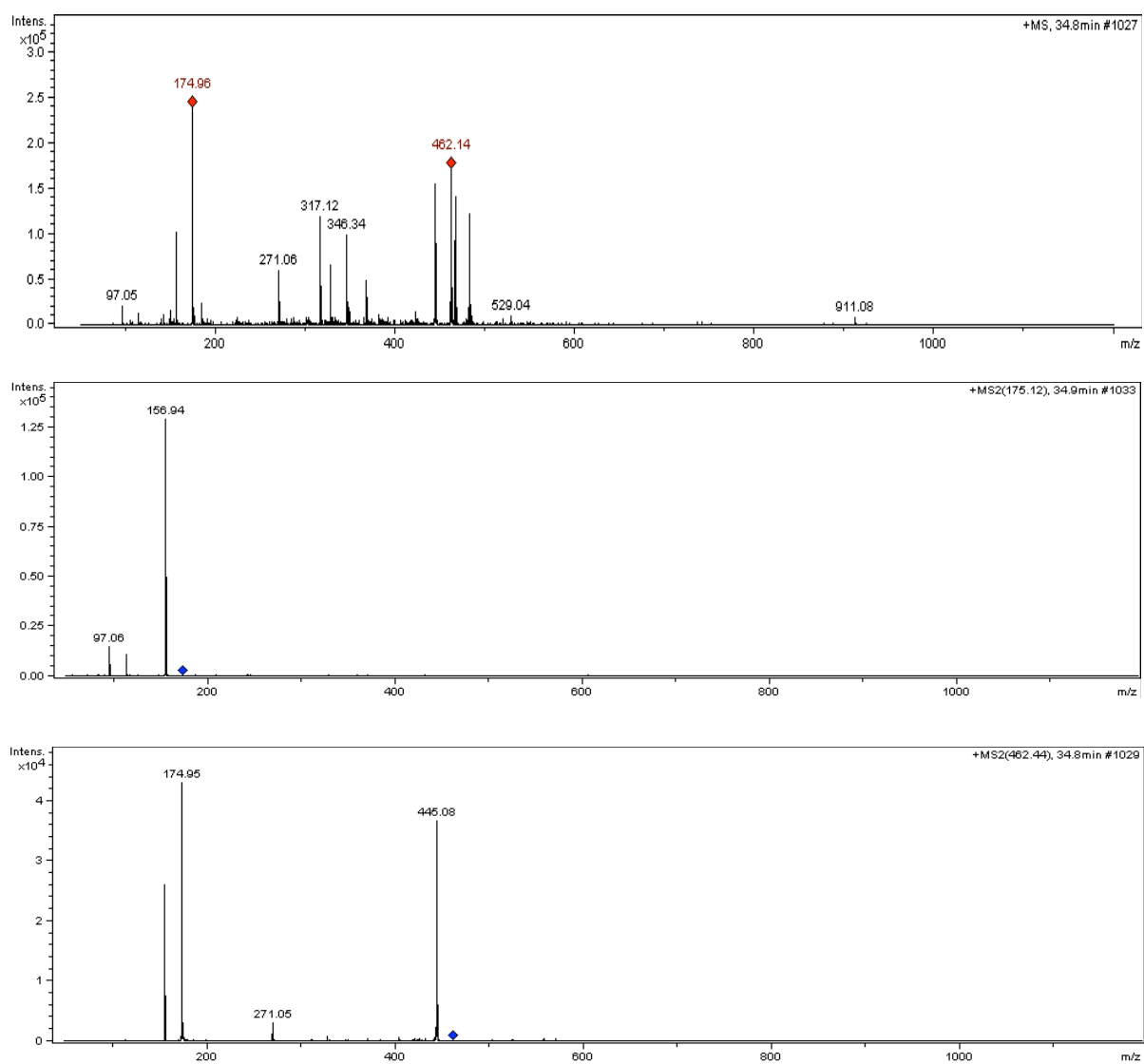
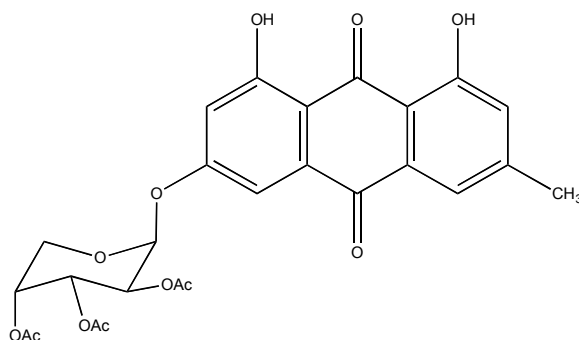


Figure A.20. Spectres de masse, en mode positif, du 6-*O*-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émodyne.

6-O-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne



Formule brute : $C_{26}H_{24}O_{12}$ - Masse molaire : 528 g.mol^{-1}

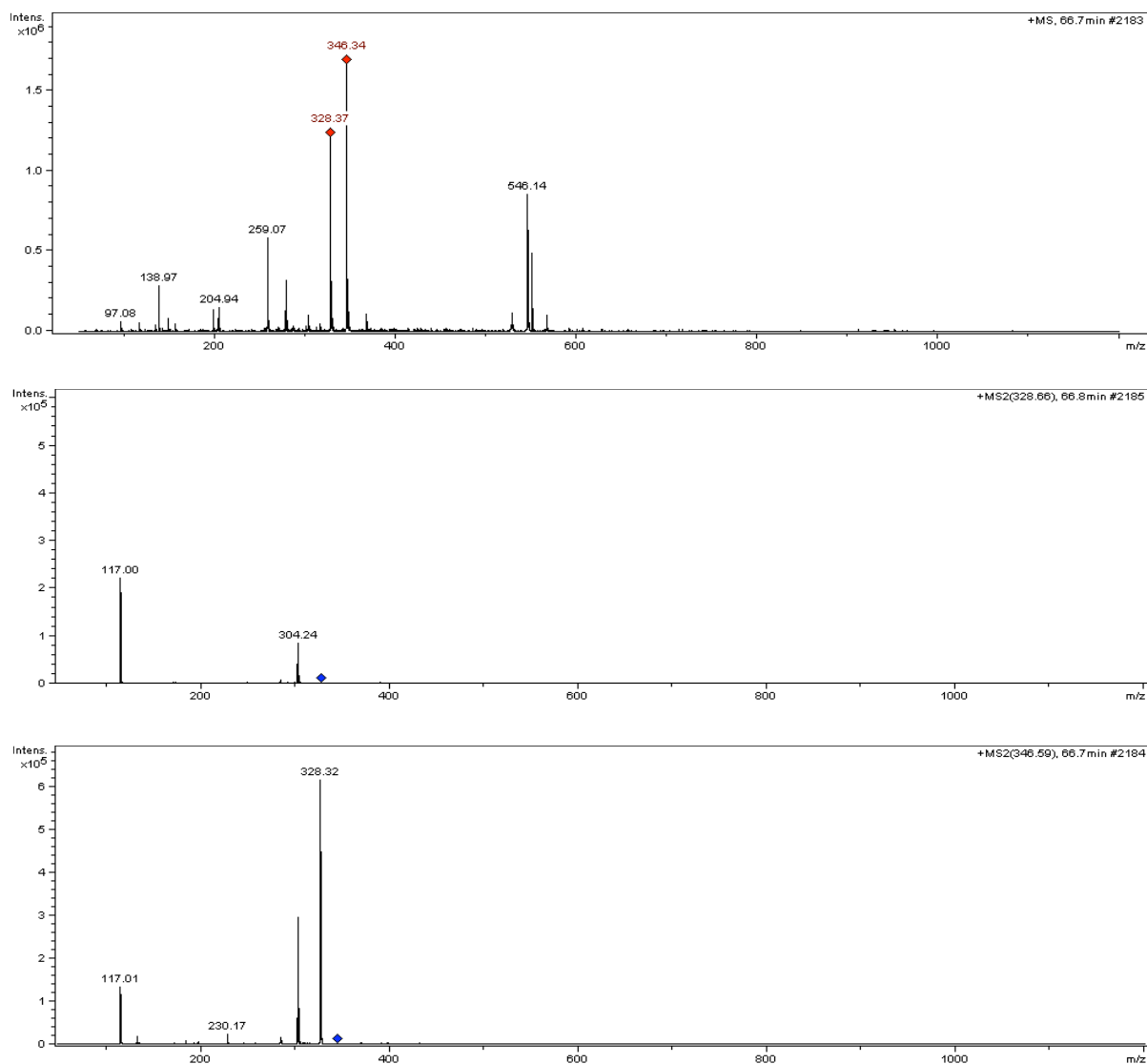
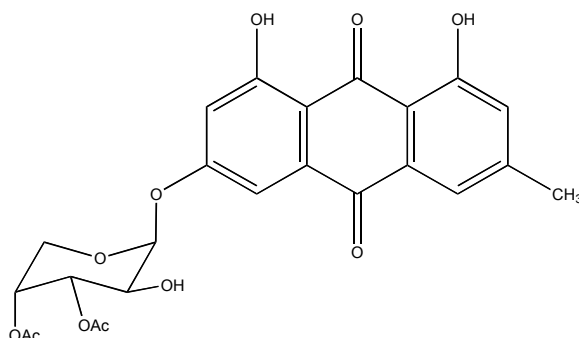


Figure A.21. Spectres de masse, en mode positif, du 6-O-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne.

6-O-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne



Formule brute : $C_{24}H_{22}O_{11}$ - Masse molaire : $486 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

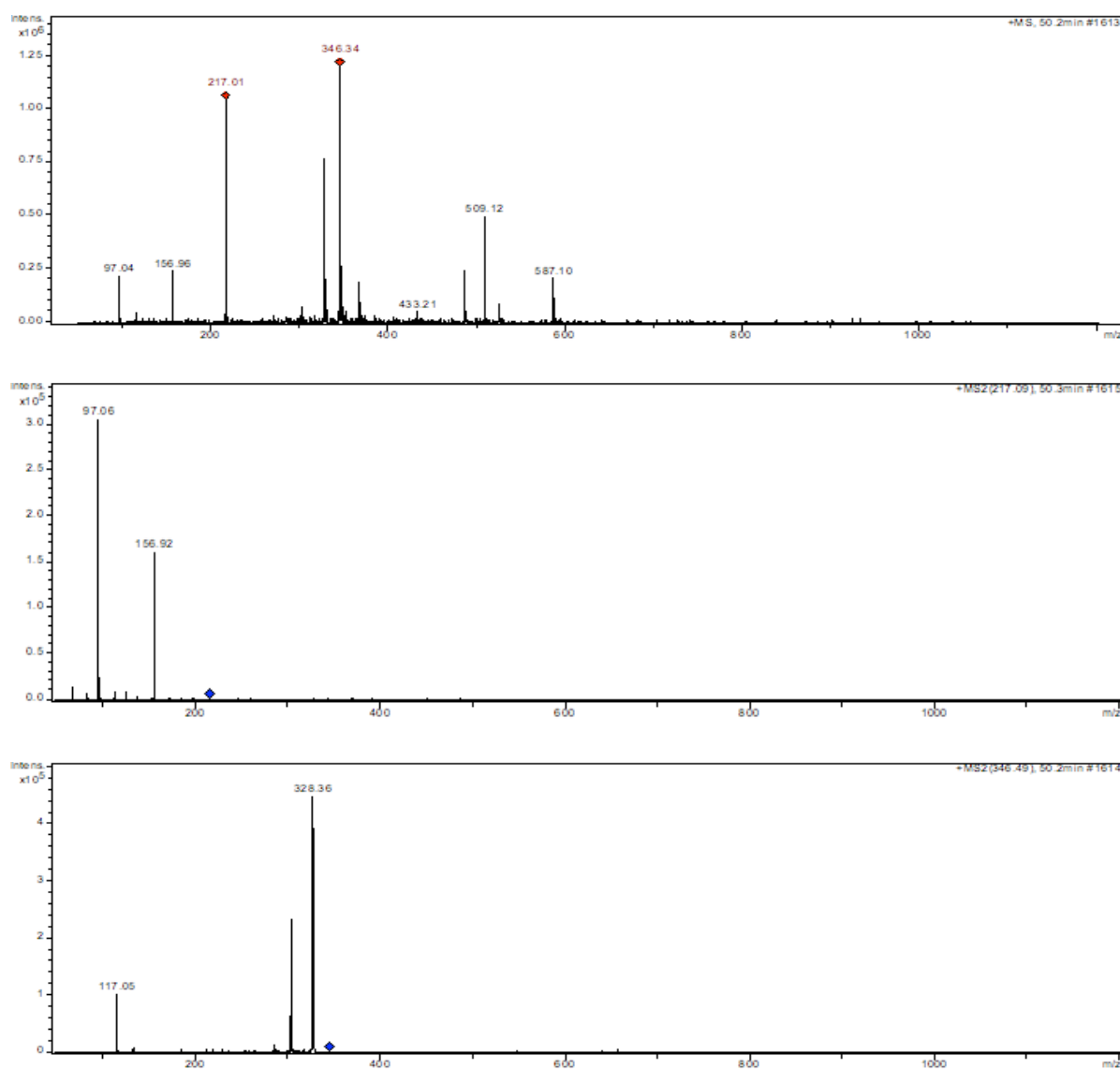
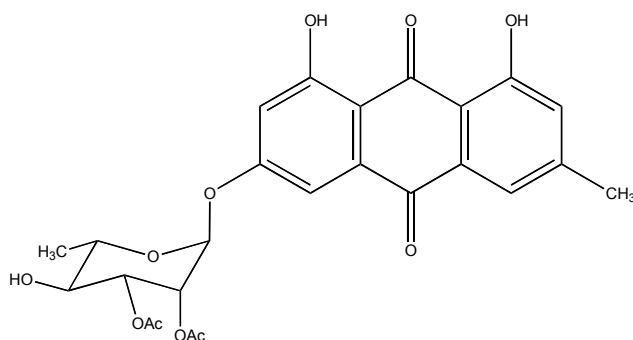


Figure A.22. Spectres de masse, en mode positif, du 6-O-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne.

6-O-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émodyne



Formule brute : $C_{25}H_{24}O_{11}$ - Masse molaire : 500 g.mol^{-1}

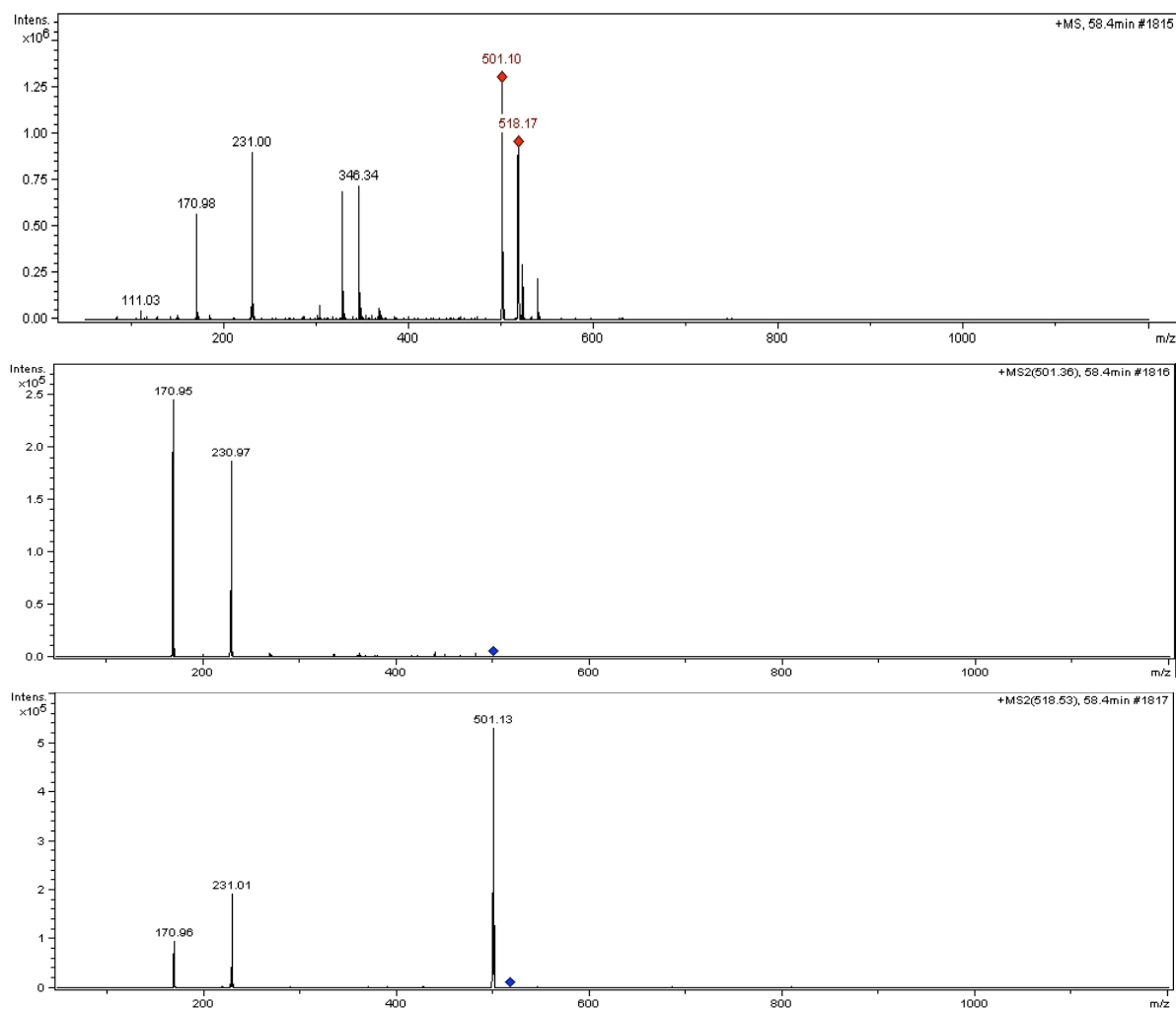
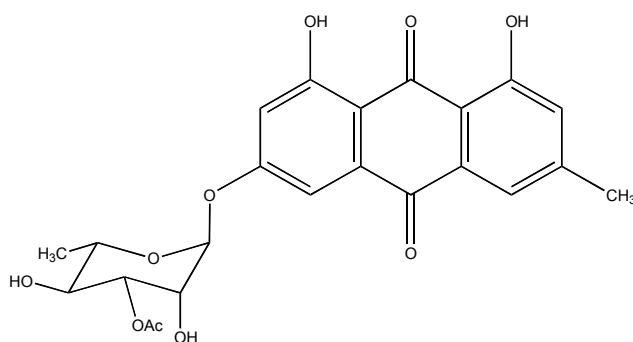


Figure A.23. Spectres de masse, en mode positif, du 6-O-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émodyne.

6-O-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émodyne



Formule brute : $C_{23}H_{22}O_{10}$ - Masse molaire : 458 g.mol^{-1}

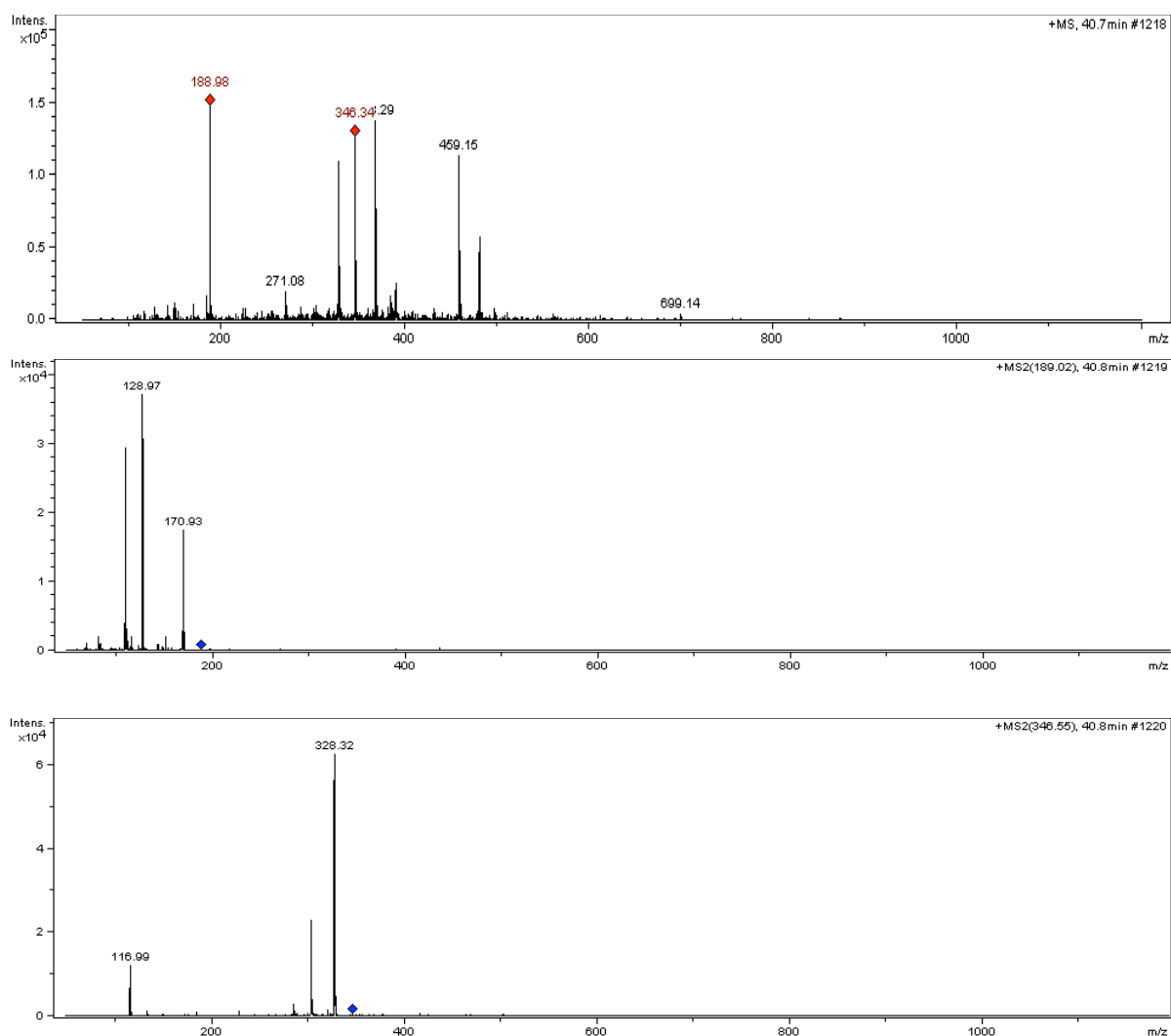
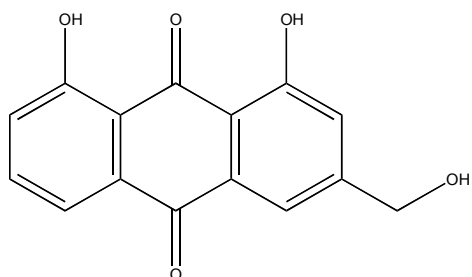


Figure A.24. Spectres de masse, en mode positif, du 6-O-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émodyne.

Aloe-émodine



Formule brute : $C_{15}H_{10}O_5$ - Masse molaire : 270 g.mol^{-1}

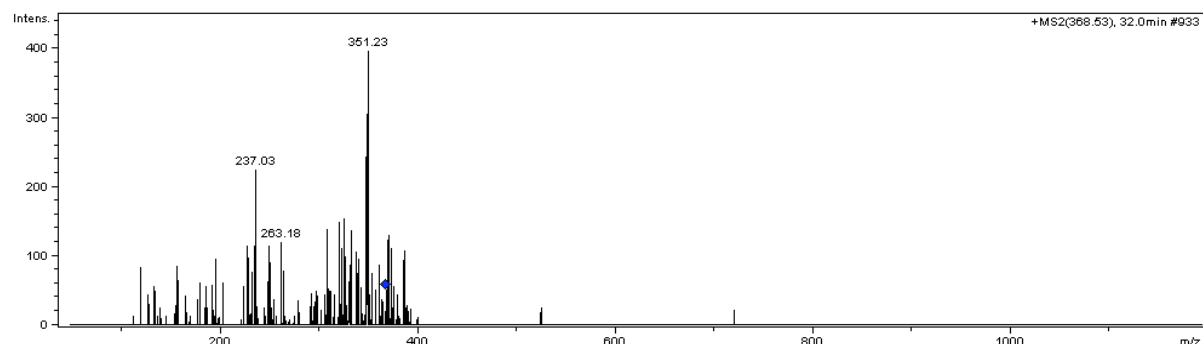
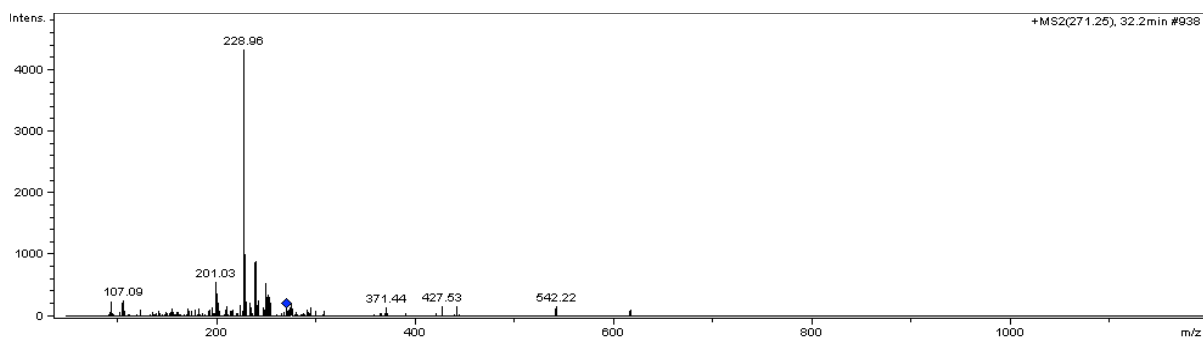
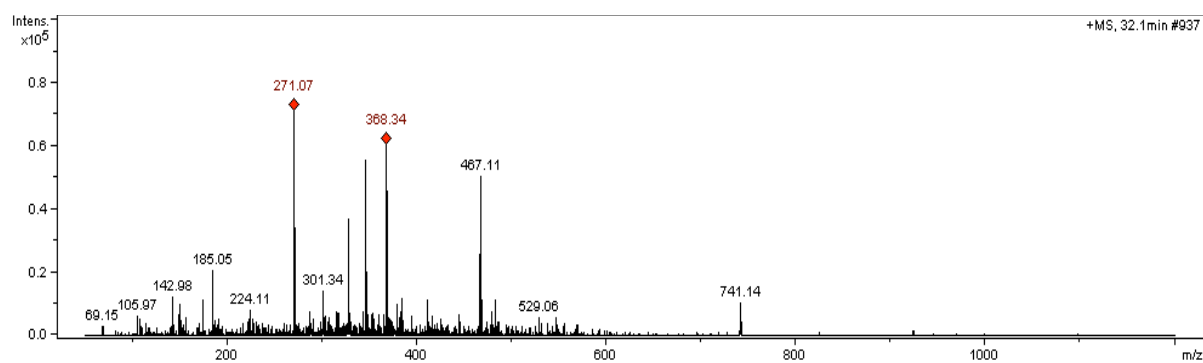
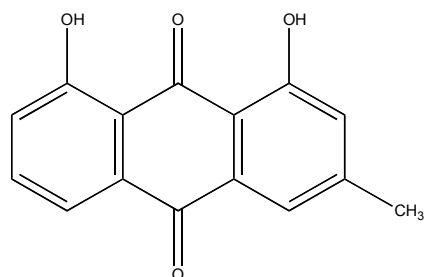


Figure A.25. Spectres de masse, en mode positif, de l'aloé-émodine.

Chrysophanol



Formule brute : C₁₅H₁₀O₄ - Masse molaire : 254 g.mol⁻¹

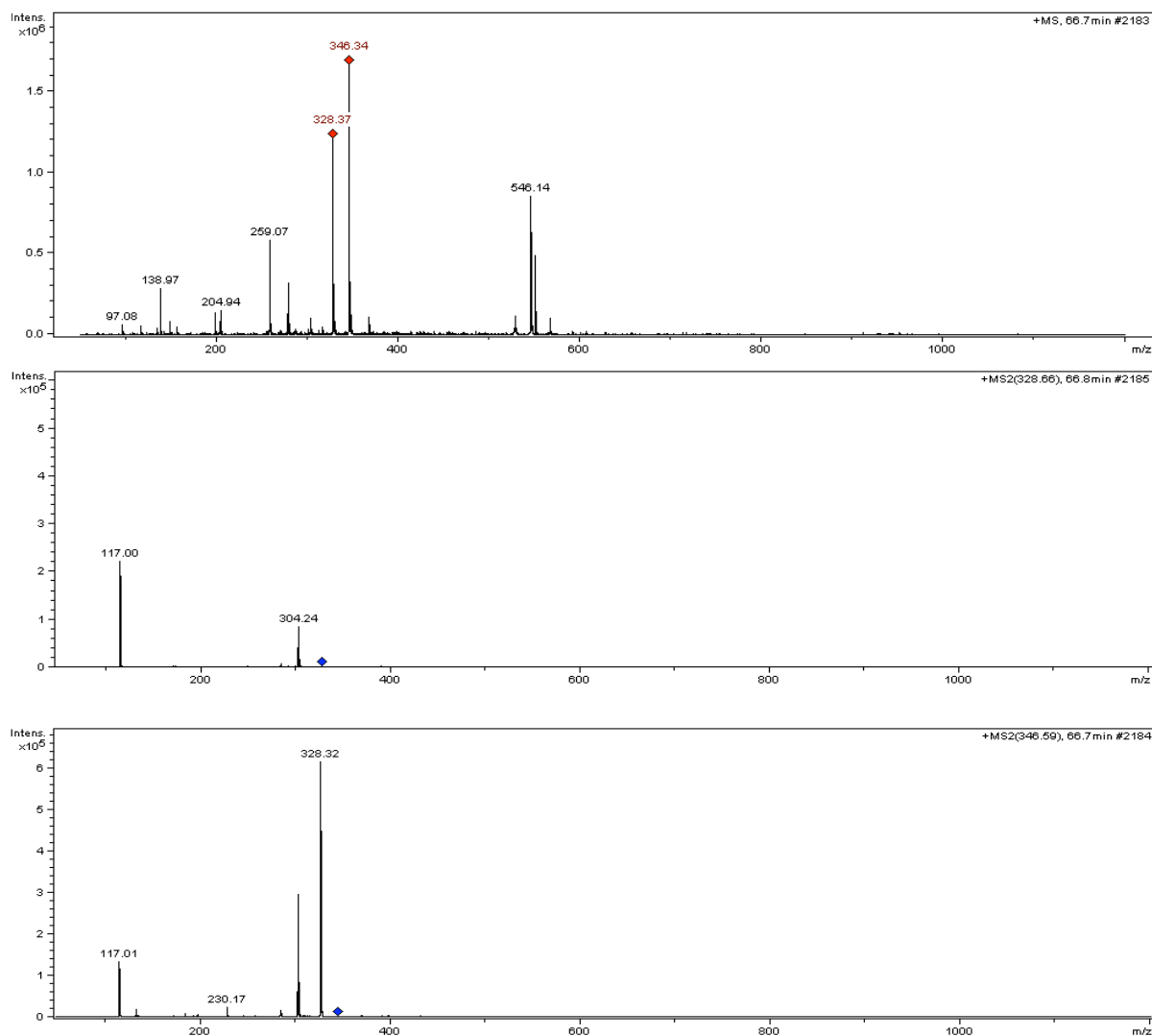
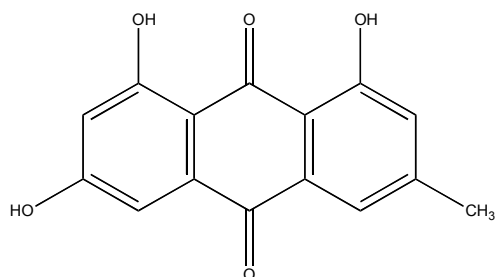


Figure A.26. Spectres de masse, en mode positif, du chrysophanol.

Émodine



Formule brute : $C_{15}H_{10}O_5$ - Masse molaire : $270 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

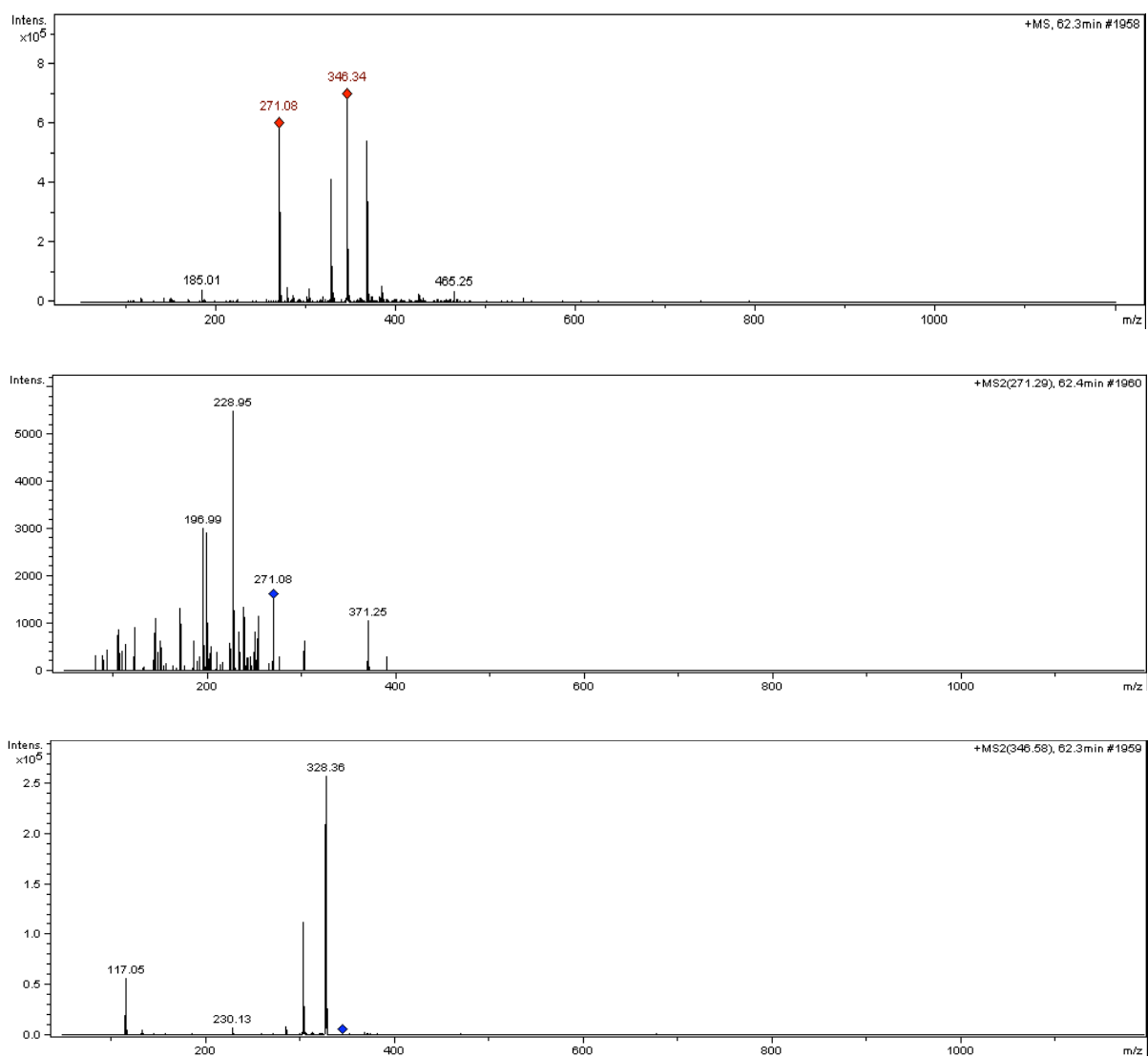
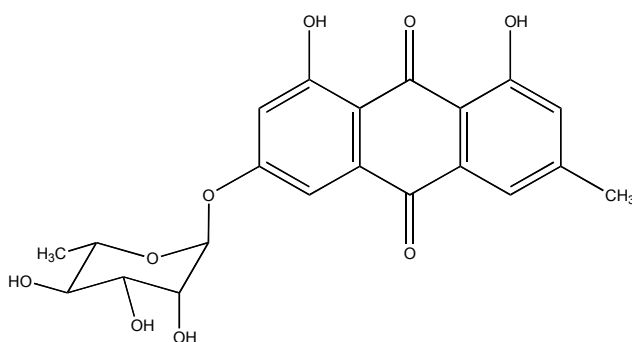


Figure A.27. Spectres de masse, en mode positif, de l'émodine.

Franguline A



Formule brute : $C_{21}H_{20}O_9$ - Masse molaire : $416 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

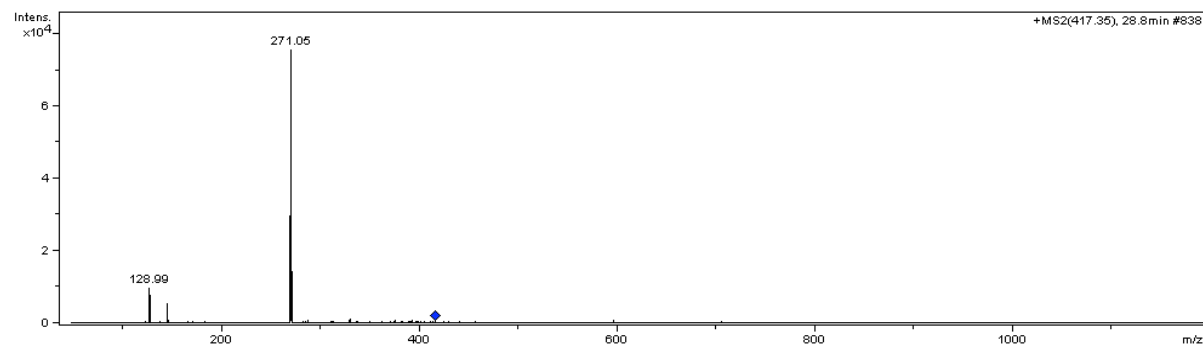
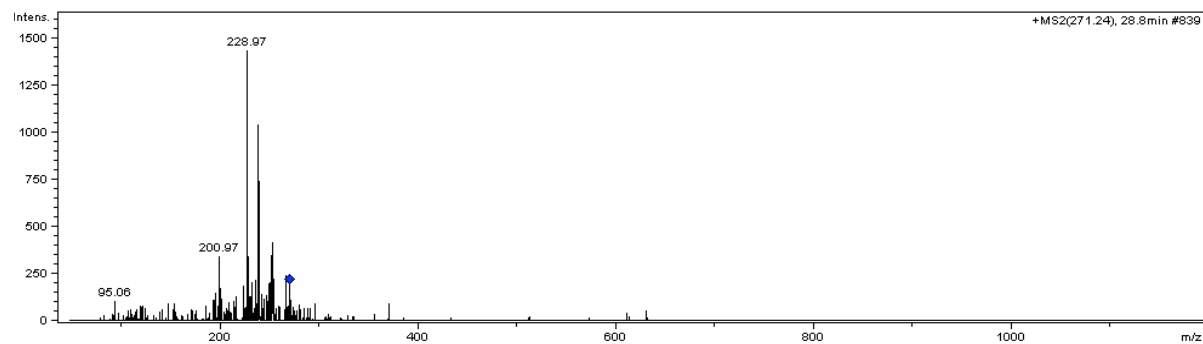
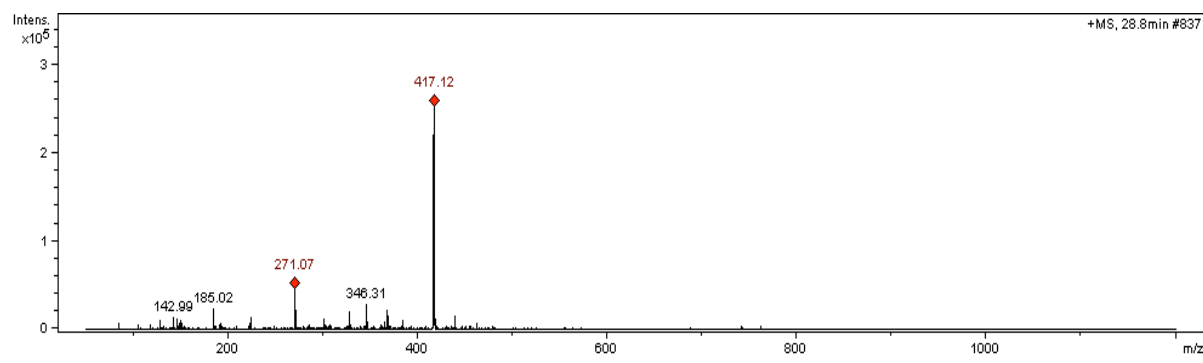
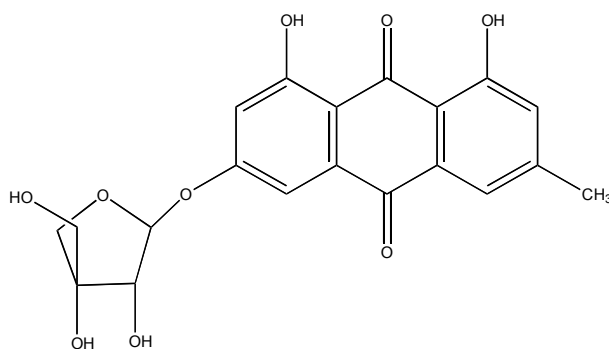


Figure A.28. Spectres de masse, en mode positif, de la franguline A.

Franguline B



Formule brute : C₂₀H₁₈O₉ - Masse molaire : 402 g.mol⁻¹

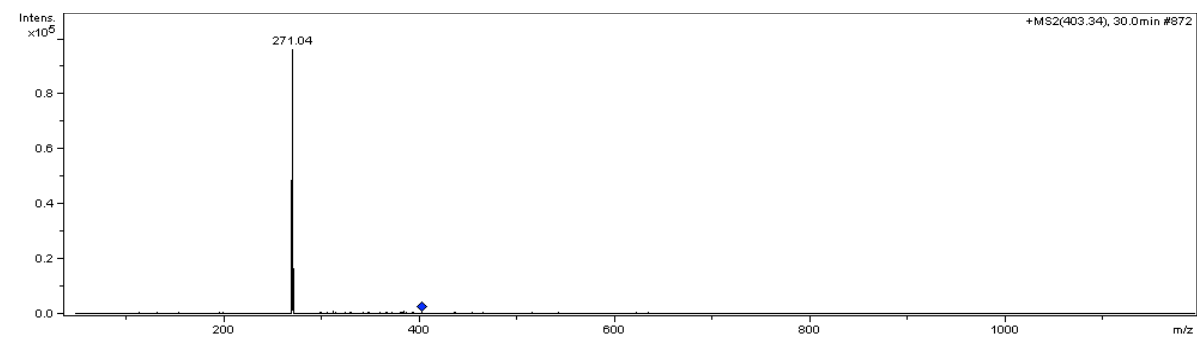
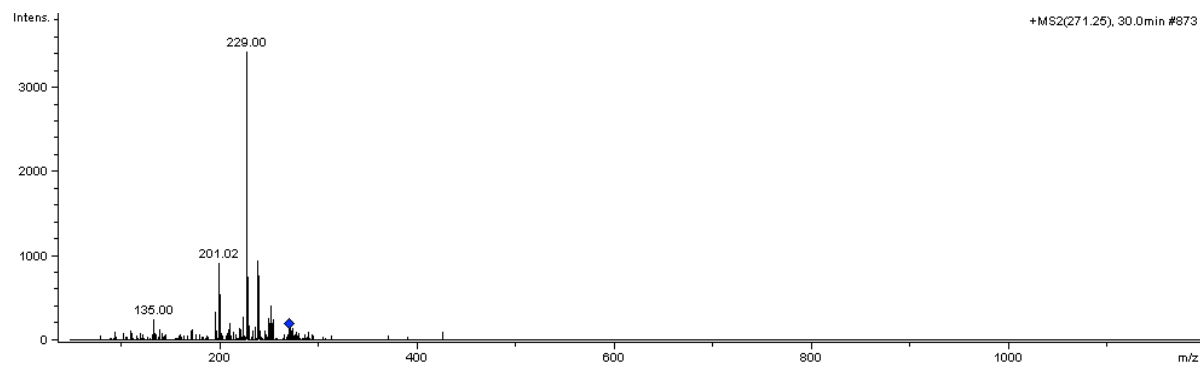
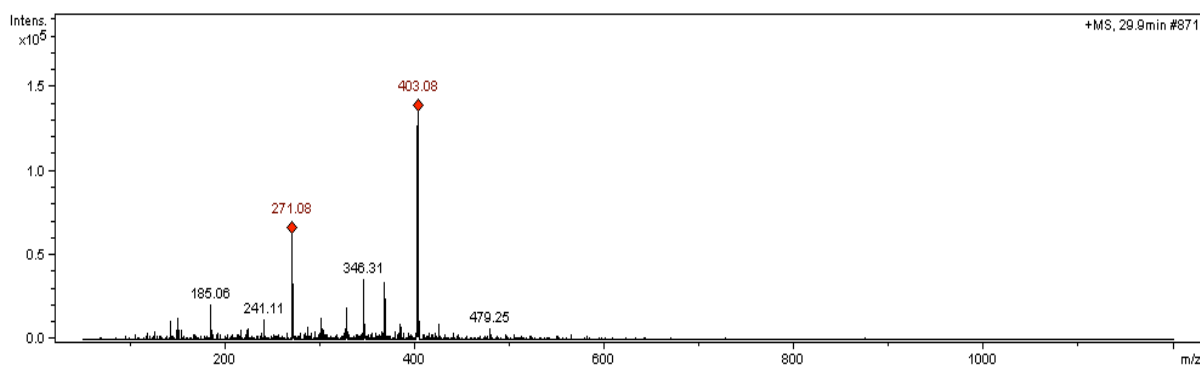


Figure A.29. Spectres de masse, en mode positif, de la franguline B.

ANNEXE IV
SPECTRES RMN
D'ANTHRAQUINONES PRÉSENTES
DANS LES NERPRUNS

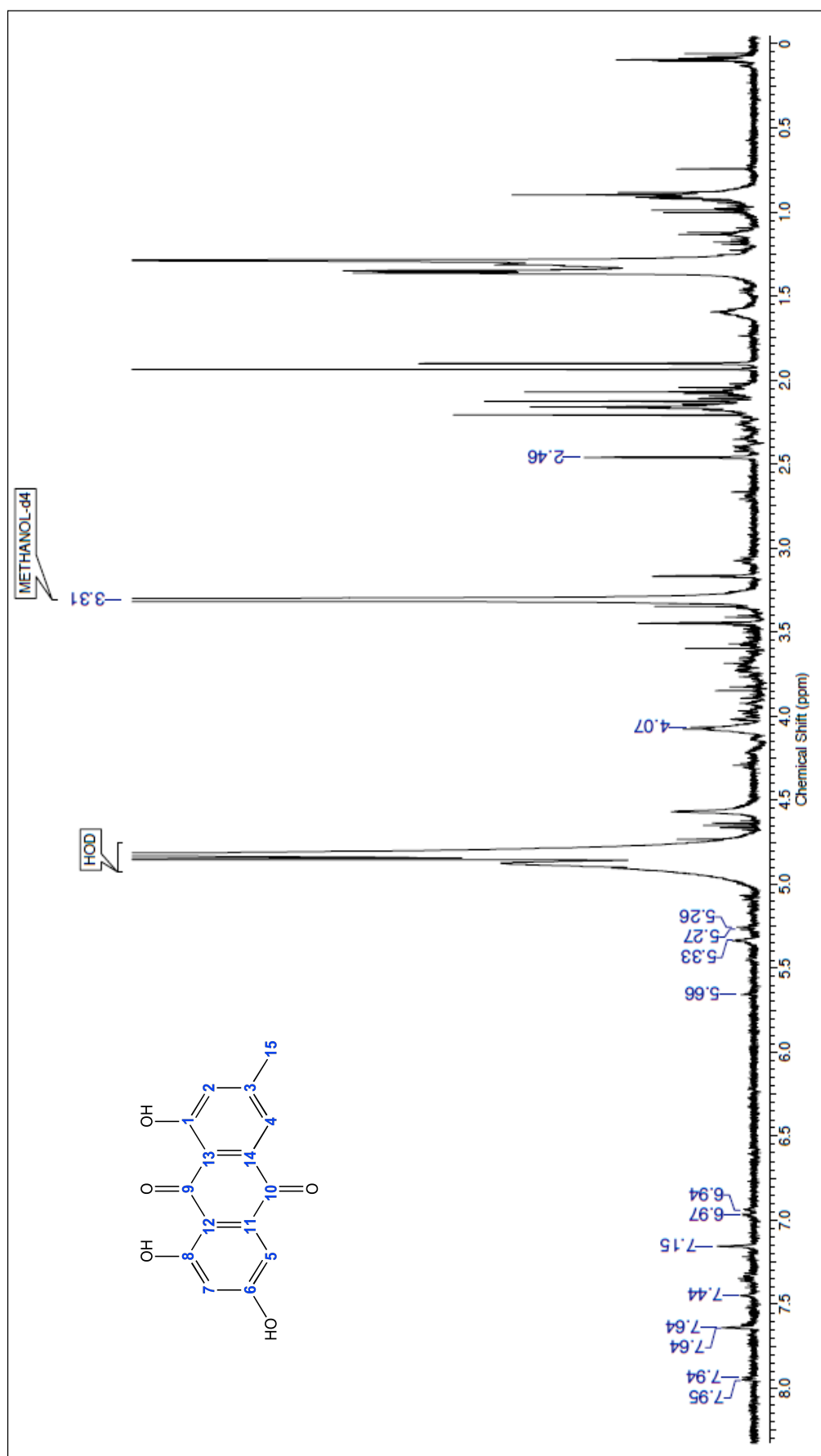


Figure A.30. Spectre RMN^1H de l'émodine.

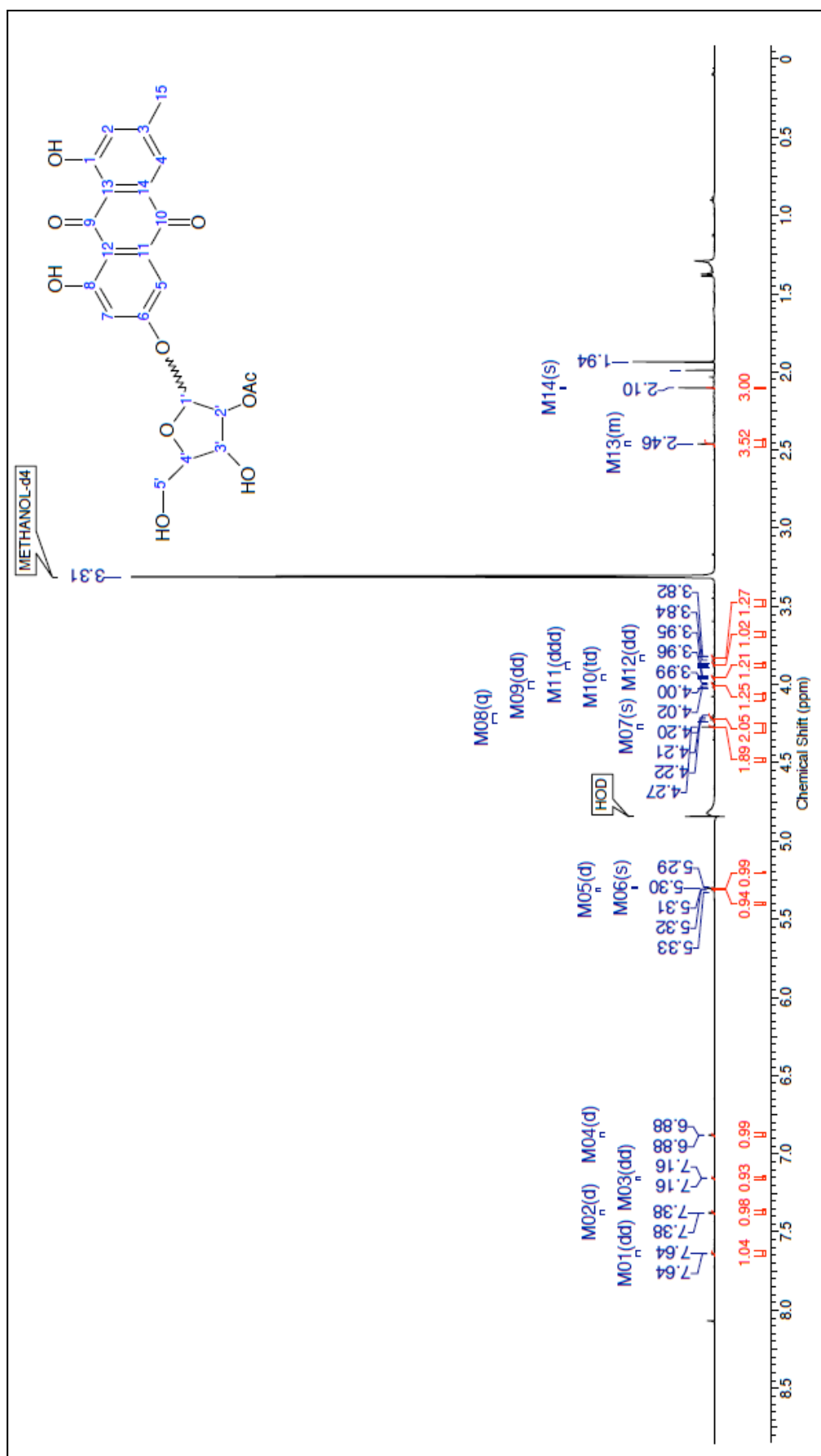


Figure A.31. Spectre RMN ^1H du 6-O-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émodyne.

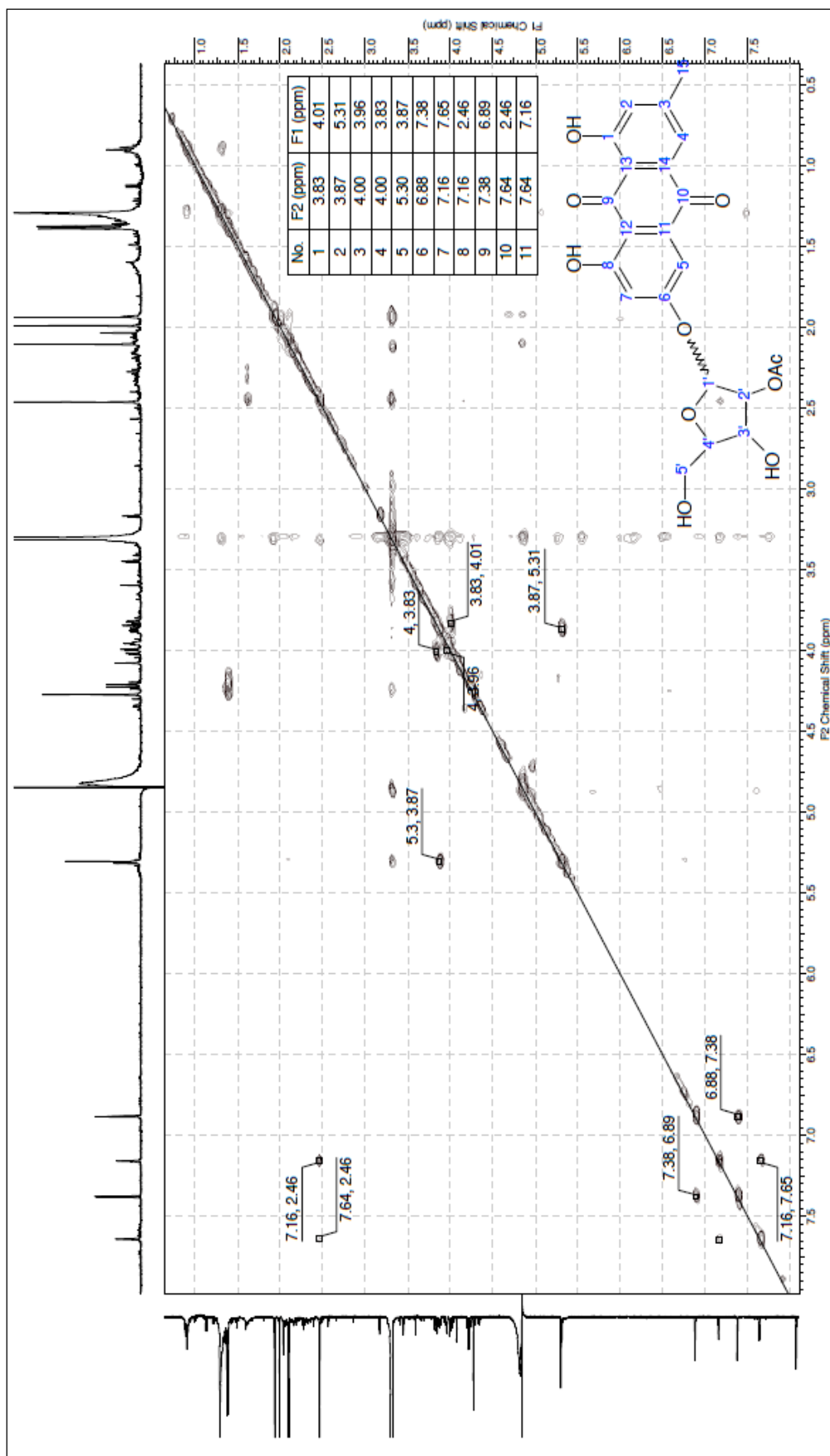


Figure A.32. Spectre RMN COSY du 6-O-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émodyne.

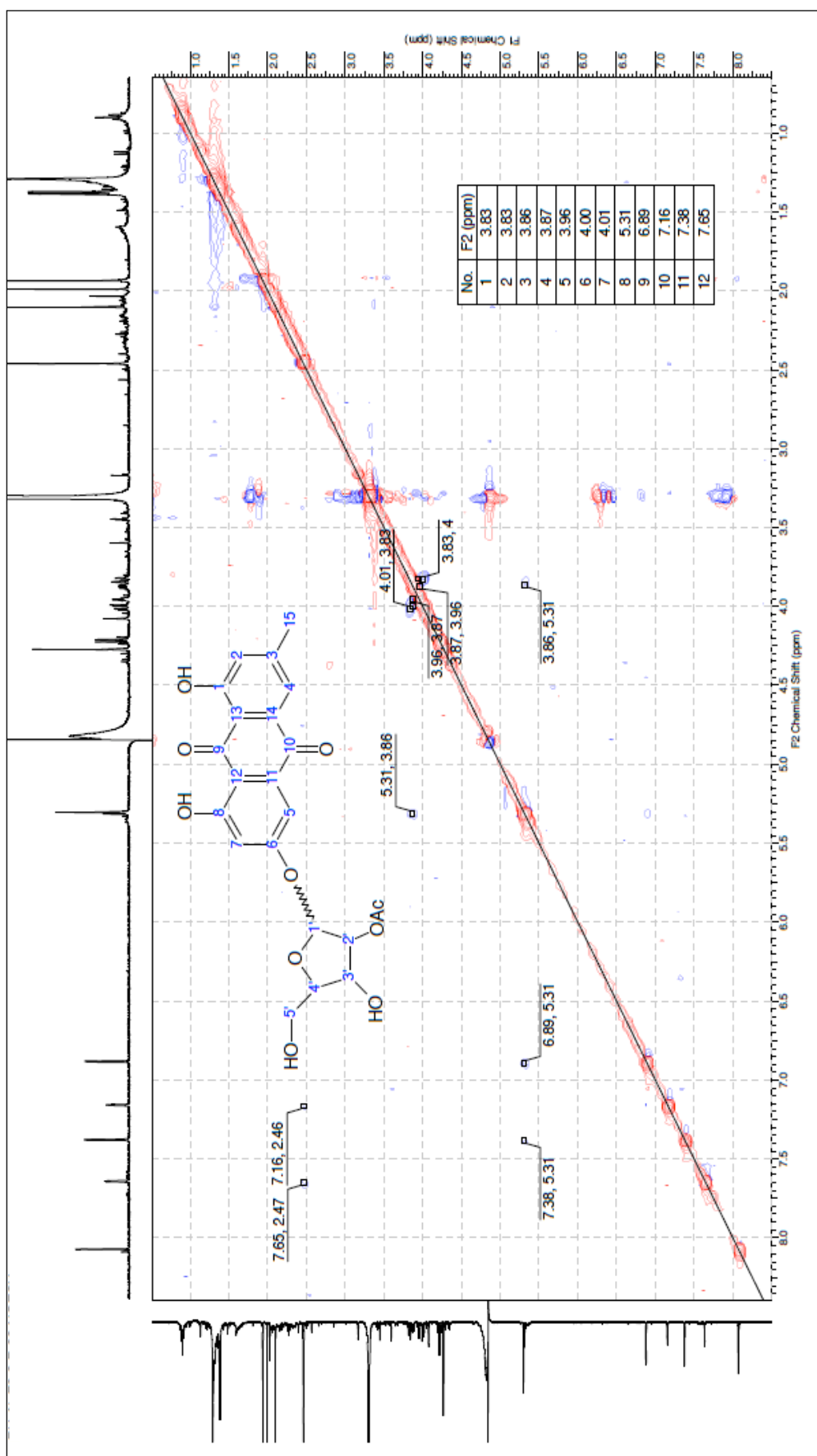


Figure A.33. Spectre RMN NOESY du 6-O-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émodyne.

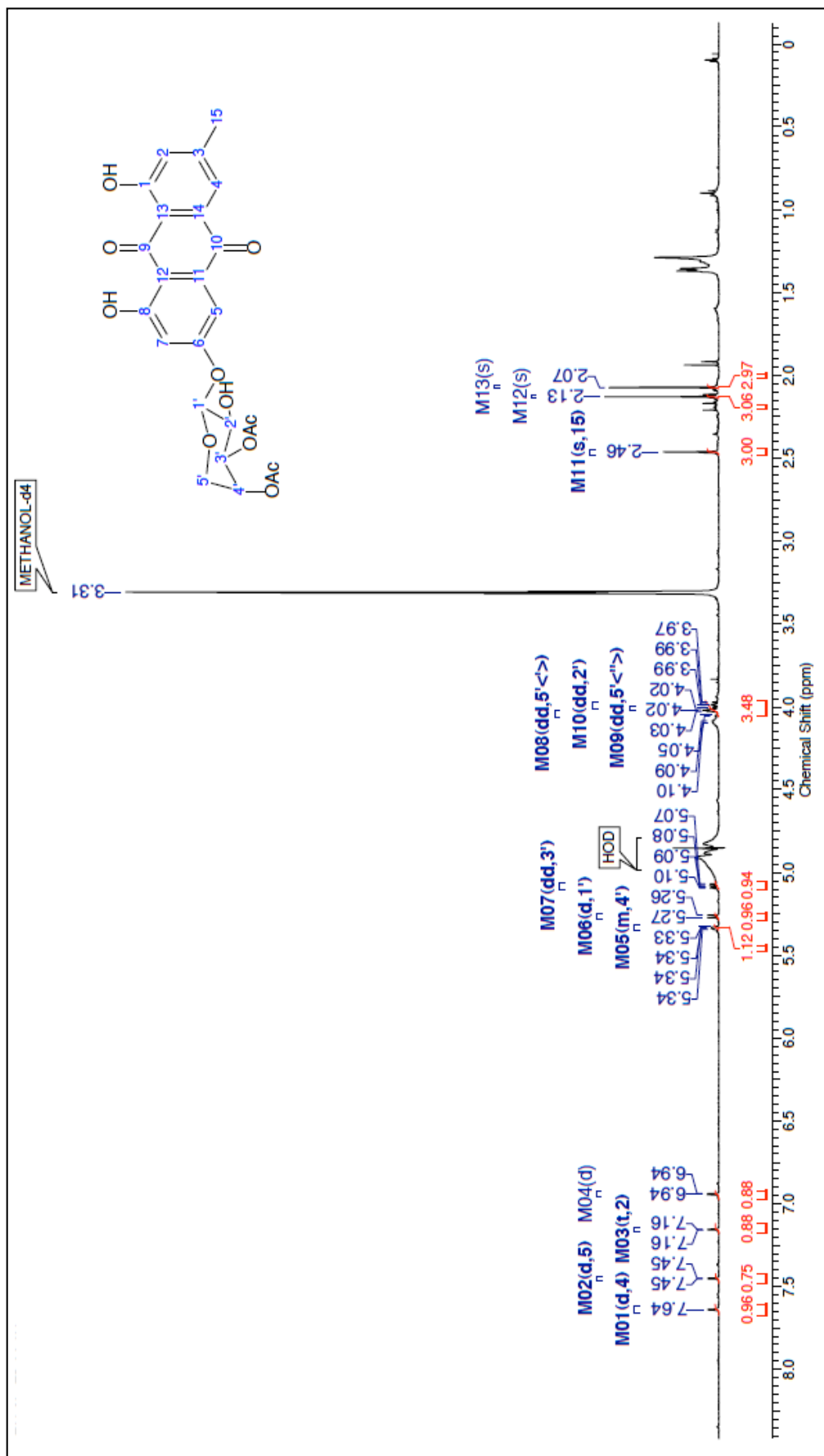


Figure A.34. Spectre RMN ^1H du 6-O-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne.

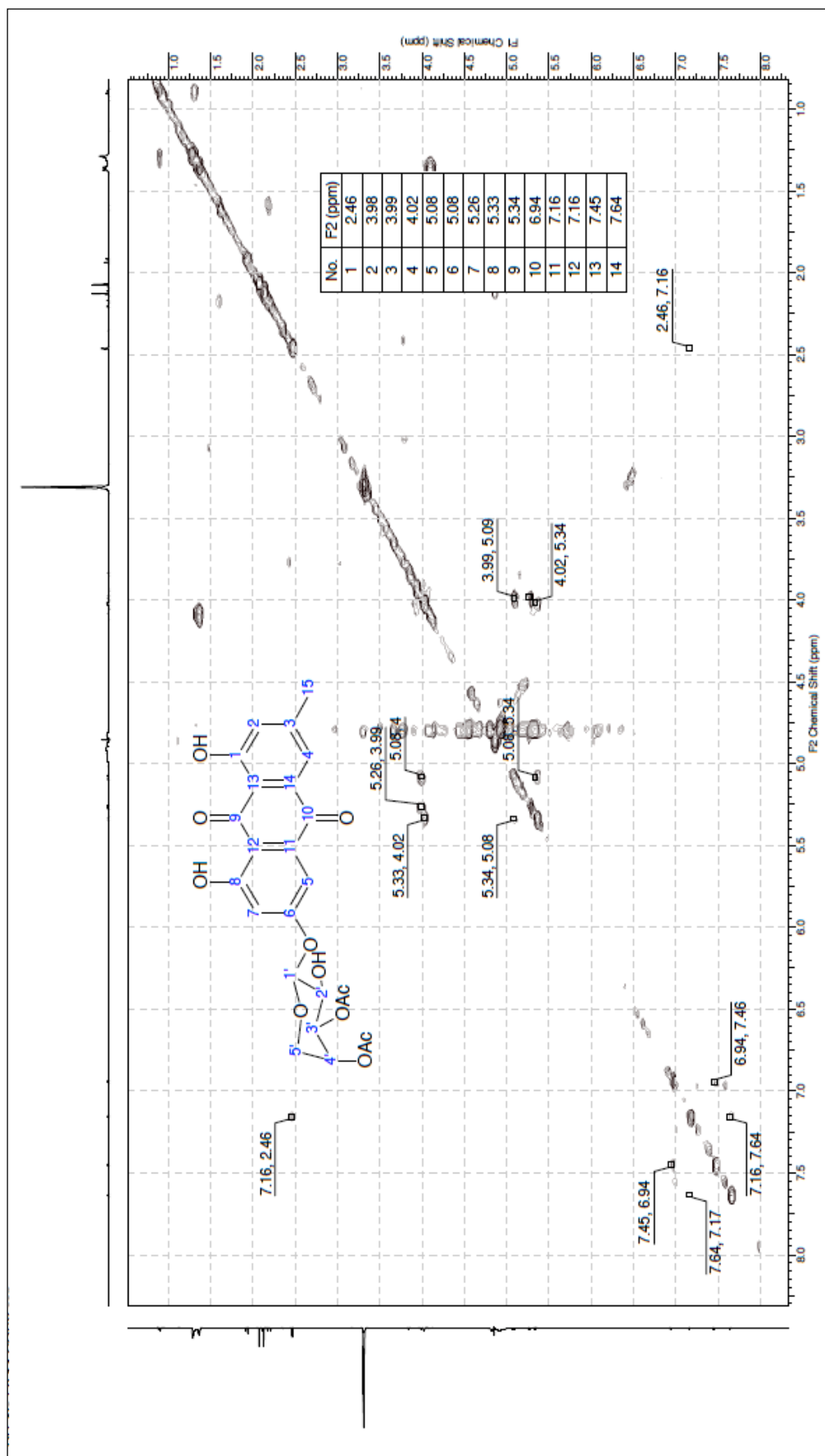


Figure A.35. Spectre COSY du 6-O-(3',4'-diacetyl)-arabinopyranoside d'émodyne.

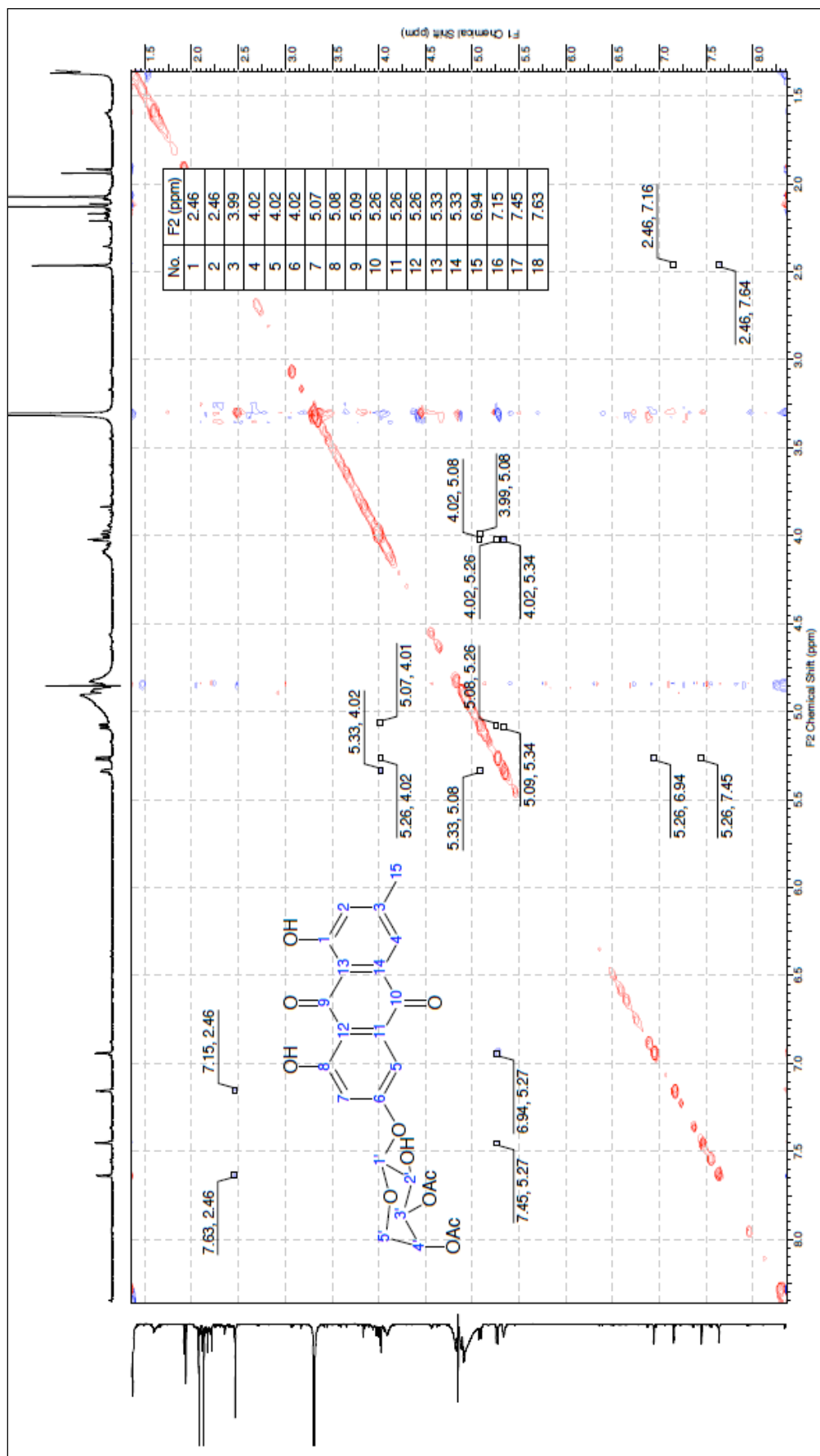


Figure A.36. Spectre NOESY du 6-O-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émidine.

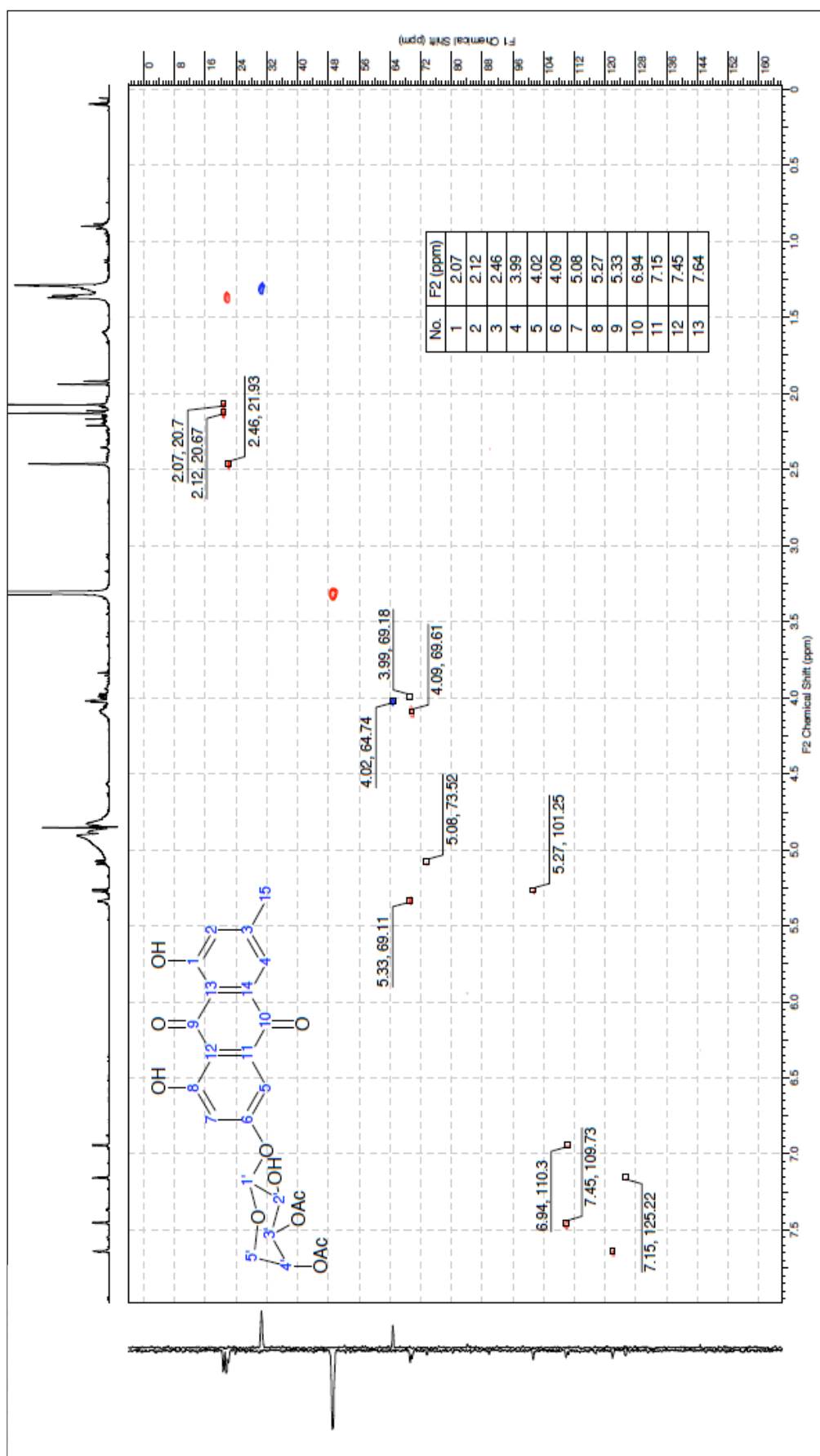


Figure A.37. Spectre RMN HSQC du 6-O-(3',4'-diacetyl)-arabinopyranoside d'émidine.

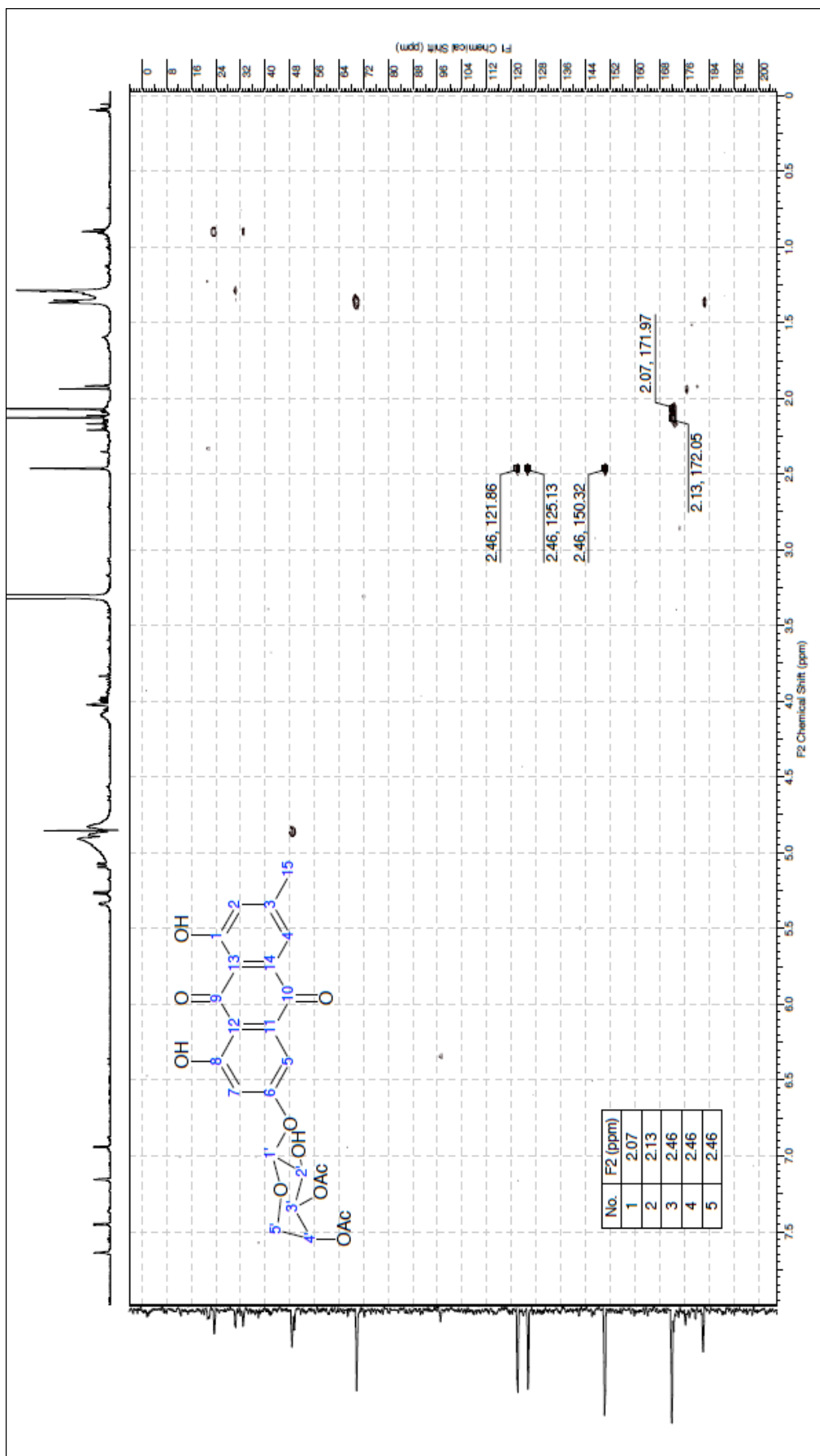


Figure A.38. Spectre RMN HMBC du 6-O-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émidine.

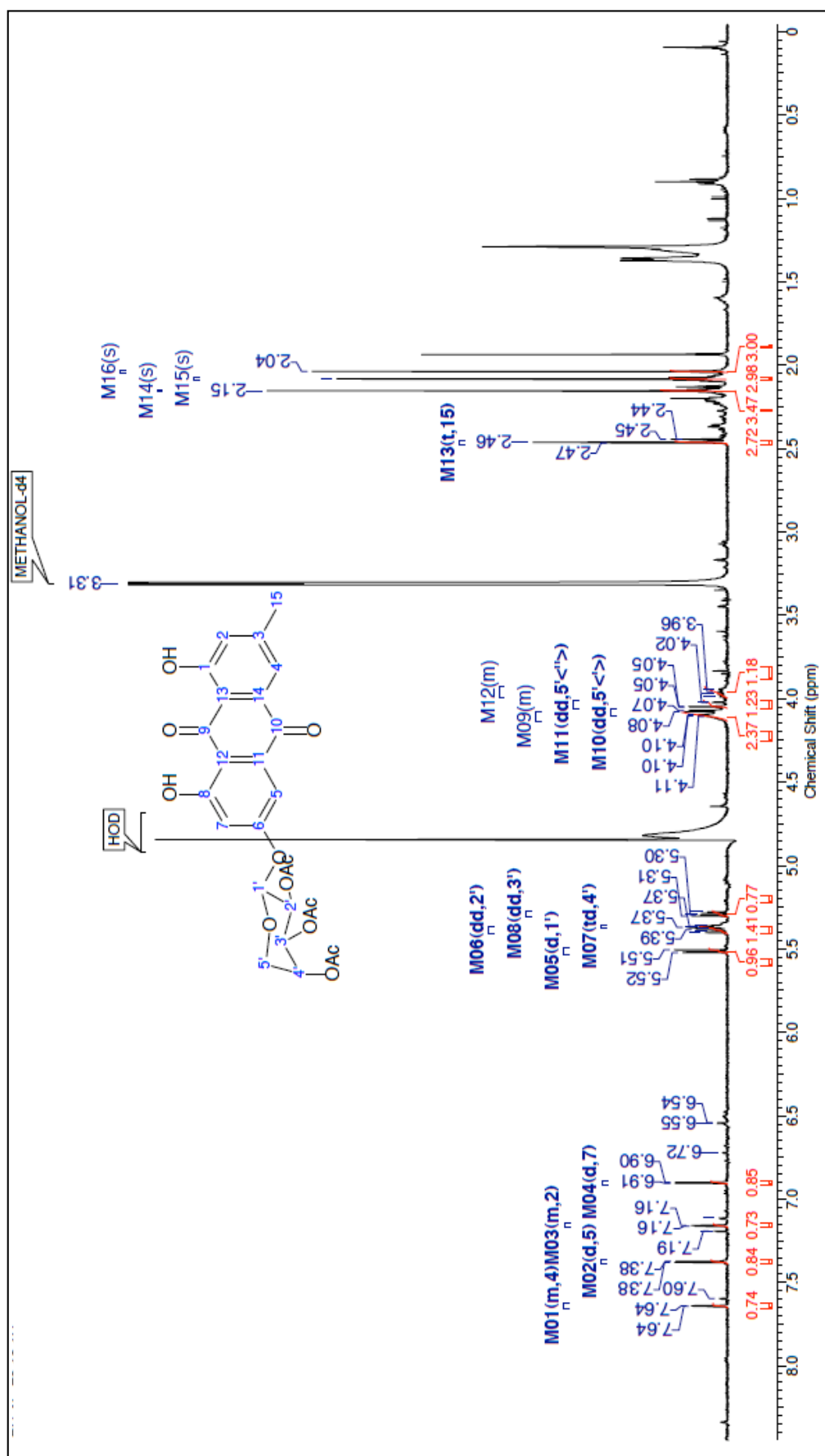


Figure A.39. Spectre RMN ^1H du 6-O-(2',3',4'-triacetyl)-arabinopyranoside d'émodyne.

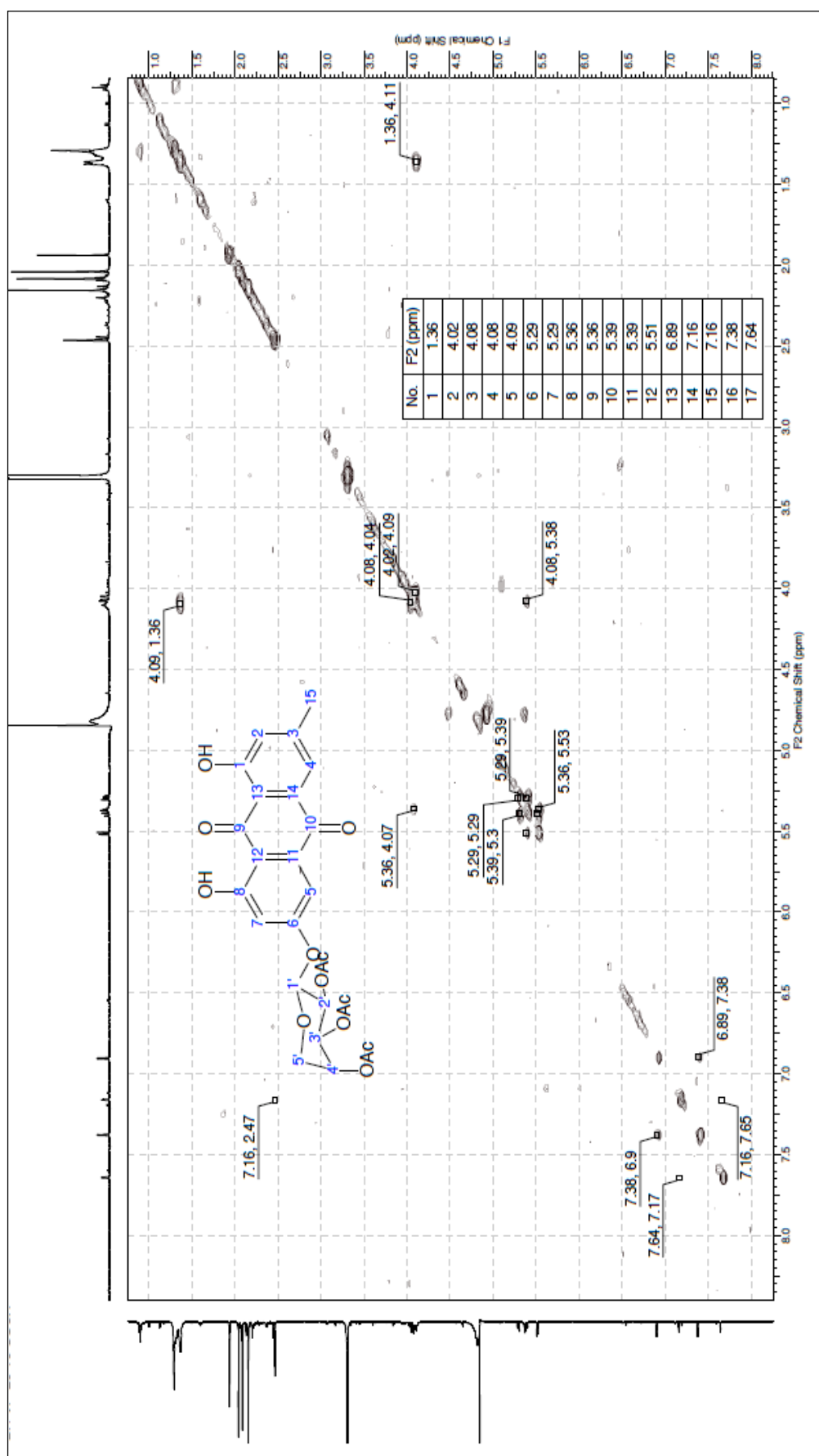


Figure A.40. Spectre RMN COSY du 6-O-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne.

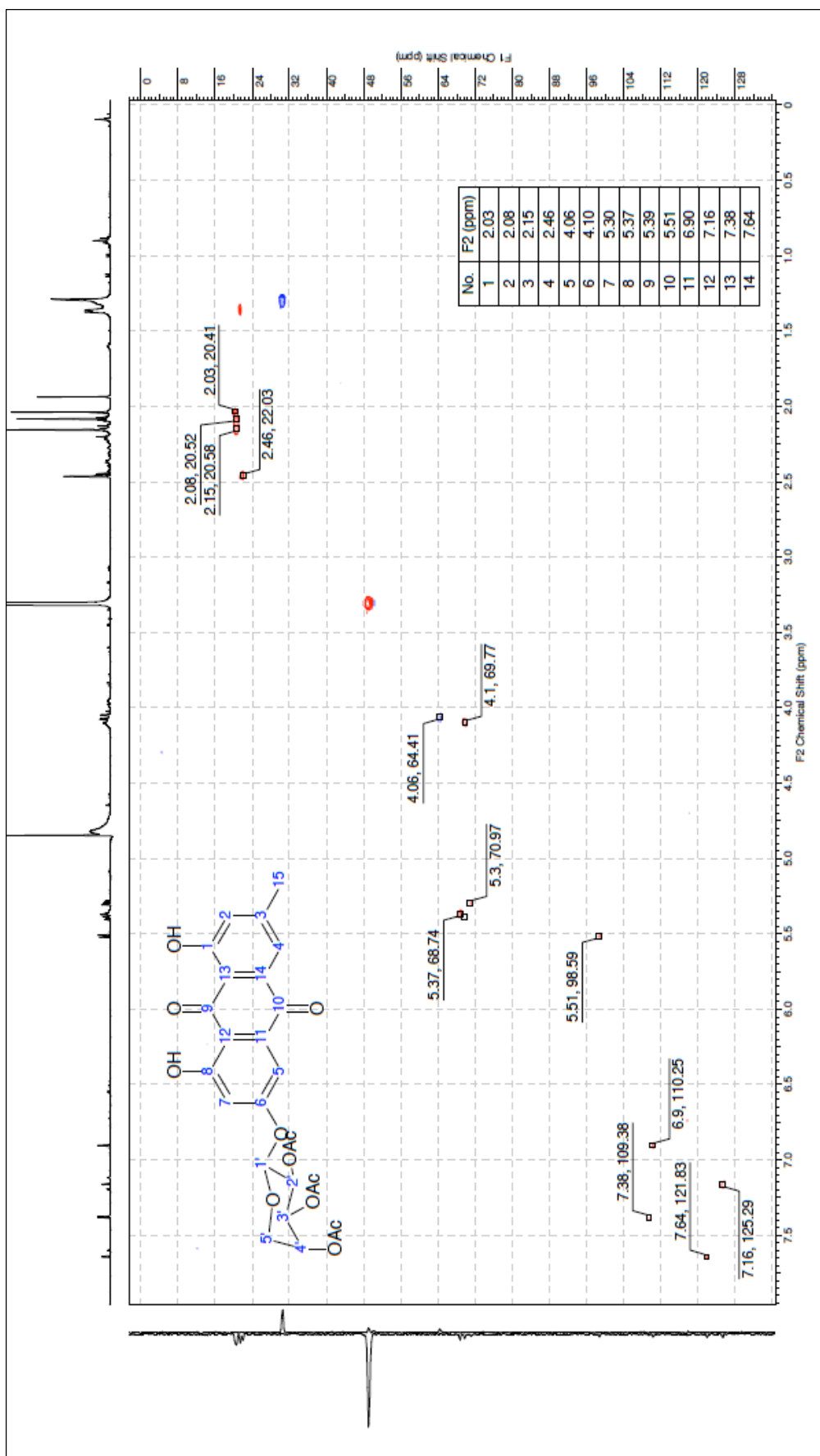


Figure A.41. Spectre RMN HSQC du 6-O-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne.

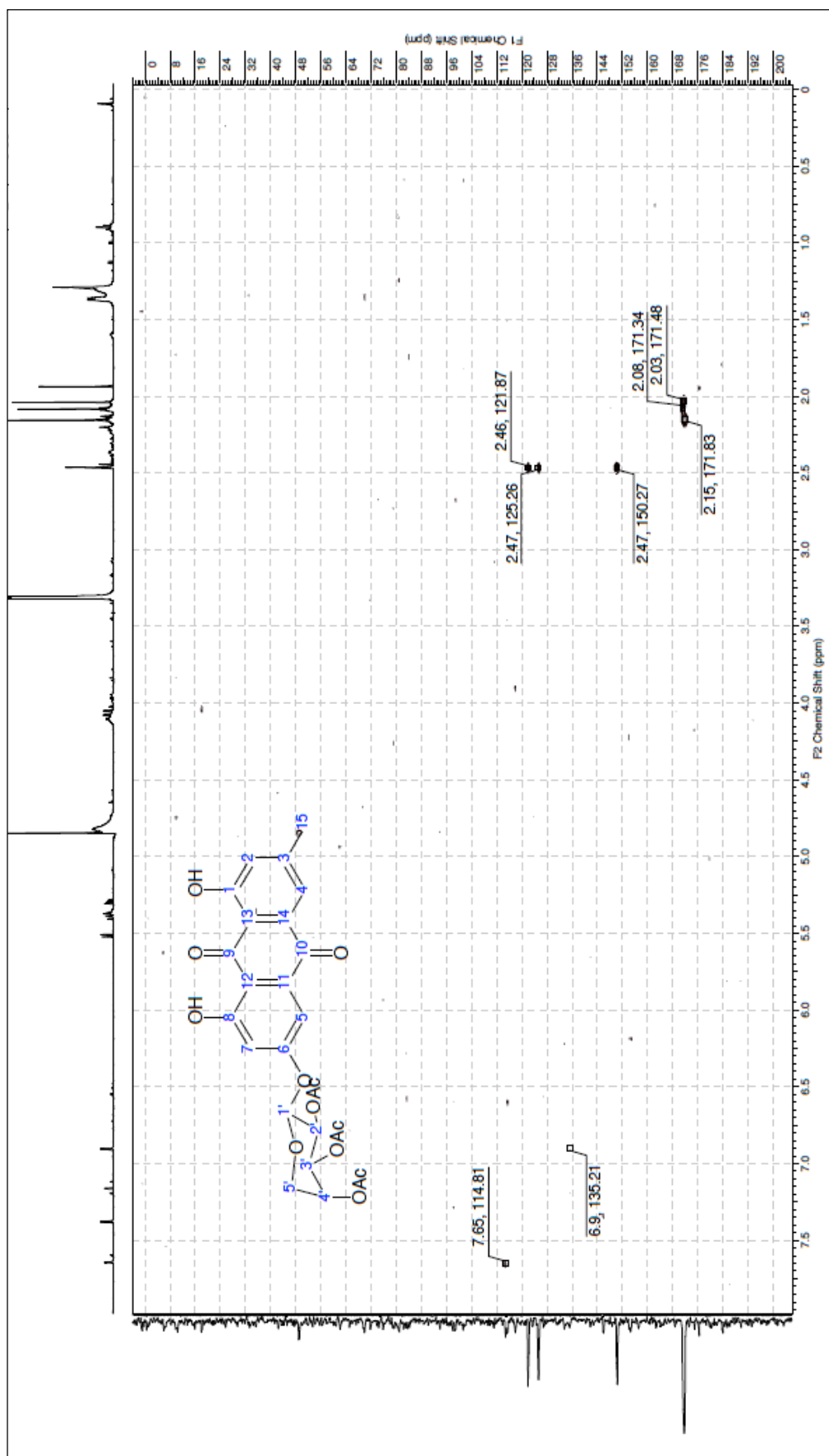


Figure A.42. Spectre RMN HMBC du 6-O-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne.

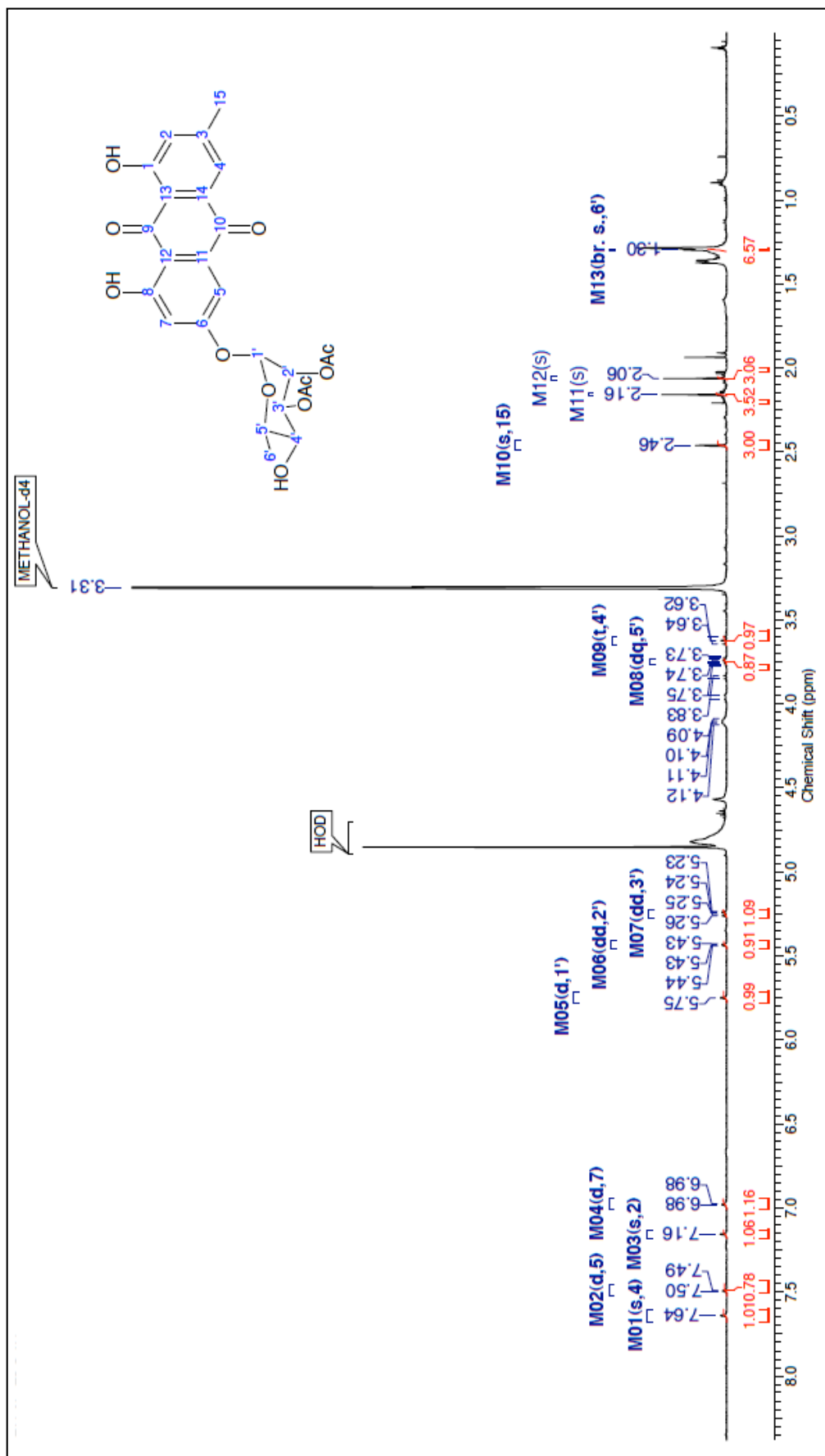


Figure A.43. Spectre RMN ^1H du 6-O-(2',3'-diacetyl)-rhamnopyranoside d'émidine.

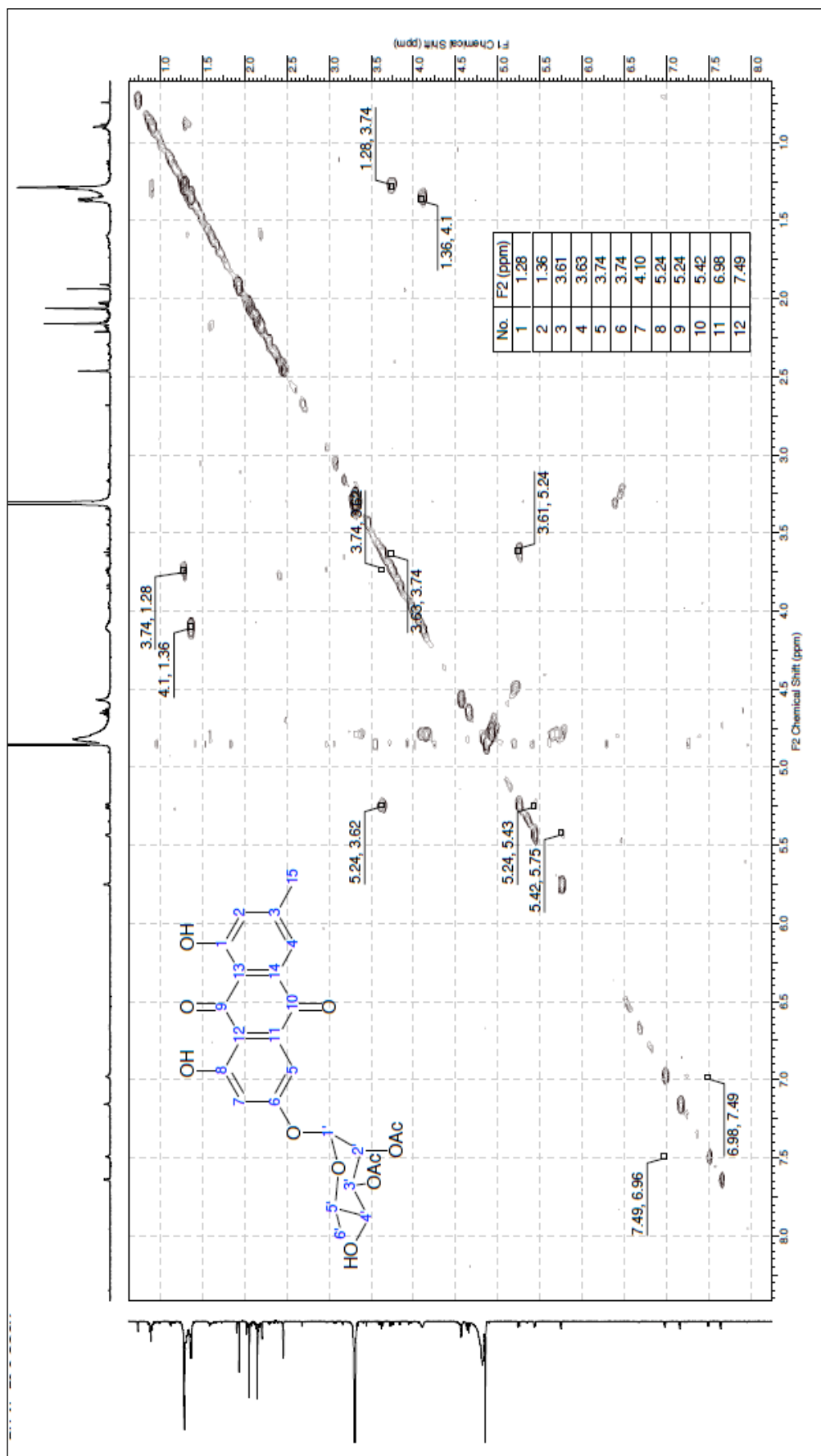


Figure A.44. Spectre RMN COSY du 6-O-(2',3'-diacetyl)-rhamnopyranoside d'émidine.

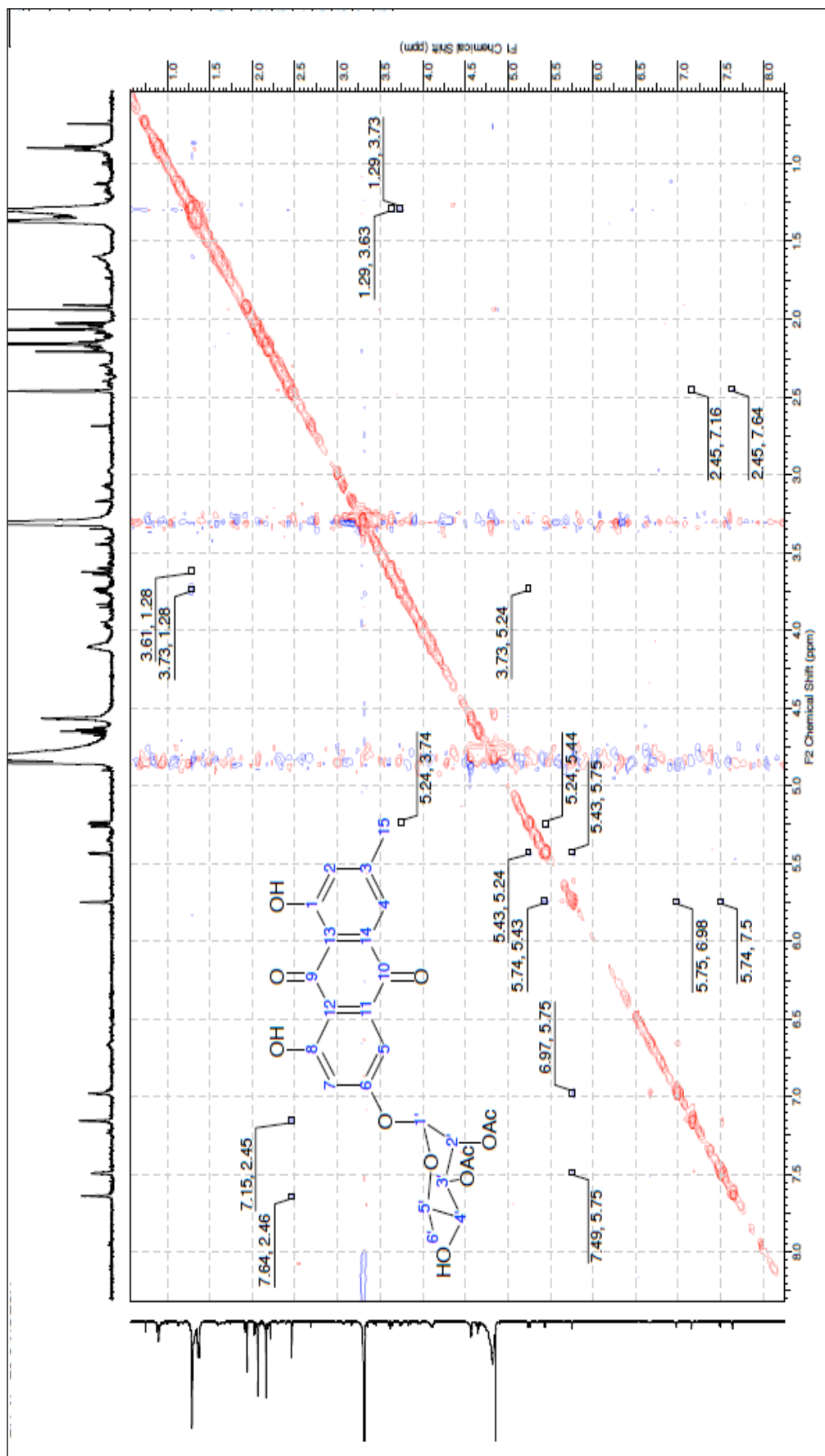


Figure A.45. Spectre RMN NOESY du 6-O-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émodyne.

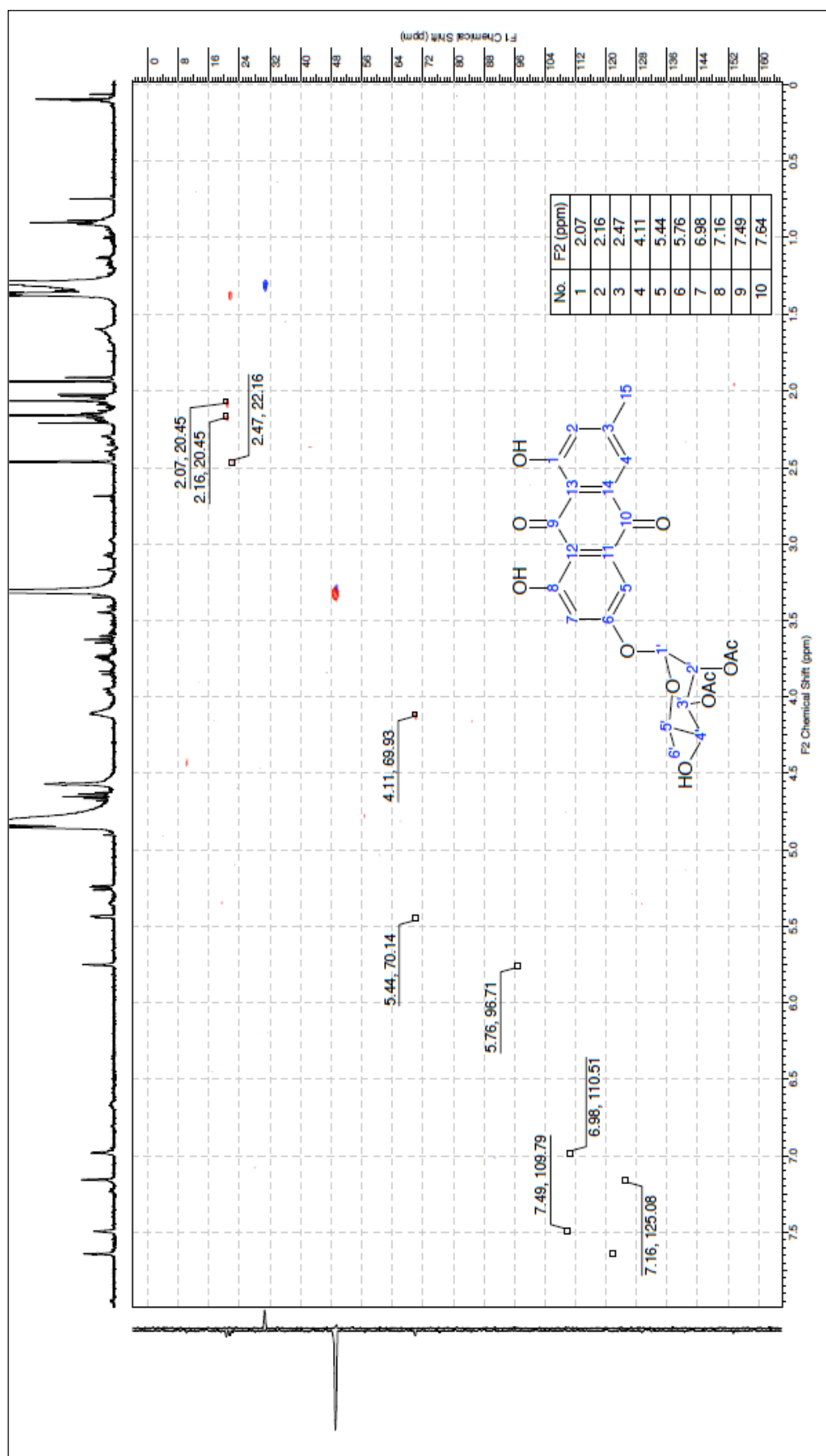


Figure A.46. Spectre RMN HSQC du 6-O-(2',3'-diacetyl)-rhamnopyranoside d'émidine.

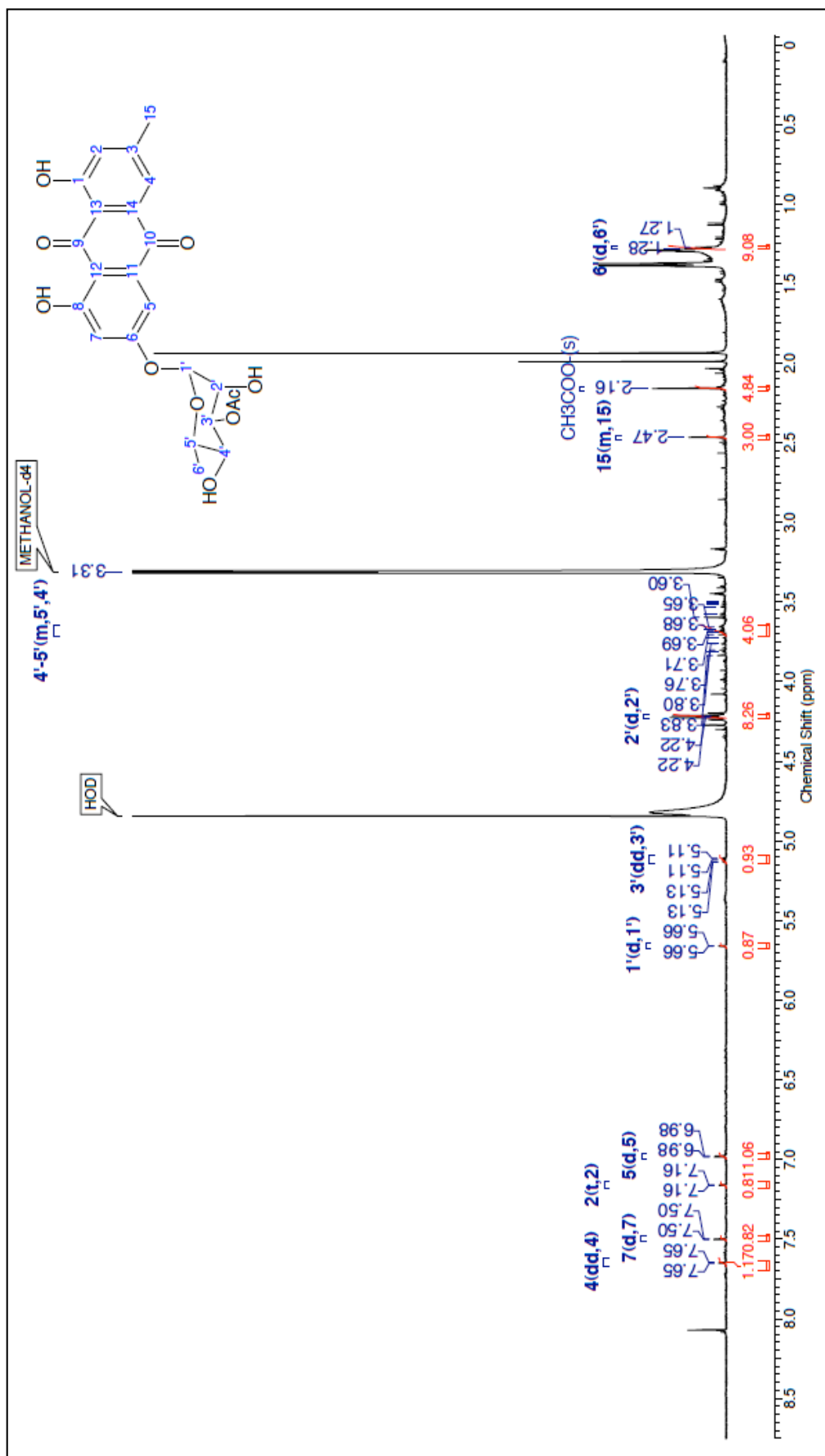


Figure A.47. Spectre RMN ^1H du 6-O-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émodyne.

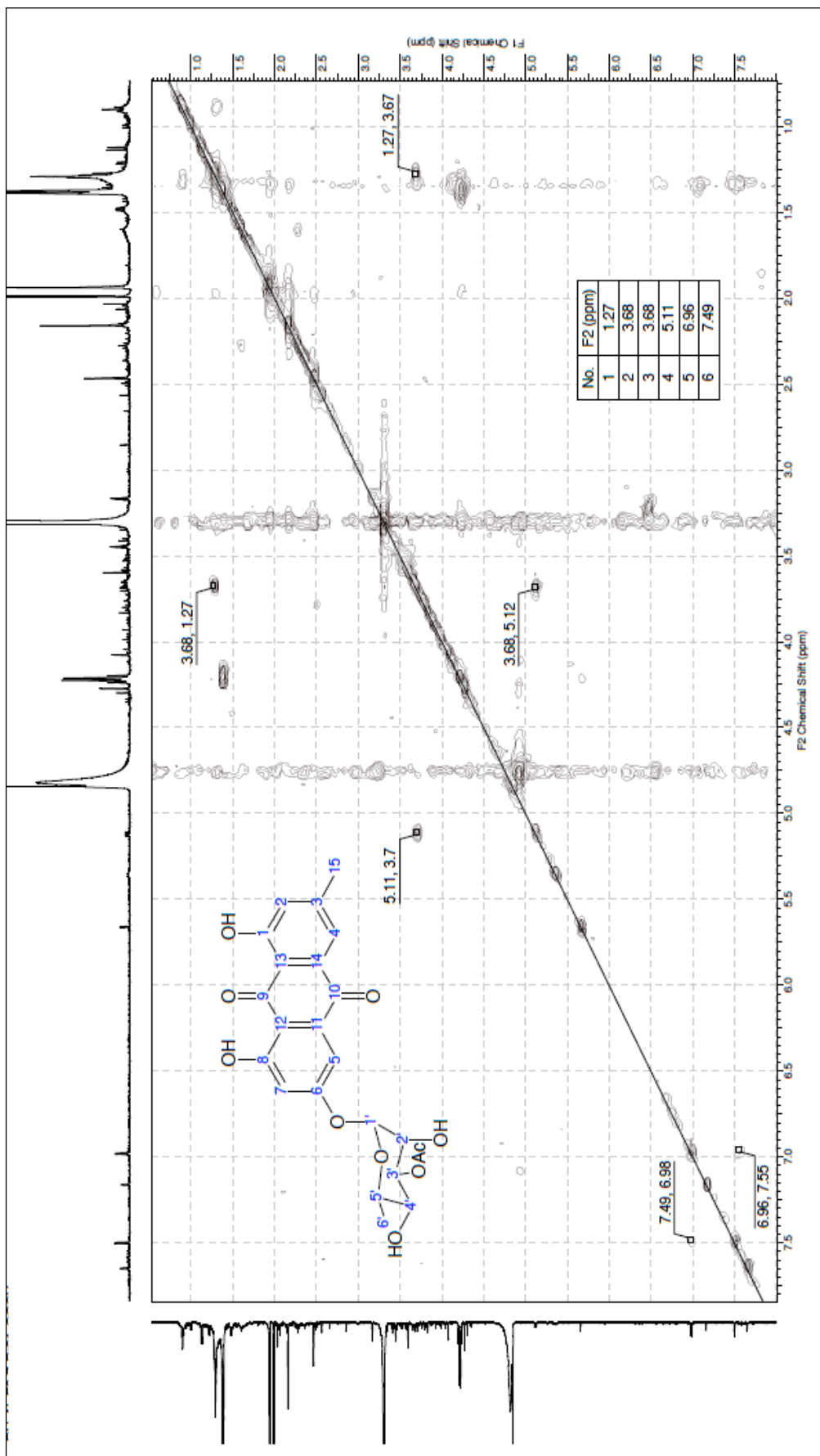


Figure A.48. Spectre RMN COSY du 6-O-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émodyne.

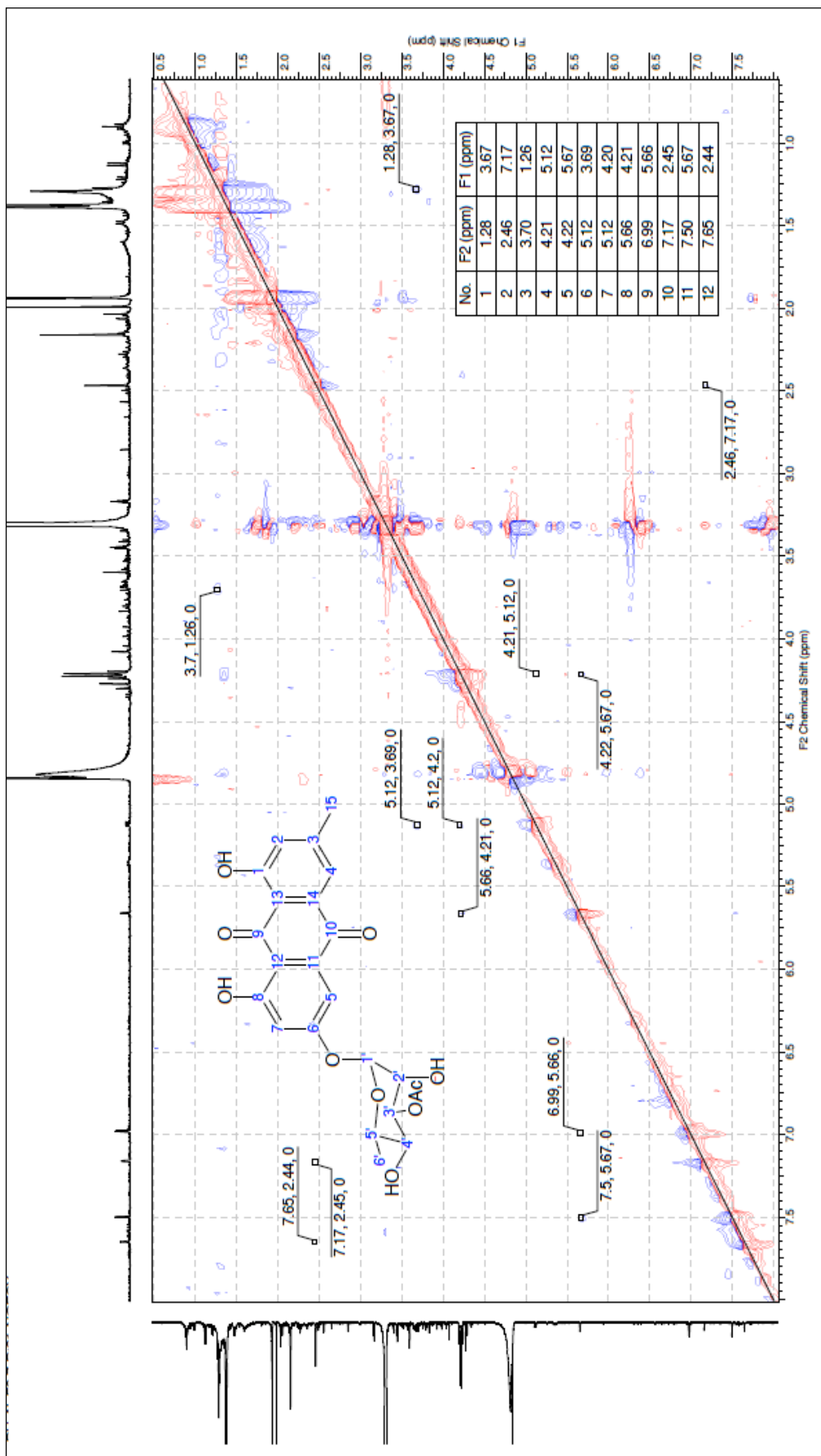


Figure A.49. Spectre RMN NOESY du 6-O-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émodyne.

ANNEXE V
POURCENTAGES RELATIFS
DES COMPOSÉS PRÉSENTS
DANS LES NERPRUNS

Tableau A.5. Pourcentages relatifs en flavonols.

Composés	SAX-1	ALA-1	ALA-2	CAT-1	CAT-2	CAT-3	ALP-1	LYC-1	LUD-1	FRA-1	FRA-2	FRA-3	FRA-4	PUM-1	PAL-1	PUR-1
3- <i>O</i> -rhamninoside de quercétine (1)	9,42	1,03	-	12,76	1,01	1,40	0,63	0,21	-	-	0,17	4,41	0,37	3,15	1,09	5,32
3- <i>O</i> -rhamninoside de kaempférol (2)	5,56	52,32	25,37	1,84	8,95	22,43	45,57	3,68	16,35	2,13	6,44	3,99	9,32	67,97	36,31	10,97
3- <i>O</i> -rhamninoside de isorhamnétine (3)	0,76	0,43	0,15	1,32	0,47	1,54	6,55	-	-	-	1,75	-	2,67	8,89	6,47	0,33
4'- <i>O</i> -rhamninoside de quercétine (4)	-	-	-	-	1,01	-	-	2,59	-	-	-	-	-	-	3,05	-
3- <i>O</i> -acétyl-rhamninoside de kaempférol (5)	4,87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,08	8,30	-	2,23	-	-
4'- <i>O</i> -rhamninoside de kaempférol (6)	-	11,32	7,27	-	21,86	1,77	-	49,34	41,19	-	-	-	-	-	10,97	0,66
3- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnétine (7)	60,51	0,93	-	59,59	7,36	3,91	-	-	-	-	-	3,04	0,70	3,03	1,74	43,74
3- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnocitrine (8)	1,99	12,37	3,02	0,71	5,06	22,92	5,83	-	2,14	-	0,58	1,55	4,65	6,25	-	6,68
3- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnazine (9)	11,19	1,74	-	19,66	1,10	0,61	2,29	-	-	-	3,28	0,55	2,53	4,88	-	1,64
4'- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnétine (10)	-	-	-	-	6,18	-	-	3,09	-	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -acétyl-rhamninoside de rhamnocitrine (11)	1,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,46	-	-	-	-
4'- <i>O</i> -rhamninoside de rhamnocitrine (12)	-	1,54	5,35	-	13,81	-	-	11,95	23,69	-	-	-	-	-	-	-
3- <i>O</i> -acétyl-rhamninoside de rhamnazine (13)	4,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,26	-	1,19	-	-
quercétine (14)	0,09	-	1,97	0,63	2,51	1,85	-	0,90	-	7,12	10,65	0,97	11,11	-	-	4,85
isorhamnétine (15)	-	-	0,13	0,14	0,10	0,39	3,19	0,73	-	7,91	8,82	2,28	7,07	0,75	9,83	0,12
kaempférol (16)	0,12	16,26	38,59	0,24	20,25	24,46	24,48	13,23	7,73	79,94	59,45	6,74	56,18	0,98	28,34	15,52
rhamnétine (17)	0,17	-	0,38	1,50	3,70	0,56	-	0,23	-	-	-	-	-	-	-	5,90
rhamnazine (18)	0,07	0,15	1,59	1,43	-	-	3,19	1,47	0,29	0,63	1,55	1,94	1,36	0,68	0,53	0,27
rhamnocitrine (19)	-	1,88	16,15	0,07	6,62	12,71	8,26	2,14	1,26	2,27	4,21	3,41	4,03	-	1,67	3,99

Tableau A.6. Pourcentages relatifs en anthraquinones.

Composés	SAX-1	ALA-1	ALA-2	CAT-1	CAT-2	CAT-3	ALP-1	LYC-1	LUD-1	FRA-1	FRA-2	FRA-3	FRA-4	PUM-1	PAL-1	PUR-1
franguline A (1)	3,25	0,65	2,14	7,70	1,59	1,84	1,92	2,07	0,09	0,83	1,39	2,27	7,08	0,41	18,19	0,79
franguline B (2)	1,84	0,26	0,56	1,12	0,26	0,35	-	1,19	3,18	1,23	-	-	-	-	1,29	-
aloe-émodyne (3)	3,90	3,66	2,25	7,62	2,04	3,67	62,81	2,12	6,59	90,77	84,20	45,97	56,30	27,16	-	0,32
6-O-(2'-acétyl)-arabinofuranoside d'émodyne (4)	13,09	3,26	1,19	13,65	10,11	10,24	-	1,58	20,75	-	-	-	-	-	-	8,40
6-O-(3'-acétyl)-rhamnopyranoside d'émodyne (5)	5,05	2,18	4,02	1,86	5,14	4,79	-	6,88	-	-	-	-	-	2,82	11,66	1,71
6-O-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne (6)	-	29,13	23,94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-O-(2',3'-diacétyl)-rhamnopyranoside d'émodyne (7)	48,68	17,22	17,35	6,72	28,70	28,85	26,69	43,77	0,36	-	-	33,71	-	22,66	7,15	12,99
émodyne (8)	39,41	13,58	9,41	52,98	48,84	47,04	8,57	19,75	68,01	3,81	7,15	5,13	18,54	29,72	57,92	63,10
chrysophanol (9)	-	-	-	-	-	-	-	19,55	0,75	3,35	5,14	9,71	15,36	17,22	-	-
6-O-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne (10)	-	23,46	37,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pariétine (11)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,27	-	-	3,19	-	-	-	-

ANNEXE VI
HISTOIRE DES INDIENNES ET DESCRIPTIF
DES ÉCHANTILLONS ANCIENS

Les Indiennes

Historique des Indiennes

C'est aux indes que naquit le tissu imprimé. La technique était rudimentaire et artisanale. En effet, pour réaliser un motif, on déposait au pinceau les mordants utilisés pour fixer la couleur lors des bains de teinture.

Dès la fin du XVIème siècle, les toiles de coton peintes aux Indes (*les indiennes*) connaissent un vif succès. Celles-ci sont importées par les Portugais et par la Compagnie Française des Indes Orientales, à partir de sa création en 1664 par Colbert. Ces étoffes plus légères et plus chatoyantes, leurs origines ainsi que leur exotisme donnèrent naissance à une mode. Leur succès faisait concurrence aux manufactures traditionnelles de drap et de soie. En 1686, sous la pression des drapiers normands et des soyeux lyonnais, Louvois interdit l'importation des toiles des Indes et l'impression sur toiles de coton blanc dans le royaume.

Des arrêtés ordonnèrent la destruction des bois gravés nécessaires à l'impression sur tissus. Cette prohibition survenant très peu de temps après la Révocation de l'Edit de Nantes, a contraint à l'exil ou à la clandestinité de nombreux artisans protestants. De ce fait, elle favorisa la création en Suisse dans le canton de Neuchâtel, des fabriques d'indiennes, dont la plus célèbre est celle de *Bied*.

Cette prohibition eut pour effet immédiat de redoubler le succès des toiles peintes et la fabrication clandestine continua, particulièrement autour de Paris où la mode des indiennes fait fureur. Par ailleurs, la Compagnie des Indes obtint des dérogations pour s'assurer le transport des toiles sur ses bateaux. Lorsque la fin de la prohibition fût décidée en 1759, cette industrie dont les débouchés étaient prometteurs, se trouva confrontée à une pénurie de main d'œuvre et à un manque de connaissances de techniques d'impression (Chassagne, 1991). Les fabricants et les commerçants font alors appel à des ouvriers suisses ou allemands. C'est à partir de cette période que les grandes manufactures vont se créer en France, comme celle de Jouy-en-Josas ou celle de Mulhouse. Ces dernières fourniront au XVIII^{ème} et au XIX^{ème} siècles l'essentiel du marché du textile provençal. Les manufactures provençales se spécialiseront dans l'impression de châles et de mouchoirs afin de répondre à une demande locale et spécifique au costume régional (Gril-Mariotte, 2007).

Historique des indiennes d'Avignon

Les toiles peintes françaises connurent un franc succès dans les milieux populaires en raison de leur prix plus bas que celles importées. Cela créa une forte demande en colorants et notamment en garance importée des Flandres et d'Orient. C'est dans ce contexte favorable que se situent les essais de culture de la garance dans le Comtat par Jean Althens.

La fabrication des toiles imprimées ou "indiennes", héritières des motifs des toiles peintes, a été introduite en 1677 à Avignon par le graveur parisien Louis David. Cette industrie dura près de deux siècles. La plupart des négociants venait de la France entière pour travailler dans les centres d'indiennage. En 1690, le nombre des centres d'impression augmente et en 1734, les ateliers les plus importants sont ceux de Bourdin, de Gignoux, de Julien, d'Astoin, de Ricard et de Maureau. Beaucoup de fabriques s'associent entre elles. A cette époque, ces centres font vivre plus de 500 ouvriers. Mais ils sont interdits à Avignon à la suite du concordat (1734) survenu entre le roi de France et le Pape. De ce fait, les imprimeurs sur étoffes se transportent à Orange et en 1757, ils quittent le sud de la France. Puis, ils reviennent à Avignon, dans la rue des Teinturiers, au début du XIX^{ème} siècle. En 1793, Isaac Léonard Quinche s'installe en Avignon comme fabricant d'indiennes (Chastel, 2006).

L'apogée des industries d'indiennes sera les années 1840-1850 où l'on compte près de onze établissements. Mais, vers la fin du XIX^{ème} siècle, la plupart des maisons avignonaises ferma leur porte à cause de la guerre de 1870 et du changement de mode, qui porteront un coup fatal à cette industrie. De ce fait, des maisons de renom comme la maison Foulc fils ou celle de Lacombe-Sey fermèrent leurs portes respectivement en 1882 et en 1884.

Lieux de prélèvement

Le Palais du Roure

Le Palais du Roure a une histoire peu commune. En 1469, Pierre Baroncelli, originaire de Florence, commença la construction d'une maison de style gothique sur l'emplacement de la taverne de l'Amourié, à proximité du Collège du Roure. La conception de cette demeure reprend celle du Petit Palais, demeure voisine du Palais des Papes, devenu aujourd'hui un musée dédié à la peinture italienne du moyen-âge. Dès le XVII^{ème} siècle, l'hôtel se transforme pour prendre l'aspect d'un hôtel particulier. Au XIX^{ème} siècle, l'hôtel de Baroncelli-Javon fut désigné par Frédéric Mistral (1830-1914) qui le fréquentait, sous le nom de "Palais du Roure". Il devint alors un foyer du félibrige. En 1908, l'hôtel fut vendu par la famille. Après avoir subi des préjudices considérables, il fut acheté en 1918 par Jeanne de Flandreysy, originaire de Valence, qui consacra toute sa vie à rendre son prestige au Palais du Roure. Elle entreprend d'y créer un lieu consacré à la culture méditerranéenne. En 1944, la ville d'Avignon hérite par donation du Palais. Aujourd'hui, le Palais du Roure est un musée sous la responsabilité de Madame Sabine Barnicaud, conservatrice, et dans laquelle une importante collection d'indiennes du XIX^{ème} siècle est aujourd'hui classée.

Le Museon Arlaten

Situé au cœur de la ville d'Arles dans les Bouches-du-Rhône, le Museon Arlaten, "musée arlésien", créé à l'initiative du poète Frédéric Mistral, est l'un des premiers musées d'ethnographie créé en France. Soucieux de redonner un souffle au félibrige, académie littéraire de langue d'Oc créée en 1854, Frédéric Mistral envisage, dès 1895, la création d'une vaste institution associant un musée de Beaux-Arts provençaux, un musée historique, une bibliothèque publique avec cabinet des médailles et inscriptions, un musée d'ethnographie. Mais, faute de soutien suffisant, son projet s'est finalement limité à l'ethnographie.

Inauguré en 1899, ce musée, créé pour conserver les traces d'une culture locale menacée de bouleversements à l'aube du monde contemporain, et pour légitimer une culture régionale singulière, décrit les modes de vie des Provençaux.

Installé, dans un premier temps, au second étage du Tribunal de Commerce, il sera transféré en 1906 dans un bâtiment plus vaste, l'Hôtel Laval-Castellane, un ancien collège mis à la disposition par la ville d'Arles. Frédéric Mistral, qui reçoit le prix nobel de littérature en 1904, se consacre alors au développement du Museon Arlaten. Il remet les collections au

département des Bouches-du-Rhône dès l'inauguration, pour assurer la pérennité de ce "lieu de mémoire" populaire.

Les collections muséographiques du Museon Arlaten sont estimées aujourd'hui à près de 30000 objets et documents issus du quotidien (costumes, mobilier, outils de travail, objets de culte et de superstition, livres, etc) sans compter les fonds d'archives et de bibliothèques. C'est Frédéric Mistral lui-même qui a initié la collecte des objets dès la fin du XIX^e siècle. Pour ce faire, il sollicite en 1896 la participation d'Emile Marignan (1847-1937), un médecin étudiant le folklore et à qui il confie la direction scientifique du musée. Ensemble, ils vont collecter des pièces d'une grande diversité jusqu'à la mort du poète en 1914.

A partir de 1934, Fernand Benoît (1892-1969), conservateur du musée, relance la collecte et rassemble en quelques années, de très nombreux objets "d'arts et de traditions populaires" et des documents historiques. Aujourd'hui, les collectes systématiques sont engagées sur des thèmes étudiés par des chercheurs proches du Comité du Museon Arlaten ou à partir d'enquêtes menées notamment par le Musée National des Arts et Traditions Populaires. Le conservateur en chef du musée est Dominique Serena et elle est assistée de Ghislaine Vallée dans le gestion des collections.

Description des échantillons**Tableau A.7. Description des indiennes.**

N° inventaire	Datation	Dimensions	Lieu de conservation
7	XIX ^{ème} siècle	23,4 × 25,7 cm	Palais du Roure
102	XIX ^{ème} siècle	20,2 × 23,7 cm	Palais du Roure
1997.14.1	1801-1825	30 × 32 cm	Museon Arlaten
2002.0.610	Probable XIX ^{ème} siècle	49 × 50 cm	Museon Arlaten
2003.0.777	Probable XIX ^{ème} siècle	54 × 64 cm	Museon Arlaten
2002.0.1458	Probable XIX ^{ème} siècle	16,5 × 88,8 cm	Museon Arlaten
2002.0.120	Probable XIX ^{ème} siècle	35,5 × 86 cm	Museon Arlaten
2002.0.1452	Probable XIX ^{ème} siècle	12,5 × 78,1	Museon Arlaten

Tableau A.8. Description des jupons et droulets.

N° inventaire	Datation	Localisation	Lieu de conservation
2003.0.835	XVIII ^{ème} siècle	Surpiqûre basse et intérieur	Museon Arlaten
2003.0.802	Post 1830	Inconnue	Museon Arlaten
2002.0.113	1780-1790	Inconnue	Museon Arlaten
2003.0.812	2 ^{ème} moitié du XIX ^{ème} siècle	Au niveau de la taille	Museon Arlaten

ANNEXE VII
CHROMATOGRAMMES
DES TISSUS ANCIENS

Indienne N°7

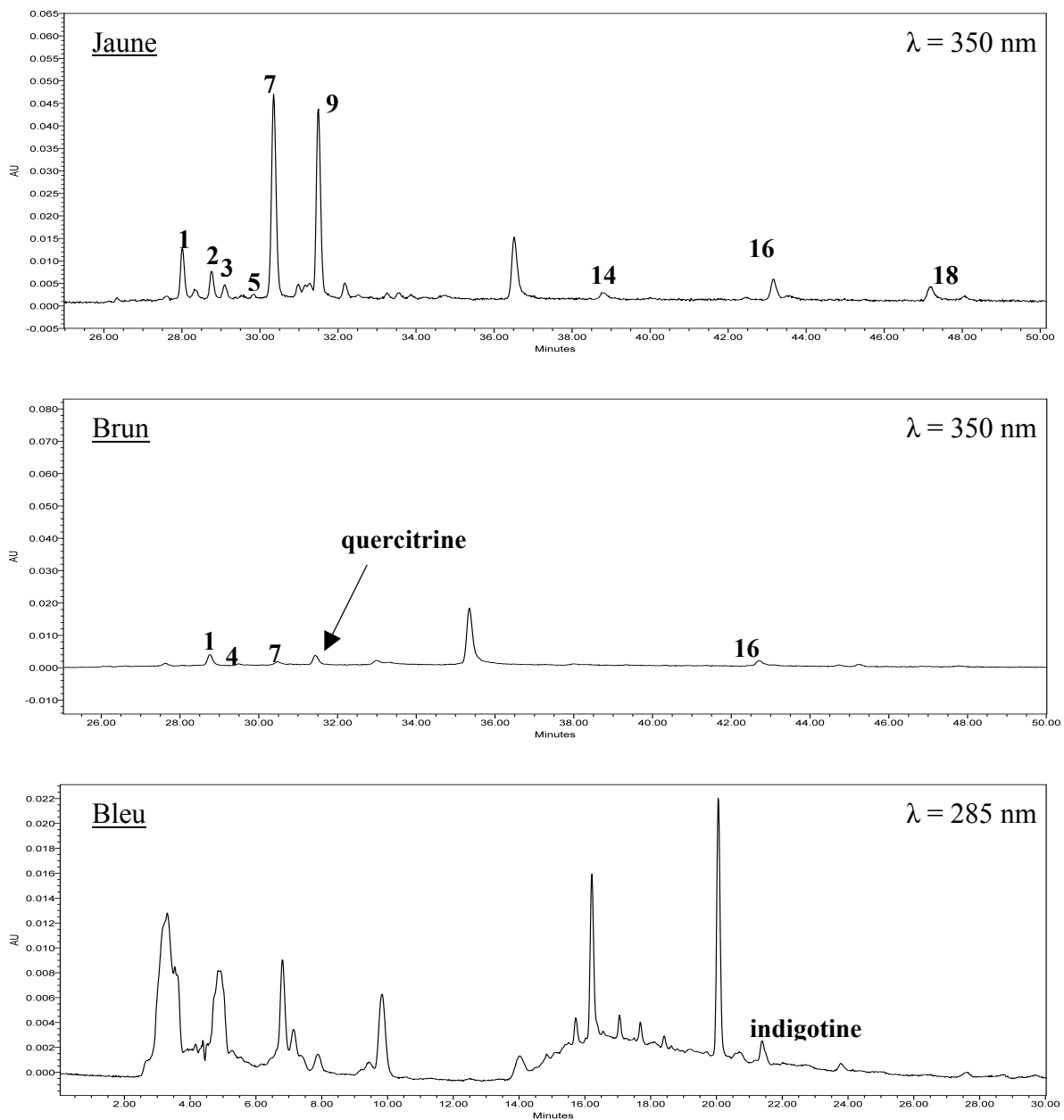


Figure A.50. Chromatogrammes de l'indienne N°7.

Indienne N°102

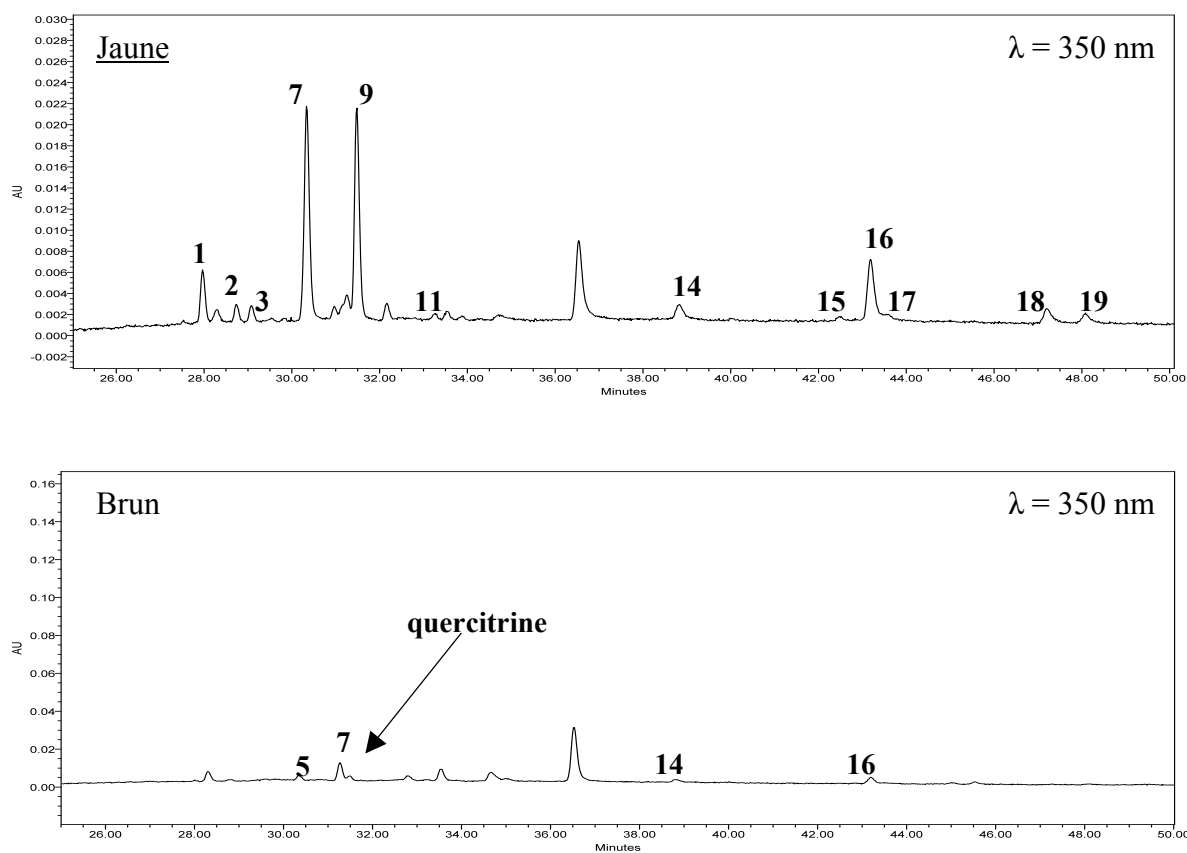
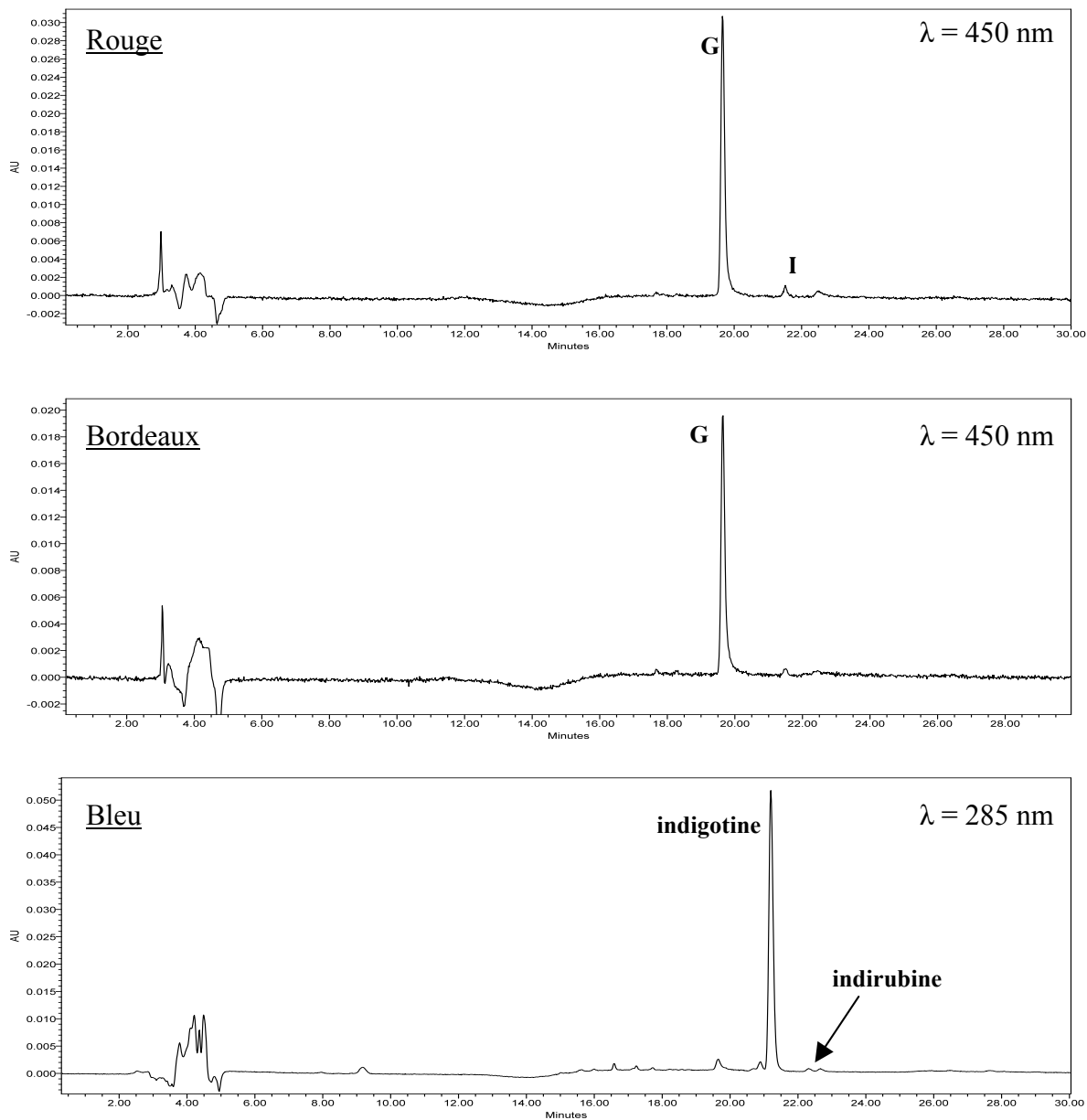


Figure A.51. Chromatogrammes de l'indienne N°102.

Indienne N°1997.14.1

*Figure A.52. Chromatogrammes de l'indienne N°1997.14.1.*

Indienne N°2002.0.610

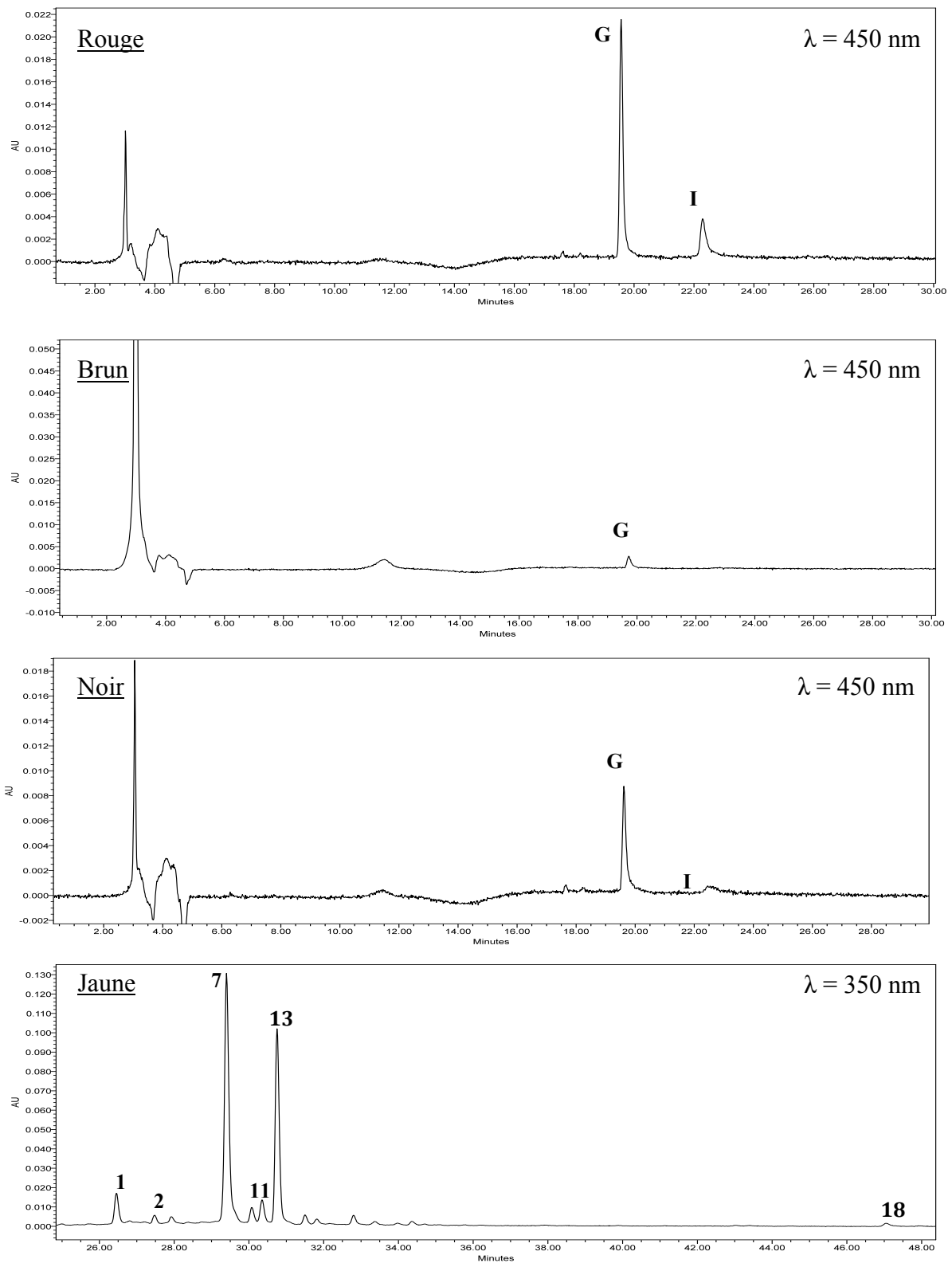


Figure A.53. Chromatogrammes de l'indienne N°2002.0.610.

Indienne N°2003.0.777

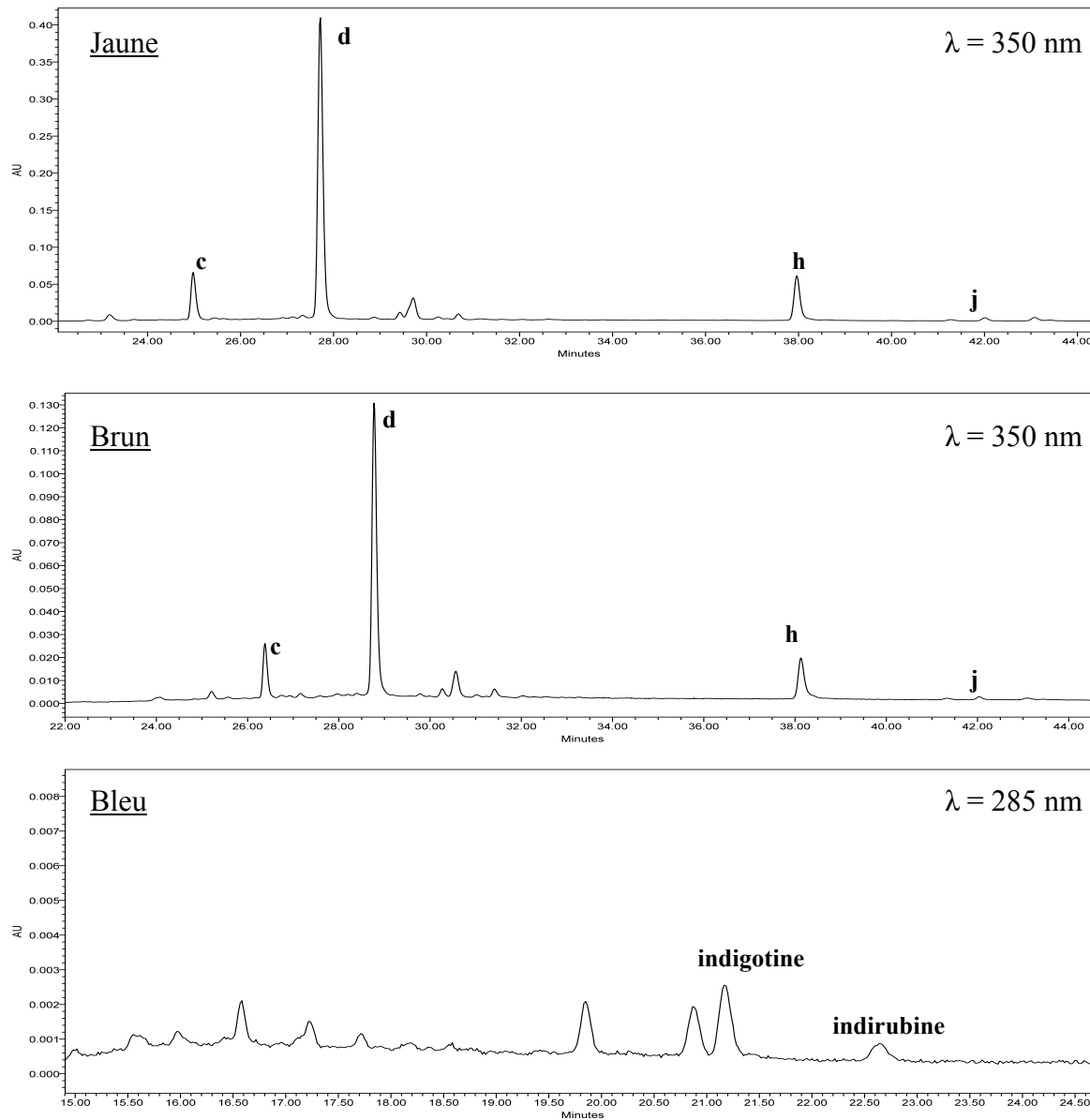
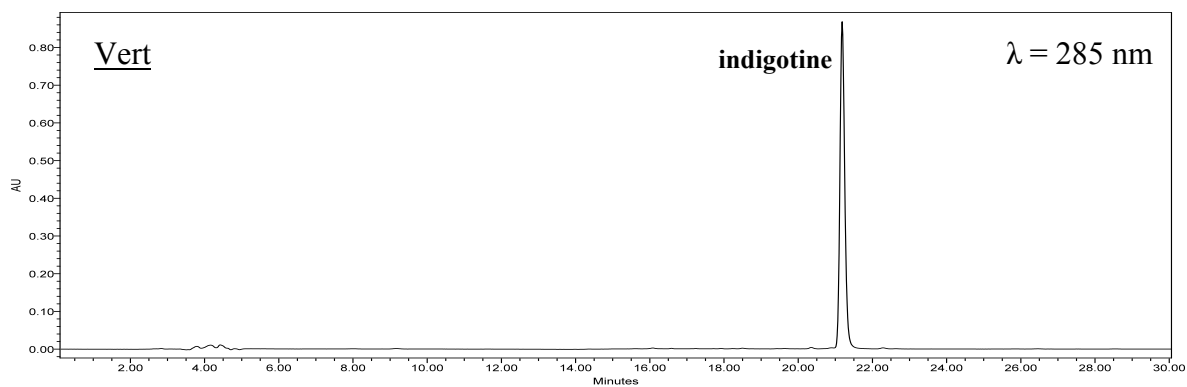
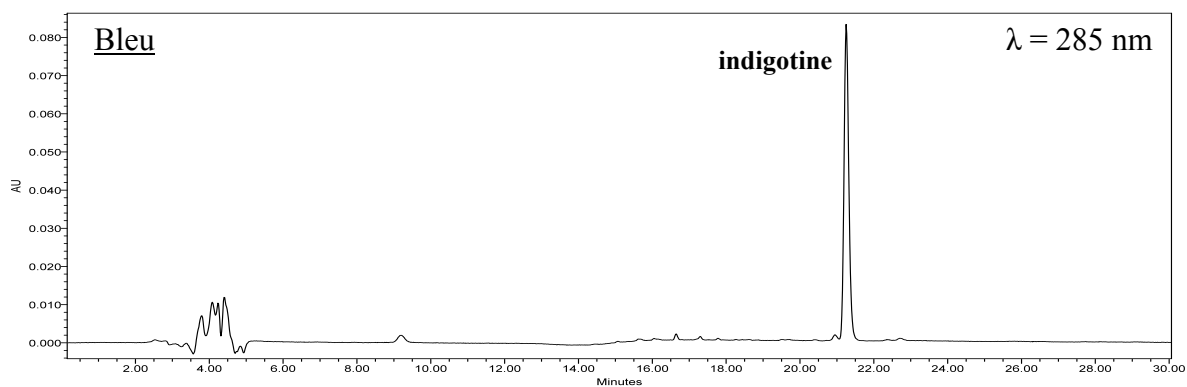
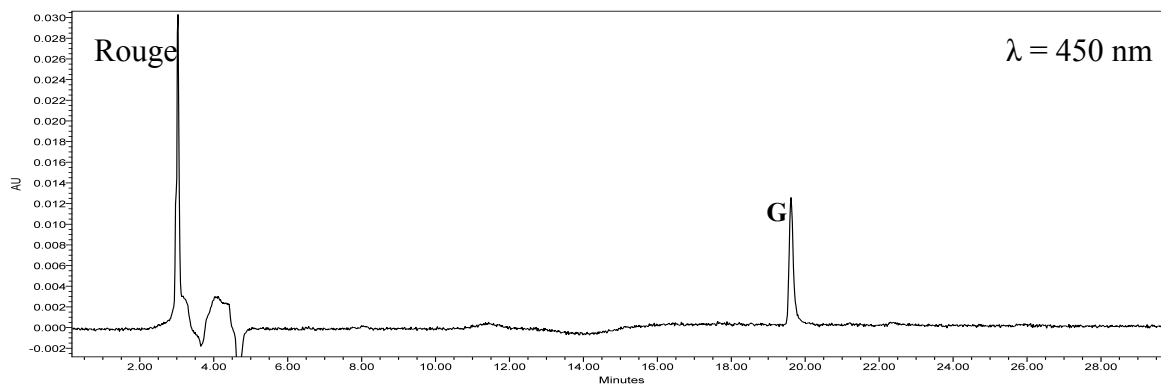


Figure A.54. Chromatogrammes de l'indienne N°2003.0.777.

Indienne N°2002.0.1458



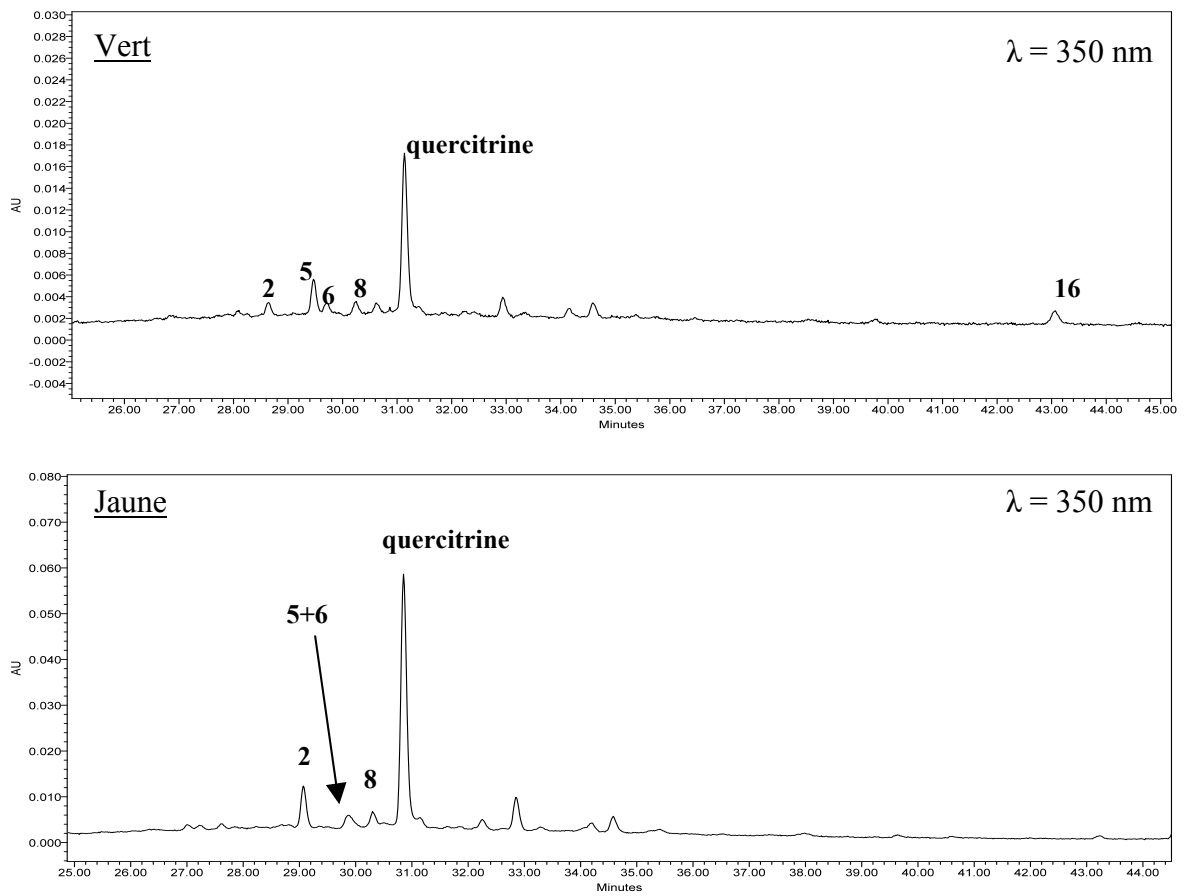
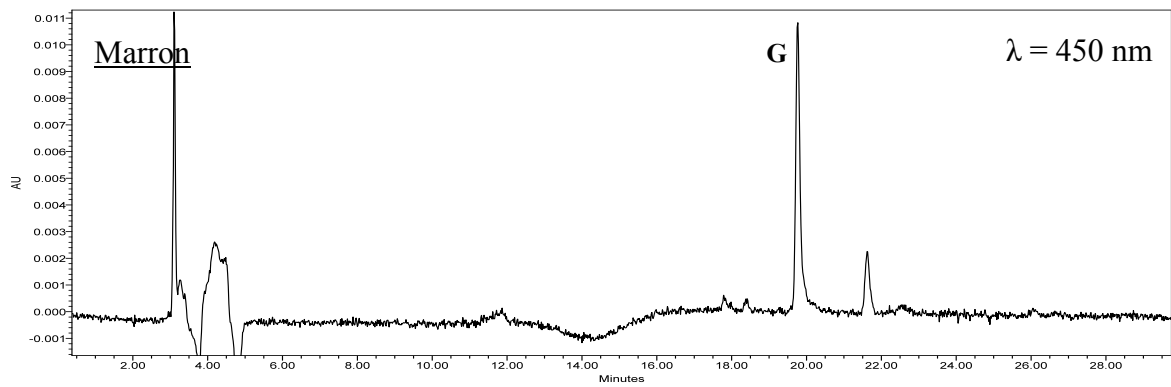
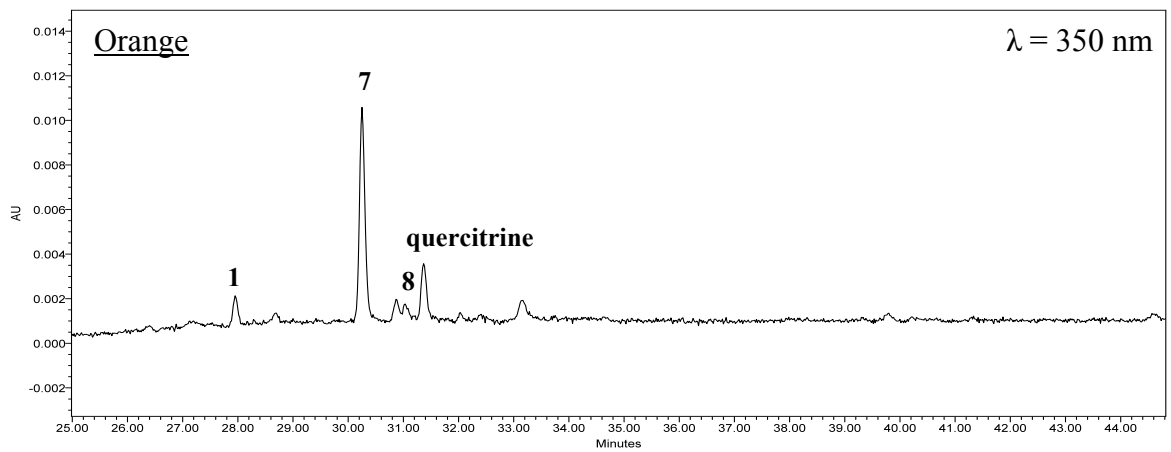
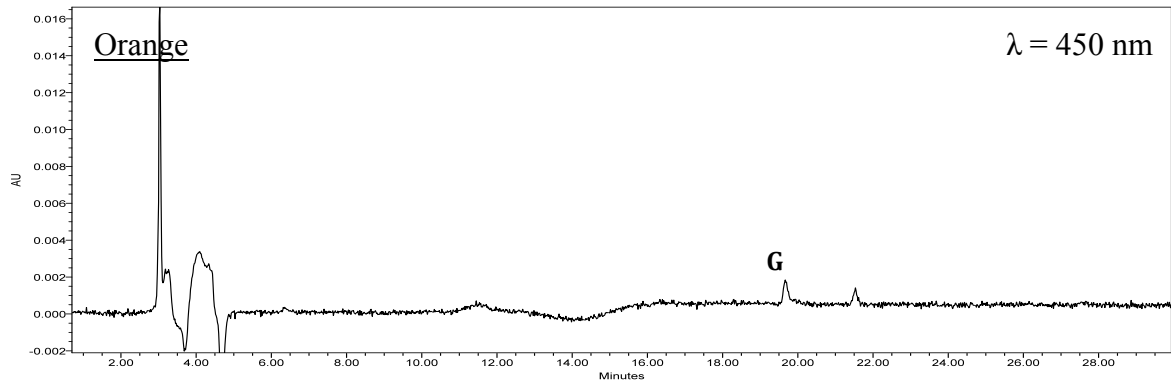


Figure A.55. Chromatogrammes de l'indienne N°2002.0.1458.

Indienne N°2002.0.120



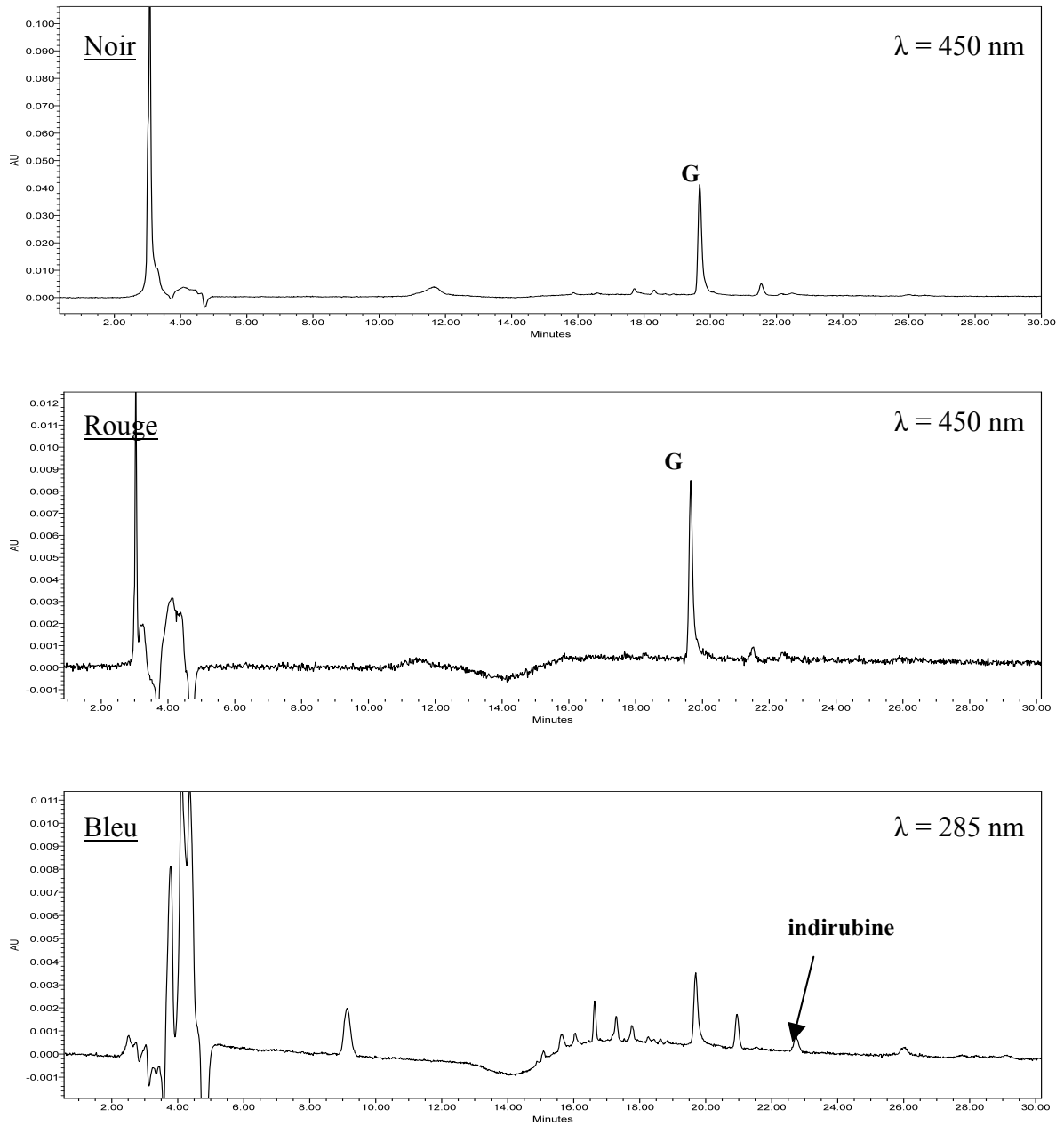
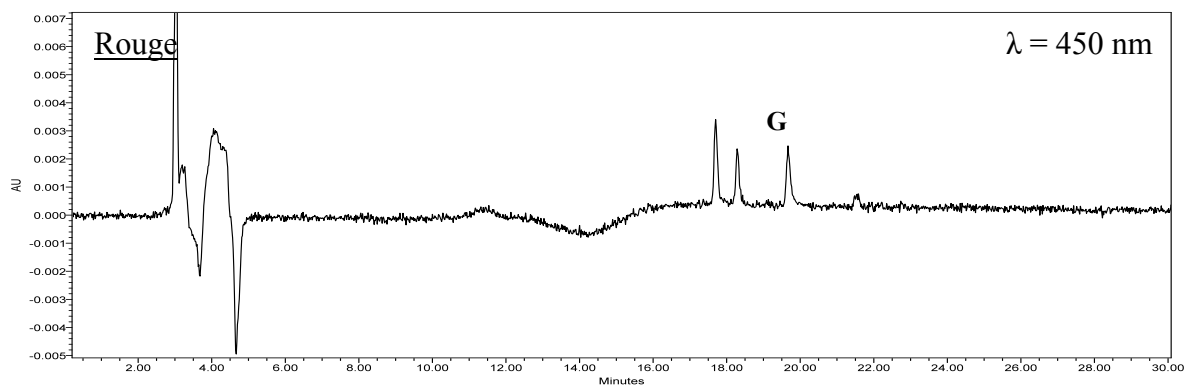
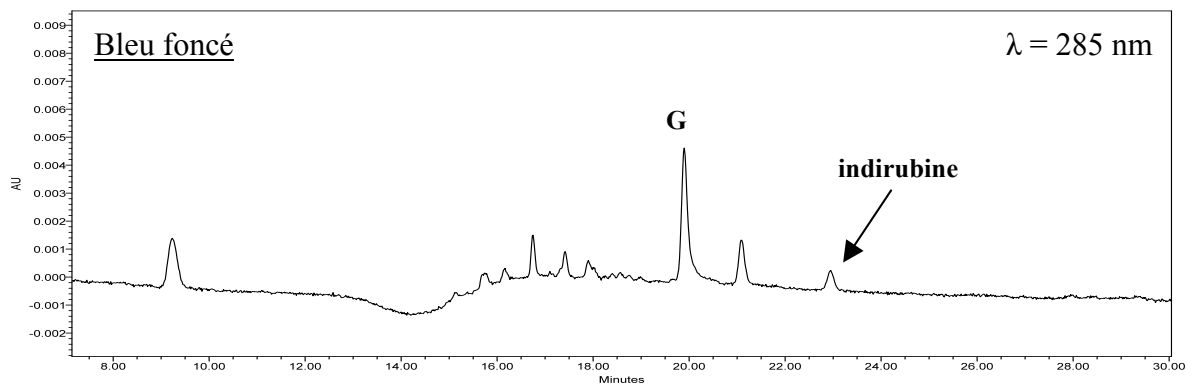
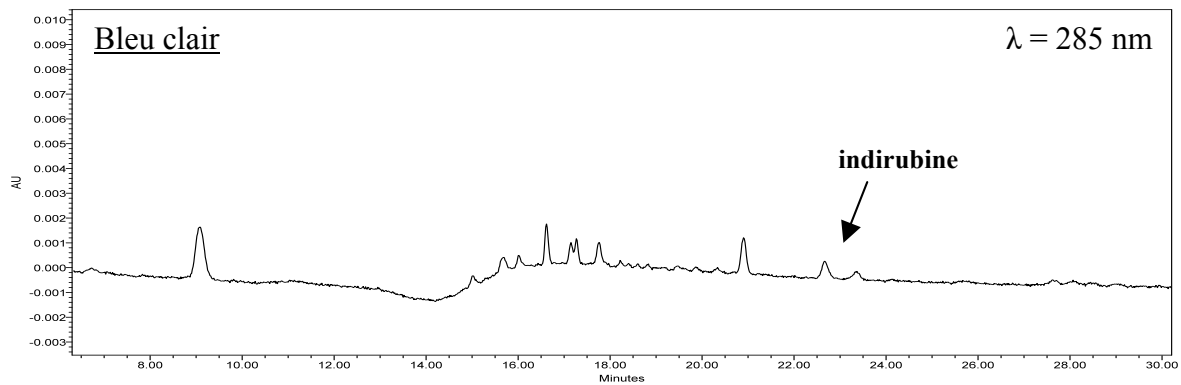


Figure A.56. Chromatogrammes de l'indienne N°2002.0.120

Indienne N°2002.0.1452



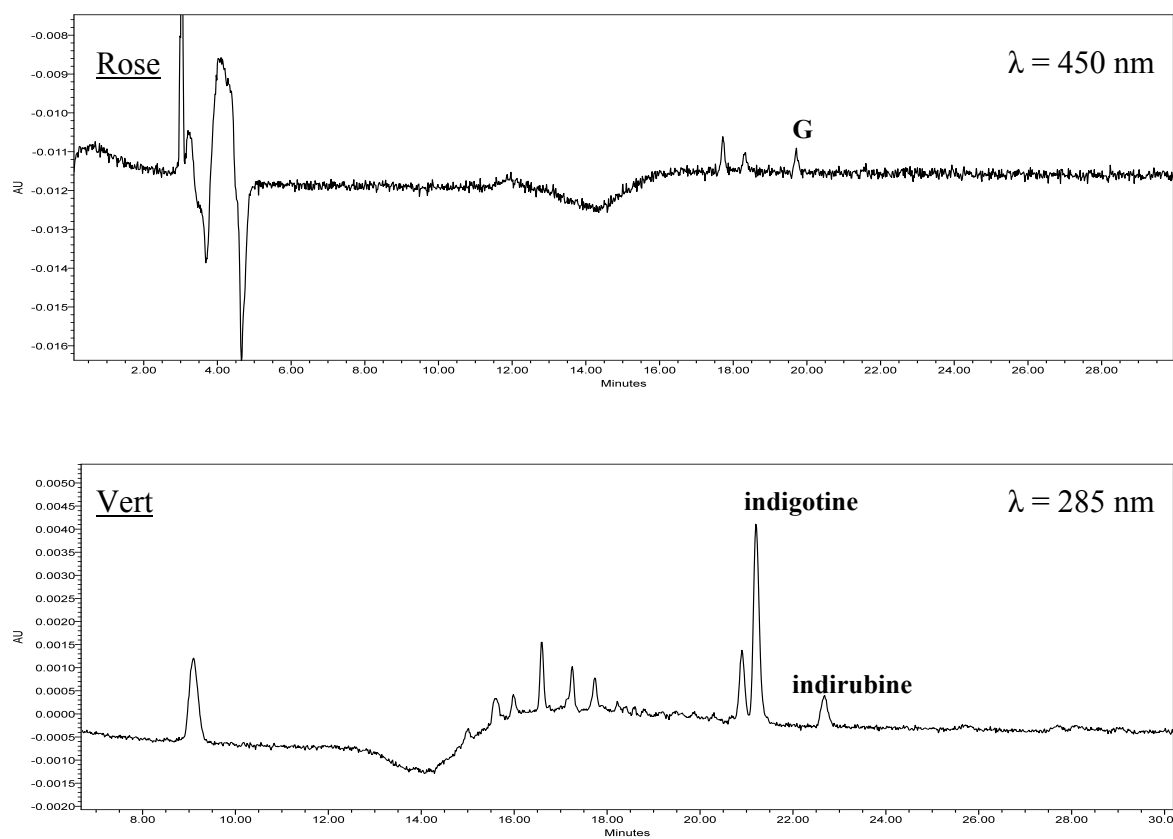


Figure A.57. Chromatogrammes de l'indienne N°2002.0.1452

Fils prélevés à partir de différents droulets et jupons

2003.0.835

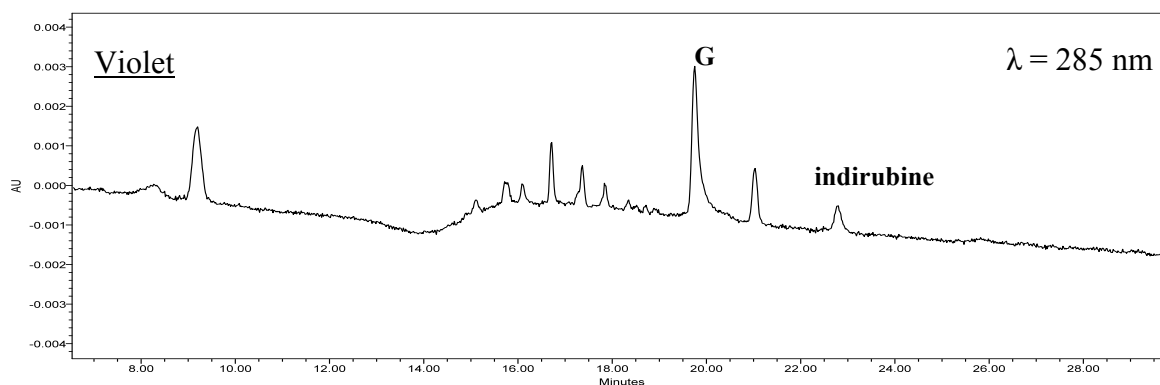
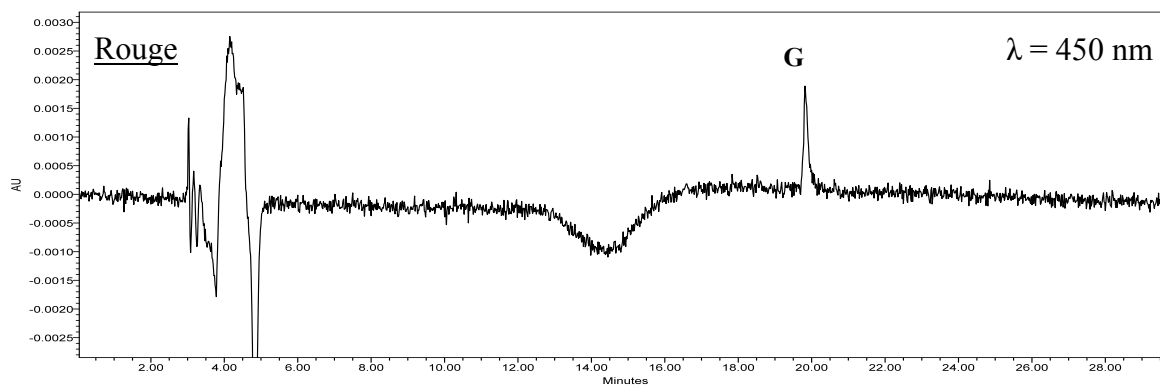


Figure A.58. Chromatogrammes des fils prélevés sur le jupon N°2003.0.835.

2003.0.802

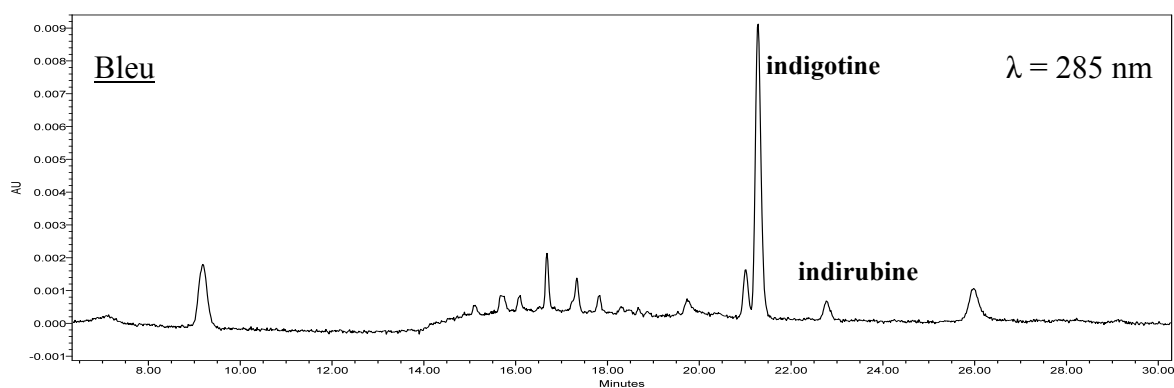


Figure A.59. Chromatogrammes des fils prélevés sur le jupon N°2003.0.802.

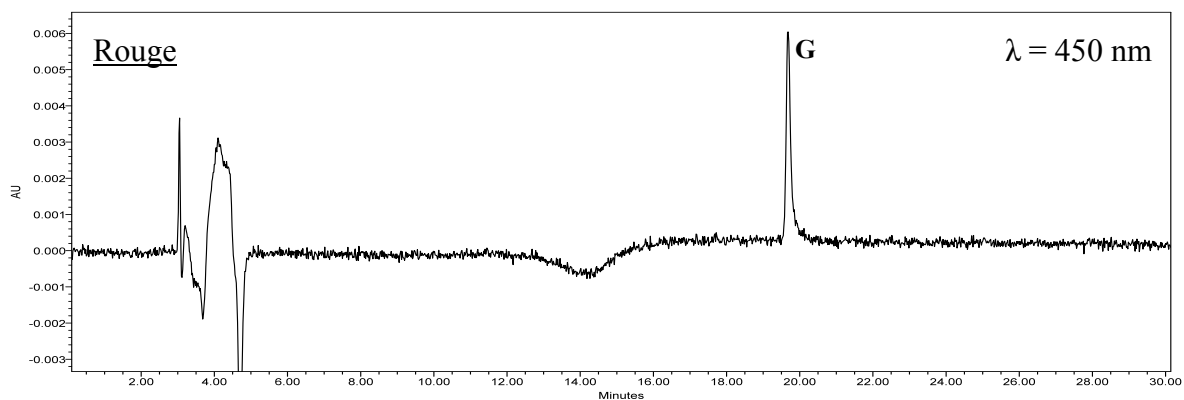
2002.02.113

Figure A.60. Chromatogrammes des fils prélevés sur le droulet N°2003.0.113.

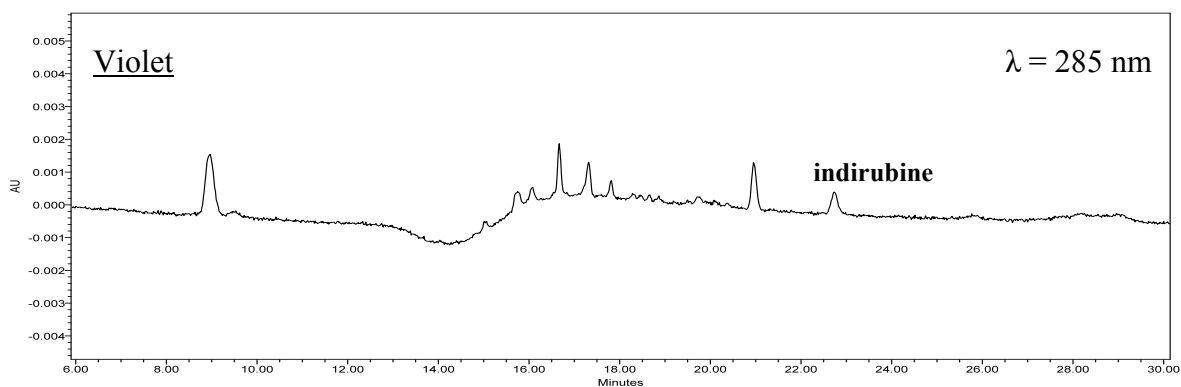
2003.0.812

Figure A.61. Chromatogrammes des fils prélevés sur le jupon N°2003.0.812.

Résumé :

Ces travaux portent principalement sur l'étude de trois plantes tinctoriales : la garance, le nerprun et la gaude. Ces végétaux ont fait l'objet de nombreuses cultures en Provence et constituaient la principale matière première en colorants rouges et jaunes pour les teinturiers et les artistes.

Une optimisation des conditions d'extraction des colorants de la garance assistée par ultrasons a été effectuée en utilisant un modèle statistique. Ce procédé d'extraction simple, rapide et efficace, a été comparé à deux autres techniques utilisées conventionnellement. Une étude cytohistologique des racines de garance a permis d'examiner les effets apportés par les différents procédés d'extraction. Les cellules traduisent après extraction par ultrasons, de profondes déstructurations fournissant une explication au plus important rendement en colorant extraits en comparaison aux extractions classiques.

Une étude fondamentale sur l'identification des colorants extraits à partir des fruits immatures d'espèces appartenant au genre *Rhamnus* a été effectuée. Une approche chromatographique utilisant la CLHP/UV-Visible/SM a permis d'identifier la partie flavonol. Elle présente principalement des composés glycosylés dont la partie rhamninoside est liée sur le flavonol en position 3 ou 4'. Des flavonols 3-*O*-acétyl-rhamninoside ont également été caractérisés et sont spécifiques de *Rh. saxatilis*. Les fruits matures renferment aussi des anthraquinones qui ont été séparées des flavonols et concentrées en utilisant l'Extraction sur Phase Solide (SPE). Après analyse par RMN, des dérivés rhamnoside et arabinoside acétylés de l'émodyne, jamais décrits dans la littérature, ont été identifiés dont le 6-*O*-(3',4'-diacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne et 6-*O*-(2',3',4'-triacétyl)-arabinopyranoside d'émodyne présents seulement dans *Rh. alaternus*. Les colorants jaunes de la gaude (*Reseda luteola*) ont été analysés par électrophorèse capillaire. En comparaison avec la CLHP, un gain important de la durée d'analyse a été observé tout en conservant une séparation convenable.

L'ensemble de ces résultats expérimentaux a pu être appliqué avec succès à l'étude de colorants extraits à partir d'objets et d'échantillons historiques provenant de collections muséales et comprenant notamment des indiennes du XIX^{ème} siècle. Enfin, des essais de teintures ont été réalisés, en collaboration avec la société Les Olivades dans le but de développer une gamme de tissus à base de colorants naturels.

Mots-clés :

Colorant organique, *Rubia tinctorum*, anthraquinone, extraction, ultrasons, plan d'expériences, cytohistologie, *Rhamnus spp*, *Reseda luteola*, Stil de grain, flavonoïde, indiennes, CLHP/UV/SM, RMN.

Abstract :

This work concerns the study of three tinctorial plants: madder, buckthorn and weld. These plant species produced many cultures in Provence and represented the principal raw material in red and yellow dyes for dyers and artists.

An optimisation of extraction conditions for madder dyes, using ultrasounds, was carried out with a statistical model. This easy, fast and effective extraction process was compared with two other conventional techniques. A cytohistological study on madder roots permits to examine effects produced by the different extraction processes. Cells reveal, after ultrasonic extraction, profound structural alterations, explaining the high yield in extracted dyes in comparison with classical methods.

A fundamental study on the dyes identification extracted from *Rhamnus* species green fruits was carried out. A chromatographic approach using HPLC-UV-MS permits to identify the flavonol fraction. It is mainly composed of glycosylated compounds where the rhamninosid part is linked in position 3 or 4' on the flavonol nucleus. 3-*O*-acetyl-rhamninosid derivatives were also characterised and they are specific to *Rh. saxatilis* species. Ripe fruits contained anthraquinonic compounds that were separated from flavonols and concentrated using Solid Phase Extraction (SPE). After NMR analyse, acetyl rhamninosid and arabinosid derivatives of émodine, never described in the specialised literature, were identified as emodin-6-*O*-(3',4'-diacetyl)-arabinopyranosid and emodin-6-*O*-(2',3',4'-triacetyl)-arabinopyranosid were only present in *Rh. alaternus*. Yellow dyes of weld (*Reseda luteola*) were analysed by capillary electrophoresis. In comparison with HPLC, a reduced run time was observed while preserving a suitable separation.

These experimental results were successfully applied to the study of ancient samples belonging from museums and including "indiennes" of the XIXth century. Finally, dying tests were carried out, in collaboration with Les Olivades society, in the aim to develop textiles containing natural dyes.

Key-words :

Organic dye, *Rubia tinctorum*, anthraquinone, extraction, ultrasound, multivariate study, cytohistology, *Rhamnus*, *Reseda luteola*, Stil de grain, flavonoïd, "indiennes", HPLC/UV/MS, NMR.