THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Sciences des Agroressources

Présentée et soutenue par :

Mme JULIA MOCQUARD

le vendredi 14 avril 2023

Titre :

Contribution à l'étude de la réactivité des précurseurs de l'indigo et à l'optimisation de la production de pigment à partir des feuilles d'Isatis tinctoria L.

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA)

Directrices de Thèse :

MME VIRGINIE VANDENBOSSCHE

MME LE LAMER ANNE-CÉCILE

Rapporteurs :

MME ANNE-SYLVIE FABIANO TIXIER, UNIVERSITE D'AVIGNON

MME SOPHIE TOMASI, UNIVERSITE RENNES 1

Membres du jury :

M. LIONEL ALLETTO, INRA TOULOUSE, Président

MME ANGÈLE LENGO MAMBU, UNIVERSITE DE LIMOGES, Membre

MME LE LAMER ANNE-CÉCILE, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

MME VIRGINIE VANDENBOSSCHE, TOULOUSE INP, Membre

Résumé

La culture d'*Isatis tinctoria* fut très importante en Europe, au Moyen-Âge, pour sa production de pigment indigo, très prisé par les teinturiers. En Occitanie, l'intérêt pour les molécules d'origine naturelle et le caractère emblématique du pastel a permis de faire perdurer sa culture localement. Toutefois, le rendement de cette production demeure instable et la qualité du pigment mal maitrisée. C'est dans ce contexte qu'un projet de recherche visant à améliorer la quantité et la qualité du pigment bleu contenant l'indigo à partir des feuilles de Pastel a été mis en place.

Au cours de ce projet, nous nous sommes intéressés aux principaux précurseurs de l'indigo dans le Pastel, l'isatan A et l'isatan B. Ces composés très instables ont été identifiés par UHPLC-HRMS afin d'établir un suivi régulier de leur teneur dans la plante au cours de l'année. Ces analyses ont montré la présence de précurseurs dans les feuilles tout au long de l'année et leur relative stabilité dans les feuilles jusqu'à trois jours après leur récolte. Leur réactivité dans les conditions de production a également été étudiée avec pour l'objectif de mieux comprendre leur conversation en indigo.

En parallèle, plus d'une quarantaine de pigments ont été produits à partir de feuilles de Pastel. Les paramètres de production du pigment ont été optimisés afin d'améliorer le rendement en pigment et sa teneur en indigo, ce qui a conduit à un essai de production à l'échelle industrielle. Également, une méthode de dosage de l'indigo a été développée et appliquée à l'ensemble des pigments produits, afin d'évaluer plus précisément leur teneur en indigo.

Ces travaux ont permis une meilleure compréhension de la réactivité des précurseurs, ainsi qu'une optimisation de leurs conditions d'extraction pour la production de l'indigo. S'il est possible de produire du pigment toute l'année à partir de feuilles fraiches, en revanche, la production demeure inconstante et peu reproductible, et ne semble donc pas uniquement conditionnée à la teneur en précurseurs et aux conditions d'extraction. Des mécanismes enzymatiques impliquant des enzymes foliaires végétales ou microbiennes, difficiles à maitriser, sont très probablement impliqués dans le processus de conversion des précurseurs en indigo.

Abstract

Isatis tinctoria culture was very important in the Middle Ages for its production of indigo pigment, highly prized by European dyers. The interest for molecules of natural origin and the emblematic nature of woad in Occitania made its culture last possible, in particular in this region. However, the yield of this production remains unstable and the quality of the pigment poorly controlled. It is in this context that a research project aiming to improve the quantity and quality of the blue pigment containing indigo from woad leaves has been set up.

During this project, we were interested in the main precursors of indigo in woad, isatan A and isatan B. These highly unstable compounds were identified by UHPLC-HRMS in order to implement a regular monitoring of their content in the plant during the year. These analyses showed the presence of precursors in the leaves throughout the year and their relative stability in the leaves until three days after harvest. Their reactivity under production conditions was also studied with the objective of better understanding their conversation in indigo.

In parallel, more than forty pigments were produced from woad leaves. The pigment production parameters were optimized to improve the pigment yield and its indigo content, which led to an industrial scale production trial. Simultaneously, an indigo quantification method was developed and applied to all the pigments produced, to evaluate more precisely their indigo content.

This work allowed a better understanding of the precursors' reactivity, as well as an optimization of their extraction conditions for the production of indigo. Although it is possible to produce pigment all year from fresh leaves, production remains inconsistent and not very reproducible, and therefore does not seem to be solely conditioned by the precursor content and extraction conditions. Enzymatic mechanisms involving plant or microbial leaf enzymes, which are difficult to control, are most probably involved in the process of precursors conversion into indigo.

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier sincèrement Mme Anne-Sylvie Tixier, maitre de conférences universitaire dans l'UMR_A 408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale (SQPOV), à l'Université d'Avignon, et Mme Sophie Tomasi, professeur de pharmacognosie à dans l'équipe Chimie organique et Interfaces (COrInt) de l'UMR Institut des Sciences chimiques de Rennes (CNRS 6226) à l'Université de Rennes 1, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également Mme Angèle Lengo Mambu, professeur dans le Laboratoire des Agroressources, Biomolécules et Chimie pour l'Innovation en Santé (LABCIS, UR 227722), de l'Université de Limoges, et Mr Lionel Alletto, docteur à l'UMR Agroécologie, Innovation et territoire (AGIR, INRAE), à l'université de Toulouse, d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

J'adresse également mes remerciements ma directrice et à ma co-directrice de thèse, Mme Virginie Vandenbossche et Mme Anne-Cécile Le Lamer, pour m'avoir encadrées durant ce projet, et ce malgré le départ de mon ancien directeur de thèse. Bien qu'il y ait eu de nombreux moments difficiles, emplis de doutes, vous m'avez soutenues, conseillées et permis d'avancer dans cette thèse semée d'obstacles. J'ai également pu réaliser un congrès International à Bruges, la « Venise du Nord », et réaliser un monitorat de deux ans, ce qui était un de mes souhaits en début de thèse.

Je remercie Mme Sophie Thiebaud-Roux, directrice du LCA, et Mme Valérie Jullian, directrice de PharmaDev, pour m'avoir accueillies dans leurs unités de recherche, mais aussi pour avoir été disponibles et à l'écoute.

Je tiens aussi à remercier Marieke Vansteelandt pour son aide dans la culture des endophytes fongiques et Patricia Jargeat pour l'identification des souches endophytiques.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Mme Isabelle Fouraste, pour qui l'étude botanique du pastel n'a aucun secret, et qui a réalisé de formidables photographies des coupes de feuilles.

Pendant les deux années de monitorat à l'ENSIACET, je tenais à remercier Mme Valérie Simon, qui m'a accueillie pour les TP des premières années, ainsi que tous mes collègues, Mme Caroline Sablayrolles, Mme Claire Tendero, Mme Florence gayet et Mr Jérôme Durand. Je remercie aussi Théo Aptel, qui a fait ses débuts en tant que technicien avec nous et qui j'espère continuera longtemps dans cette discipline. Je remercie très chaleureusement Mme Emmanuelle Dao, qui a été une technicienne méticuleuse durant tous ces TP, mais aussi une cuisinière hors-pair en dehors du travail, j'ai vraiment manger de super makis !

Je remercie les chercheurs nantais de la plateforme BIBS, Mme Hélène Rogniaux et Mr Matthieu Fanuel, avec qui nous avons coopéré sur le projet. Merci encore pour votre accueil et votre disponibilité, même si les résultats n'ont pas été ceux attendus.

Comment ne pas remercier Mme Valérie Cristofoli, ma partenaire de bureau en pharmacie qui m'a tenue compagnie pendant deux ans et qui m'a apportée une aide précieuse lors de plusieurs extractions de feuilles. Ce n'est un secret pour personne, tu as été une « maman poule » par ta bienveillance et ta gentillesse. Merci également à Adrien qui, mine de rien, a vécu le projet pendant presque un an et sans qui la plupart des résultats présentés n'auraient pas existé. J'espère que tu t'épanouiras à PharmaDev, ce dont je ne doute pas, pendant encore de nombreuses années.

Je tiens bien sûr à remercier tous les permanents que j'ai pu côtoyer pendant la thèse, dans les deux laboratoires. Au LCA, merci à Didier, Anne, William, Laure, Muriel, Géraldine, Yvonne, Thierry, Romain, Clément, Gwénole, Jean-François et tous ceux que je n'aurais pas cité. A PharmaDev, merci à Nicolas, Mohammed, Anne-Dominique, Jan, Karine, Pierre et Hélène pour leur soutien et tous les conseils.

Pendant trois ans, j'ai eu la chance de côtoyer deux laboratoires différents, et donc plein de doctorants avec qui nous nous sommes serré les coudes. Mes partenaires de bureau du « Coconut Mall », Rozenn, Mohammad, Laeticia et Khouloud, je vous souhaite une grande réussite comme nous l'a enseigné notre hymne et du courage pour la suite, que ce soit pour la fin de la thèse ou l'après-thèse. Au LCA, je remercie Elise, Alexandra, Jérôme, Julie, Victor, Arthur, Elliott, Jeanne, Guillaume, Nga, Laura, Pauline, Pierre, Nico et Margaux avec qui nous avons partagé bien des conversations, sérieuses ou non. A

PharmaDev, je remercie Elise, avec qui nous avons pratiquement commencé et finit ensemble la thèse, qui a été une grande source d'encouragement et de rires ! Merci à Emie, qui m'a permis de me remettre au sport alors que ce n'était pas gagné, je te souhaite bien du courage pour la suite de ta thèse (tu verras, on y survit). Bonne chance également à Clara et Théo dans cette aventure, je suis sûre que vous cartonnerez ! Bien qu'ils soient partis, je remercie également Maroussia, Simon, Romina, Ignès et Alexandre, ça a été formidable de vous côtoyer au cours de cette thèse.

Je ne pourrais également pas écrire cette partie sans remercier mes amis, qui m'ont apporté un soutien quotidien malgré la distance. Merci à Victor, Aurélie, Eléanore, Guillaume, Kevin, Damien, Matias, Sébastien et Hanna, ces années sont indissociables de nos sessions de jeux et de rires, j'espère continuer à vous apporter autant de divertissement mais avec un diplôme en plus ! Je n'oublie pas non plus le « staff PB » Pauline, Mathilda, Rachel et Axelle, vous avez supporté bien des plaintes de ma part. Vous êtes tous impliqués dans ce travail, que vous le vouliez ou non. J'adresse également mes plus sincères remerciements au Docteur Montgomery et à son épouse, surtout pour leur soutient pendant l'année 2021.

A ma famille, merci de tout mon cœur pour votre support. Maman, papa, Eloïse, Thomas, mes neveux Achille et Gaspard, tonton Laurent, Mimi, sans vous, rien n'aurait été possible, je vous dédie donc cette thèse. Tous ces moments difficiles ont été surmontables grâce à votre soutien sans faille. J'ose inclure Féanie, Newt et Lewis dans les remerciements qui, sans le savoir, m'ont aidé à supporter des moments compliqués. Je pense à mes grands-parents et à Michelle, qui je pense auraient été fiers de cette thèse.

Table des matières

Résumé **2**
Abstract **3**
Remerciements **4**
Table des matières **7**
Liste des figures **10**
Liste des tableaux **14**
Liste des abréviations et des acronymes **15**
Introduction **16**
Chapitre 1 – Synthèse bibliographique **18**
1.1. Historique du pigment indigo *18*
1.2. La molécule d'indigo *20*
1.2.1. Propriétés et réactivité 20
1.2.2 Sources 22
1.3. Isatis tinctoria L. *26*
1.3.1 Description botanique 26
1.3.2 Précurseurs de l'indigo d'*Isatis tinctoria* 27
1.4. La production d'indigo à partir de méthodes médiévales et modernes *34*
1.4.1 La production médiévale d'indigo 34
1.4.2 Extraction et précipitation 39
Chapitre 2 – Etude des précurseurs de l'indigo **41**
2.1 Etude botanique des feuilles de Pastel *41*
2.1.1 Etude macroscopique de la feuille d'*Isatis tinctoria* 42
2.1.2 Etude microscopique d'une coupe de feuille d'*Isatis tinctoria* 43
2.2 Déréplication d'un extrait méthanolique de feuilles fraiches de Pastel *47*
2.2.1. Préparation d'un extrait méthanolique de feuilles de Pastel 47
2.2.2. Analyse par UHPLC-HRMS de l'extrait méthanolique 48
2.3 Analyse de la teneur relative en précurseurs *54*
2.3.1 Récolte des feuilles de Pastel 54
2.3.2 Etude des conditions d'extraction et conservation des extraits MeOH 56
2.3.3 Analyses des précurseurs sur différents lots de Pastel 60

2.4 Etude de la réactivité des précurseurs *69*
2.4.1 Analyse des précurseurs en conditions de production du pigment 69
2.4.2 Analyse de la réactivité des précurseurs purifiés dans les conditions de production du bleu 72
2.5 Bilan et perspectives de l'étude des précurseurs de l'indigo *88*

Chapitre 3 – Production du pigment indigo **90**

3.1 Extraction du pigment indigo à l'échelle du laboratoire *90*
3.1.1 Mise en place du procédé d'extraction du pigment indigo 90
3.1.2 Développement d'une méthode de dosage de l'indigo dans le pigment 92
3.1.3 Suivi de la production de pigment indigo obtenue à partir des feuilles prélevées sur le champ de Terre de Pastel entre juin 2020 et juin 2021 98
3.2 Optimisation du procédé de production *101*
3.2.1 Méthodologie 101
3.2.2 Prétraitement des feuilles de Pastel 103
3.2.3 Optimisation de l'étape d'extraction des précurseurs 107
3.2.4 Production à partir de feuilles de maturité différente 117
3.3 Essai de mise à l'échelle industrielle *118*
3.3.1. Conditions opératoires des différentes étapes utilisées à l'échelle pilote 118
3.3.2 Bilan de l'extraction 120

Conclusion et perspectives **122**
Chapitre 4 - Matériel et méthodes **126**

4.1 Solvants et réactifs *126*
4.2 Matériel végétal *126*
4.3 Extractions *128*
4.3.1 Extraction méthanolique des feuilles fraiches de Pastel 128
4.3.2 Essais de conservation des extraits MeOH 128
4.3.3 Suivi des précurseurs après la récolte 129
4.4 Analyses *130*
4.4.1 UHPLC-HRMS 130
4.4.2 Chromatographie sur couche mince (CCM) 131
4.4.3 Spectrométrie par Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton ^{1}H en solution 131

4.4.3 Spectrométrie par RMN du carbone ^{13}C solide 132

4.5 Fractionnement des extraits méthanoliques de Pastel *132*

4.5.1 Chromatographie liquide flash en phase normale 132

4.5.2 Purification de l'isatan A 133

4.6 Etude de la réactivité des précurseurs dans les conditions de production du bleu *133*

4.6.1 Essais à température ambiante 134

4.6.2 Essais à 60°C 134

4.6.3 Voltammétrie cyclique 135

4.7 Procédé de production du pigment de Pastel *136*

4.7.1 Production du pigment au LCA (méthode de 2016) 136

4.7.2 Plan d'expérience 137

4.8 Evaluation de la qualité du pigment *139*

4.8.1 Colorimétrie 139

4.8.2 Spectrophotométrie UV-visible 140

Références **141**

Annexes **155**

Liste des figures

Figure 1 - Structure de la molécule d'indigo dans les configurations (a) trans et (b) cis 21
Figure 2 - Réactions impliquant l'indican pour la formation de l'indigo 23
Figure 3 - Synthèse de l'indigo de Heumann-Pfleger (1901) (adapté de Schmidt [42] et Cordin et al. [43]) 23
Figure 4 - Biosynthèse de l'indigo à partir du tryptophane chez les bactéries via une mono ou une dioxygénase en indigo 25
Figure 5 - Rosette de jeunes feuilles de Pastel (a) ; Pastel fleuri de deuxième année (b) cultivé à Labège, près de Toulouse (France) 26
Figure 6 - Structure proposée de l'isatan B par Epstein et al. en 1967 [75] 27
Figure 7 - Structures de l'isatan B et de l'isatan A (adapté de Oberthür et al., 2004 [80]) 28
Figure 8 – Biogénèse de l'indican à partir de la voie métabolique du shikimate, suggérée par Warzecha et al., 2007 [85], et Salvini et al., 2008 [83] 29
Figure 9 – Schéma de la réaction proposée de la transformation de l'indican en l'isatan B, puis à la formation de l'isatan A 30
Figure 10 - Proposition de la réaction conduisant à la production d'indigo à partir des principaux précurseurs d'*I. tinctoria* (Isatans A et B) 31
Figure 11 - Structures d'autres pigments indigoïdes 32
Figure 12 – Préparation d'une cocagne à partir de feuilles fraiches broyées (a) ; cocagnes séchées, produites à partir de différentes récoltes et dans différentes conditions (b) ; Photos de Hartl et al., 2015 [34] 36
Figure 13 - Représentation schématique des réactions ayant lieu lors de la confection de cocagnes à partir de feuilles fraiches broyées 37
Figure 14 – Photographie de la nervure centrale d'une feuille d'*I. tinctoria* à partir d'une coupe transversale colorée (x400) 44
Figure 15 – Détail du faisceau conducteur central dans la nervure centrale de la feuille d'*I. tinctoria* (grossissement x 100) (a) ; Détail du limbe et de poils tecteurs d'une coupe de feuille d'*I. tinctoria* (grossissement x 100) (b) 45
Figure 16 - Formation d'indigo sur une coupe transversale de feuille de Pastel observée au microscope dans de l'eau (grossissement x40). 46
Figure 17 - Chromatogramme UHPLC-ESI(-)-HRMS d'un extrait méthanolique de Pastel, annoté des trois principaux précurseurs de l'indigo 49
Figure 18 - Fragmentation du malonylindican (m/z = 336,1085, tR = 4,35 min) 51

Figure 19 - Vue satellite du champ de Labège avec la parcelle occidentale (bleue) et la parcelle orientale (rouge) où les prélèvements de feuilles de Pastel ont été réalisés 55
Figure 20 - Plants d'âges et de tailles différents de Pastel sur le champ de Labège, en octobre 2019 56
Figure 21 - Structure de la tryptanthrine 57
Figure 22 - Histogramme des teneurs en précurseurs dans des extraits MeOH 15 jours après la récolte (J15) et 35 jours après (J35) dans différentes conditions de températures et d'atmosphère. 58
Figure 23 - Histogramme des analyses UHPLC-ESI-HRMS de la somme des teneurs en précurseurs, en phénols et en glucobrassicine dans des feuilles de différentes maturités (en triplicat, sauf pour le mélange de feuilles) 61
Figure 24 - Histogramme du taux d'extraction et des teneurs en précurseurs, en glucobrassicine et en « phénols » des extraits MeOH de feuilles fraiches de Pastel réalisés de juillet 2020 à juin 2022. 63
Figure 25 - Histogramme des analyses UHPLC-ESI-HRMS de la somme des teneurs en précurseurs et en phénols dans des feuilles extraites à 1, 2, 7 et 24h après la récolte 67
Figure 26 - Histogramme des analyses UHPLC-ESI-HRMS de la somme des teneurs en précurseurs et en phénols dans des feuilles extraites jusqu'à 3 jours après la récolte 67
Figure 27 - Chromatogrammes d'un extrait méthanolique (vert), d'un extrait aqueux acide (rouge) et d'un extrait aqueux basique (bleu) 71
Figure 28 – (a) Chromatogramme UV (280 nm) d'une séparation par chromatographie flash en phase normale d'un extrait MeOH de feuilles fraiches (b) CCM des fractions obtenues par chromatographie flash 73
Figure 29 - Chromatogramme de la fraction CH_3Cl enrichie en isatan B 74
Figure 30 – Chromatogramme UHPLC-ESI-HRMS de la fraction 7 enrichie en isatan A 75
Figure 31 - Chromatogramme UHPLC-ESI-HRMS de la fraction AcOEt enrichie en isatan A 75
Figure 32 - Chromatogrammes UHPLC-ESI-HRMS des solutions aqueuses d'isatan A en condition neutre, pH 3 et pH 1 77
Figure 33 - Chromatogrammes UHPLC-ESI-HRMS des solutions aqueuses d'isatan B en condition neutre, pH 3 et pH 1 77

Figure 34 - Solutions aqueuses d'isatan A à pH 3 (a) et à pH 1 (b). De l'indigo a commencé à précipiter dans la solution à pH 1 (b) 78
Figure 35 - Chromatogrammes UHPLC-ESI-HRMS des solutions aqueuses d'isatan A à 60°C, à pH 3 et pH 1 79
Figure 36 - Chromatogrammes UHPLC-ESI-HRMS des solutions aqueuses d'isatan B à 60°C, à pH neutre et pH 3 79
Figure 37 - Chromatogrammes UHPLC-ESI-HRMS des solutions aqueuses d'isatan A (a) et d'isatan B (b) avec une β-glucosidase à pH3, chauffée à 60°C pendant une heure 81
Figure 38 - Voltammogramme de suivi de l'indican (2 mM) à pH 3 pendant 23h avec une électrode de VC, vitesse de balayage 0,1 V/s 83
Figure 39 - Voltammogramme de suivi de l'indican (2 mM) à pH inférieur à 1 pendant 24h avec une électrode de VC, vitesse de balayage 0,1 V/s 84
Figure 40 - Voltammogramme de suivi l'indican (2 mM) à pH 10,5 pendant 18h avec une électrode de VC, vitesse de balayage 0,1 V/s 84
Figure 41 - Voltammogramme de suivi l'indican (2 mM) à pH 3, en présence de β-glucosidase, pendant 18h avec une électrode de VC, vitesse de balayage 0,1 V/s86
Figure 42 - Indoxyles sous forme cétonique (pH 3) et sous forme énolique (pH 10,5) en solution aqueuse 86
Figure 43 – Voltammogrammes de suivi de l'isatan A (1 mg/mL) à pH 3 à température ambiante, avec et sans β-glucosidase, pendant 20 minutes (a) et de l'isatan B (1 mg/mL) à pH 3, avec et sans β-glucosidase, à 60°C, pendant 20 minutes (b) avec une électrode de VC, vitesse de balayage 0,1 V/s. La courbe bleue (DT) du voltammogramme (b) correspond à un essai avec un pistolet de chauffage 87
Figure 44 - Courbe d'étalonnage de l'indigo commercial dilué dans du KBr puis solubilisé dans du DMF 93
Figure 45 - Spectre de RMN du solide du ^{13}C de l'indigo 95
Figure 46 - Spectre de RMN du solide du ^{13}C de l'indirubine, en s'inspirant de l'étude de Alkorta et al. de 2020 [141] 96
Figure 47 - Spectre de RMN du solide du ^{13}C de trois pigments obtenus en septembre 2021 97
Figure 48 – Répartition des points expérimentaux sur les plans de Doelhert pour deux et trois facteurs 102

Figure 49 - Influence du prétraitement par lavage des feuilles de pastel sur le rendement en indigo ($\boldsymbol{\sigma indigo}$ correspond à l'encadrement de la courbe « 1 lavage » en tenant compte de l'écart type calculé sur le triplicat) 106
Figure 50 - Pigments extraits à partir des essais PE1-FF1 à PE1-FF8 resolubilisés dans du DMF 106
Figure 51 - Pigments PE2-FF1 à PE2-FF8 extraits le 14/09/2021 et PE2-FF9 à PE2-FF16 extraits le 15/09/2021 en solution dans du DMF 111
Figure 52 - Modélisation numérique des rendements en pigment, en indigo, et en pureté en indigo dans le pigment en fonction des conditions d'extraction (pH, durée d'extraction) pour une température de 43°C. 112
Figure 53 - Modélisation numérique des rendements en pigment, en indigo, et en pureté en indigo dans le pigment en fonction des conditions d'extraction (pH, température) pour une durée d'extraction de 2h. 115
Figure 54 - Feuilles de Pastel immergées dans 175L d'eau acidifiée et chauffée pour la première étape d'extraction des précurseurs, lors de la production à échelle industrielle 119
Figure 55 – Teneur des précurseurs isatan A et isatan B dans des extraits MeOH de feuilles fraiches réalisés à différentes concentrations 131
Figure 56 - Représentation de la préparation des échantillons dans différentes conditions de production pour l'étude de la réactivité des précurseurs 135

Liste des tableaux

Tableau 1 – Photos de feuilles de phénotypes différents et résultats obtenus après pressages entre deux feuilles de papier (réalisé par Clément Chastrette).....42
Tableau 2 - Récapitulatif des ions des principaux précurseurs avec leurs fragmentations respectives, obtenus à partir d'analyse d'extraits méthanoliques de feuilles fraiches de Pastel par UHPLC-(ESI -)-HRMS 50
Tableau 3 - Paramètres étudiés lors des essais préliminaires d'optimisation de production de 2016 91
Tableau 4 - Rendements et concentrations en indigo des pigments produits avec la méthode standard 99
Tableau 5 - Domaine de définition théorique du plan d'expérience PE1 104
Tableau 6 - Variables codées et variables expérimentales du PE1.....105
Tableau 7 - Récapitulatif des résultats du plan d'expérience PE1 sur le prélavage des feuilles fraiches de Pastel 105
Tableau 8 - Domaine de définition théorique du plan d'expérience PE2 109
Tableau 9 - Variables codées et variables expérimentales du PE2.....109
Tableau 10 - Récapitulatif des résultats du plan d'expérience PE2 sur l'optimisation de l'étape d'extraction des précurseurs 110
Tableau 11 - Domaine de définition théorique du plan d'expérience PE3 114
Tableau 12 - Variables codées et variables expérimentales du PE3.....114
Tableau 13 - Récapitulatif des résultats du plan d'expérience PE3 sur l'optimisation de l'étape d'extraction des précurseurs 115
Tableau 14 - Résultat de la production de pigment issue de feuilles de cœur de rosette et d'un mélange de feuilles de différentes maturités 117
Tableau 16 - Récoltes réalisées sur le champ de Labège en fonction de la date de récolte et la parcelle récoltée 127
Tableau 17 - Paramètres d'extraction et de précipitation de la production de pigment effectuées pour les plans d'expérience PE1, PE2 et PE3 en 2021 137

Liste des abréviations et des acronymes

ASC : Aire Sous la Courbe

BHT : Hydroxytoluène Butylé

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CYP : Cytochrome P450

DMF : Diméthylformamide

EA : Extrait Aqueux

FMO : Flavine Monooxygénase

GT : Glucosyltransferase

HCl : Acide chlorhydrique

MeOH : Méthanol

NaOH : Hydroxyde de sodium

NDO : Naphtalène Dioxygénase

NMP : *N*-méthyl-2-pyrrolidone

PM : Poids Moléculaire

RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire

SM : Spectrométrie de Masse

tR : Temps de Rétention

TSA : Tryptophane Synthase A

UA : Unité d'absorbance

UDP : Uridine diphosphate

UHPLC-HRMS : Ultra High Performance Liquid Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry (Chromatographie liquide ultra haute performance – Spectrométrie de masse haute résolution)

Introduction

Le pigment bleu de Pastel, produit à partir des feuilles d'*Isatis tinctoria* L., qui a fait la renommée de la Région Occitanie pendant plusieurs siècles, a bien failli disparaitre au profit de productions plus rentables. Même si sa culture a été relancée dans la région à la fin du 20ème siècle, il se trouve aujourd'hui face à une problématique de production. En effet, bien que la culture de la plante procure des rendements intéressants et offre une option de diversification choisie par plusieurs agriculteurs de la région, l'opération de transformation des feuilles est une étape sensible nécessitant un savoir-faire qui reste, malgré la demande, artisanal, et de ce fait ne parvient pas à offrir une production de qualité constante et sûre en pigment bleu. Un autre obstacle au développement de la production de ce pigment est qu'il ne peut être obtenu qu'à partir de feuilles d'*Isatis tinctoria* fraichement récoltées, aucun procédé ne permettant de conserver les feuilles après la récolte, hormis la fabrication des traditionnelles cocagnes.

Actuellement, le regain d'intérêt pour les molécules d'origine naturelle permet de conforter la reprise de cette culture en Occitanie. Toutefois, de nombreux points sont encore à éclaircir pour permettre d'assoir durablement la filière du pigment de Pastel dans notre région.

Le Laboratoire de Chimie Agroindustrielle (LCA), qui a été dans les années 1990 un des acteurs de la remise en culture du Pastel dans la région et a déjà mené plusieurs thèses sur l'obtention du pigment, a lancé en 2019 le projet NewCocagne. Ce projet, financé par les Fonds Européen de Développement Régional, inclut à la fois des laboratoires de recherche toulousains : le LCA (UMR 1010 INRA/INP-ENSIACET), Pharmadev (UMR 152 IRD/UPS), et AGIR (UMR 1248 INRAE/INPT), un laboratoire de Montpellier, l'UMR AGAP Institut (CIRAD, INRAE, l'Institut Agro Montpellier, l'Université de Montpellier) et un industriel de la filière : l'entreprise Terre de Pastel. Ce projet a pour objectif d'améliorer la compréhension des mécanismes chimiques et biologiques qui limitent la production de pigment bleu à partir des précurseurs, d'établir les conditions d'extraction menant à un rendement optimum en pigment bleu, de designer un nouveau procédé de production de bleu opérationnel sur une matière végétale conservée dans des conditions proches de la cocagne, et de renforcer la vision globale de la filière depuis la culture, la transformation et la valorisation des différents co-produits. C'est dans ce cadre que s'inscrit cette thèse qui en s'appuyant sur la collaboration du LCA et de

Pharmadev s'est intéressée plus particulièrement aux deux premiers points du projet NewCocagne et s'articule ainsi sur deux axes principaux :

- la compréhension des mécanismes réactionnels impliquant les précurseurs de l'indigo, stabilisation, isolement et quantification des précurseurs dans les feuilles de Pastel,
- et l'optimisation du modèle de production, depuis la récolte jusqu'à l'obtention du pigment solide, par le biais de plans d'expérience.

La première partie de cette thèse abordera l'état de l'art autour d'*Isatis tinctoria*, comprenant le métabolisme des précurseurs de l'indigo jusqu'à leur conversion en pigment. Une recontextualisation du sujet sera proposée au travers de la confrontation des anciens procédés de production avec les procédés plus modernes.

Le deuxième chapitre sera ensuite consacré à l'étude des précurseurs de l'indigo chez *Isatis tinctoria*. Un travail de déréplication du contenu chimique du Pastel par chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse haute résolution (UHPLC-HRMS) a été réalisé afin de détecter les précurseurs pour pouvoir (i) réaliser un suivi de ces derniers au fil des saisons et (ii) étudier leur réactivité en conditions de production, en milieu complexe ou isolés.

La troisième partie présentera le procédé de production du pigment utilisé au LCA ainsi que les plans d'expérience élaborés pour optimiser certaines étapes clés menant à l'obtention de l'indigo. A l'issu de cette partie, la mise en commun des résultats des plans d'expérience sera confirmée dans une production à grande échelle. Enfin, la conclusion de ce chapitre proposera une mise en commun des analyses de précurseurs et de la production de pigments sur les trois ans.

Enfin, une synthèse globale mettra en avant les connaissances acquises au cours de ces travaux, ainsi que les perspectives qui en découlent, notamment pour le développement de la filière du Pastel.

Chapitre 1 – Synthèse bibliographique

Ce travail de synthèse bibliographique a été publié en 2022 sous la forme d'une review dans le journal Dyes and Pigments : Julia Mocquard, Anne-Cécile Le Lamer, Paul-Louis Fabre, Céline Mathieu, Clément Chastrette, Adrien Vitrai, et Virginie Vandenbossche. Indigo dyeing from *Isatis tinctoria* L.: from medieval to modern use. Dyes and Pigments 2022, 207, 110675. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110675 [1].

1.1. Historique du pigment indigo

Depuis l'Antiquité, les pigments naturels ont été employés par de nombreuses civilisations, que ce soit pour la peinture, la médecine traditionnelle ou la teinture. Parmi ces colorants, l'indigo est l'un des pigments de teinture les plus anciens et les plus utilisés dans l'histoire [2]. Ce pigment originaire d'Inde a été retrouvé dans diverses civilisations anciennes, notamment dans des sites funéraires égyptiens, précolombiens, péruviens et chinois [3–5]. Selon son usage dans l'art ou la teinture, l'indigo pouvait être mélangé ou dilué pour donner différentes teintes allant du bleu au violet [6]. Il est possible de détecter et d'identifier ce pigment teintant des textiles anciens par spectrométrie de masse [7], voire de remonter à la source de l'indigo [8,9].

La source de l'indigo utilisé dépend du lieu où il est produit. Dans la plupart des cas, l'indigo est obtenu à partir de plantes, et les genres les plus représentés sont *Indigofera*, *Persicaria* et *Isatis*. Le genre *Isatis* est principalement présent en Europe et en Asie alors que les genres *Indigofera* et *Persicaria* sont largement distribués en Asie et en Amérique du Sud. Parmi le genre *Isatis*, *Isatis tinctoria* L., ou Pastel des teinturiers, a longtemps été cultivé pour l'exploitation du pigment indigo. Cette plante issue d'Asie centrale est actuellement présente dans les régions tempérées comme l'Amérique du Nord et l'Europe, et cultivée dans différentes régions en France, dont la Picardie et l'Occitanie [10]. En Asie, *Isatis tinctoria* est également cultivée, sous le nom de Pastel chinois, ou *Isatis indigotica* Fortune ex Lindl. A ce jour, ces deux noms font références à deux espèces distinctes dans toutes les publications référencées, et certains auteurs précisent encore récemment que ce sont bien deux espèces différentes [11]. Cependant, d'après les sites « The World Flora Online» et « Tropicos », *Isatis indigotica* Fortune ex Lindl. est considéré comme un synonyme d'*Isatis tinctoria* L. [12,13]. Le site « Plants of World Online » du Kew Garden, indique quant à lui qu'*Isatis indigotica* serait un synonyme

d’une variété d’*Isatis tinctoria* (*Isatis tinctoria* var. tinctoria). Le débat n’est donc toujours pas clos.

Contrairement à de nombreux colorants naturels, tels que les quinones, les caroténoïdes et les flavonoïdes [14], le pigment indigo n'est pas un métabolite directement produit par une plante indigogène. Il s'agit d'un produit de dégradation, résultant de l'hydrolyse de précurseurs indoxyliques glycosylés. Les trois précurseurs de l’indigo à ce jour identifiés sont l'indican, l'isatan A et l'isatan B. Ces précurseurs, restent accumulés dans les feuilles et peuvent être libérés lorsque la plante est endommagée ou écrasée. Au contact de certaines enzymes et de l'air, ils sont hydrolysés en noyaux indoxyles qui peuvent se dimériser pour former l'indigo [15].

Il existe également de nombreux autres métabolites spécialisés intéressants qui ont été décrits en 2020 dans la revue de Speranza et al. [10]. *Isatis tinctoria* possède une grande variété de glucosinolates qui participent à la protection de la plante contre les prédateurs [16]. L'un des principaux glucosinolates est la glucobrassicine, qui est présente dans de nombreuses autres espèces de la famille des Brassicaceae. Lorsque la feuille est endommagée, les cellules lysées libèrent des myrosinases qui hydrolysent les glucosinolates en espèces réactives, comme l'isothiocyanate [17]. Les feuilles sont également une source importante de composés phénoliques, tels que des acides phénoliques et des flavonoïdes. Dans une moindre mesure, les feuilles métabolisent également des terpènes et des caroténoïdes [18].

Le contenu chimique d'*Isatis tinctoria* représente un intérêt biologique et cosmétique en plus de sa production de pigments. Les pigments (*Indigo naturalis*) et les racines (*Isatis radix*) sont employés dans la pharmacopée traditionnelle chinoise pour le traitement des troubles gastro-intestinaux, des maladies de la peau ou de l'asthme [19]. En cosmétique, les graines et les racines de Pastel sont intégrées dans la formulation de savons, d’huiles et des crèmes [20].

Malheureusement, la culture du Pastel pour sa production d'indigo a progressivement disparu en Europe à partir du 16ème siècle, au profit de l'*Indigofera tinctoria* tropical moins couteux. La culture de l’indigo tropical offrait en effet un meilleur rendement et un pigment plus riche en indigo [21]. Au XIXe siècle, la découverte de la synthèse de l'indigo a permis d'obtenir plus rapidement des pigments indigo à partir de réactifs peu coûteux. Avec la demande mondiale croissante en pigments, notamment pour la teinture des blue-jeans, la production d'indigo synthétique a augmenté, passant

de 1 000 tonnes par an, au début du XIXe siècle, à 70 000 tonnes par an au XXIe siècle [22]. De plus, la modernisation des procédés de teinture a fait disparaître les traditionnelles cuves de fermentation au profit de l'utilisation d'agents réducteurs puissants, tels que les sels de dithionite [23]. Cependant, l'utilisation de sels réducteurs est soupçonnée d'être à l'origine de divers problèmes de santé, notamment via la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans l'organisme. En 2021, Das et al. ont démontré que les ROS produites par les sels de dithionite pouvaient avoir un effet neurotoxique [24] et en 2022, Mohammadi et al. ont découvert que le dithionite de sodium pouvait endommager les tissus cardiaques des souris [25].

L'intérêt croissant pour une production respectueuse de l'environnement, incluant la diminution de l'utilisation de produits issus de l'industrie pétrochimiques, la réduction des émissions de sous-produits toxiques et la limitation de leur relargage dans l'environnement, a contribué au renouveau de l'indigo naturel issu des plantes tinctoriales. De nouvelles méthodes d'extraction des précurseurs de l'indigo ont donc été développées afin d'améliorer à la fois le rendement en pigments et la qualité de l'indigo. De plus, de nouveaux procédés de teinture limitant l'usage d'agents réducteurs toxiques ont été décrits. Ils sont soit basés sur des méthodes électrochimiques, soit basés sur des méthodes biologiques, inspirées des cuves anciennes [15,26].

1.2. La molécule d'indigo

1.2.1. Propriétés et réactivité

L'indigo (2-(1,3-dihydro-3-oxo-2*H*-indol-2-ylidène)-1,2-dihydro-3*H*-indol-3-one) a de nombreux noms et synonymes, tels que indigotine, *trans*-indigo et diindogene [27]. Structurellement, l'indigo est un dimère de deux unités indoxyle reliées par une liaison carbone-carbone *trans*-insaturée. À l'état solide, le pigment amorphe absorbe des longueurs d'onde dans le domaine visible, avec un maximum d'absorption à 650 nm. Il présente une teinte bleu foncé caractéristique, due à la « conjugaison croisée » des groupes carboxyle (accepteurs d'électron) et amine (donneurs d'électron) à travers le pont éthylène [28]. De plus, les liaisons hydrogène intramoléculaires entre les groupes carboxyle et amine confèrent une grande stabilité à cette molécule, comme le montre la Figure 1 [29].

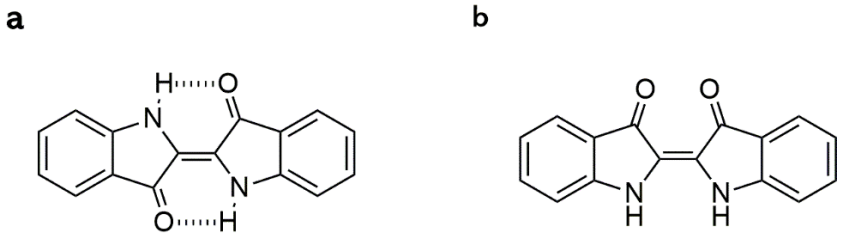


Figure 1 - Structure de la molécule d'indigo dans les configurations (a) *trans* et (b) *cis*

L'isomère *cis* de l'indigo (Figure 1) n'a jamais été isolé de sources naturelles. En raison de la configuration désavantageuse des carbonyles en position *cis*, cet isomère est considéré comme instable [30]. Il est tout de même formé dans une proportion mineure au cours de la synthèse de l'indigo et est principalement utilisé comme interrupteur moléculaire [31].

L'indigo est peu soluble voire insoluble dans la plupart des solvants, quelle que soit leur polarité, y compris l'eau. Néanmoins, les études analytiques sur l'indigo se sont appuyées sur une sélection restreinte de solvants. Les solvants testés ont été soit des solvants apolaires, comme le chloroforme, soit des solvants polaires aprotiques, comme l'acétate d'éthyle, le diméthylsulfoxyde, le diméthylformamide, la pyridine ou la *N*-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) [32–34]. Ces solvants, pour la plupart toxiques, induisent la formation d'agrégats d'indigo, ou dégradent la molécule au fil du temps, à moins d'ajouter d'un stabilisateur. En effet, comme rapporté par Johnson et al. en 2009, la nature hydrophobe de l'indigo conduit à la formation d'agrégats de moins de 1 µm de diamètre en solution aqueuse, et cette agrégation est renforcée en solution saline [35]. En 2003, Novotna et al. ont observé la dégradation de l'indigo naturel en isatine et en anhydride isatoïque après 21 jours dans des solutions de dichlorométhane [36,37]. En 2004, Green et al. ont solubilisé entièrement l'indigo dans la NMP. Cependant, ils ont observé la dégradation de l'indigo en quelques jours [38]. Toujours en 2004, Garcias-Macias et al. ont ajouté un antioxydant, l'hydroxytoluène butylé (BHT), aux solutions de NMP, ce qui a empêché la dégradation de l'indigo [39].

Les procédés de teinture décrivent que l'indigo doit être réduit pour devenir soluble dans l'eau. Cette réduction était employée dans les anciennes cuves de teinture et est toujours utilisée dans les cuves de teinture modernes. Elle sera décrite dans le chapitre 1.4.

1.2.2 Sources

L'indigo naturel est la plus ancienne source de pigment bleu utilisé dans le monde. L'introduction de l'indigo synthétique à la fin du XIXe siècle a entraîné le déclin du commerce de l'indigo naturel, qui a presque totalement disparu. Le regain d'intérêt pour la production durables de pigments indigo à partir de sources naturelles a conduit à la renaissance de la production d'indigo d'origine végétale et à l'émergence de la production d'origine bactérienne [40].

1.2.2.1 Production d'indigo à partir de plantes

Historiquement, l'indigo était produit à partir de plantes appartenant aux genres *Indigofera*, *Persicaria* et *Isatis*. L'espèce la plus largement cultivée était *Indigofera tinctoria* Mill. Produite en Inde à partir du XVIe siècle, elle s'est progressivement répandue à travers la Méditerranée vers le sud de l'Europe et l'Afrique du Nord, puis vers l'Amérique centrale et les Antilles [41]. En Asie orientale, et particulièrement au Japon, *Persicaria tinctoria* (Aiton) H. Gross (ex. *Polygonum tinctorium* Aiton), également connue sous le nom de renouée des teinturiers, était cultivée. Enfin, *Isatis indigotica*, le Pastel chinois, et *Isatis tinctoria*, le Pastel des teinturiers, étaient cultivés respectivement en Chine [42] et en Europe [43].

La production d'indigo à partir de ces plantes est basée sur la conversion de précurseurs indigogènes. Avant la découverte des précurseurs de l'indigo, il était admis que l'indigo existait sous forme réduite dans les plantes tinctoriales et que l'oxygène le transformait en indigo bleu lors de son extraction [44]. En 1855, l'indican ou indoxyl-*β*-D-glucoside (Figure 2), a été le premier précurseur détecté à partir *d'Isatis tinctoria* par Schunck [45]. En 1898, Marchlewski et al. ont proposé la formule moléculaire $C_{14}H_{17}NO_6$ pour l'indican, et ont démontré que la molécule pouvait être hydrolysée en indoxyle et glucose. La structure de l'indican a été déterminée par Hoogerwerff, en 1899, ainsi que la forme β du glucoside [46,47]. L'hydrolyse des précurseurs de l'indigo lors du broyage des feuilles ou de leur extraction en milieu aqueux entraîne la libération d'unités indoxyle, qui se dimérisent ensuite sous conditions atmosphériques pour donner l'indigo comme le montre la Figure 2 [48]. Toutefois, un isomère de l'indigo, l'indirubine, peut être formé en proportions variables selon les conditions de production. Cette molécule rouge sous sa forme solide constitue une impureté dans le pigment final. Sa formation semble entre autre favorisée par un environnement riche en oxygène [49].

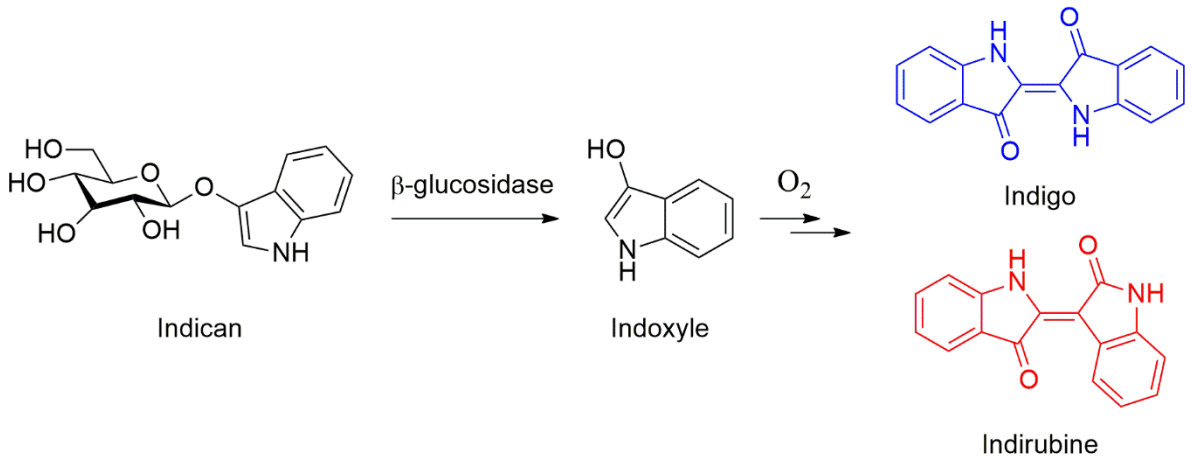


Figure 2 - Réactions impliquant l'indican pour la formation de l'indigo

1.2.2.2 Production d'indigo synthétique

A partir de la fin du 19ème siècle, la production à l'échelle industrielle de l'indigo s'est tournée vers la synthèse organique. La première synthèse de l'indigo a été développée par von Baeyer en 1878 à partir de l'isatine, mais s'est avérée trop coûteuse pour une production industrielle. En 1882, la synthèse Bayer-Drewson a été mise au point par la condensation aldolique du 2-nitrobenzaldéhyde avec l'acétone. La synthèse a ensuite été développée pour la production industrielle grâce aux synthèses de Heumann en utilisant l'aniline et l'acide chloroacétique comme matières premières, fournissant de meilleurs rendements que la synthèse de von Baeyer. Une nouvelle voie de synthèse a été adaptée par Pfleger en 1901, en utilisant l'amidure de sodium pour induire la cyclisation de la *N*-phénylglycine à plus basse température (Figure 3) [50]. Aujourd'hui, la réaction de Heumann-Pfleger est toujours utilisée pour la production industrielle d'indigo synthétique.

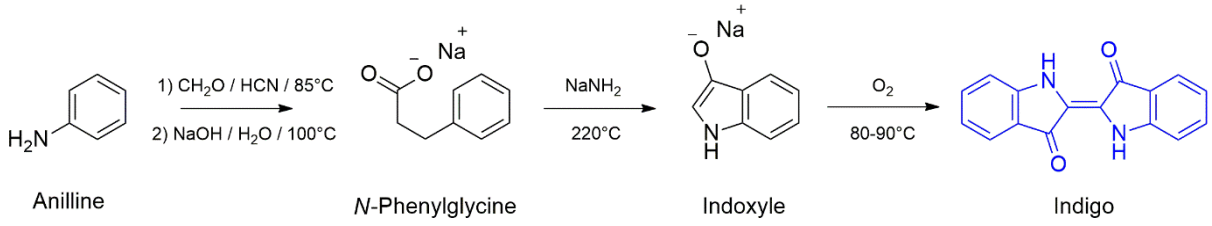


Figure 3 - Synthèse de l'indigo de Heumann-Pfleger (1901) (adapté de Schmidt [42] et Cordin et al. [43])

La demande en pigment augmente d'année en année, tout comme la quantité de déchets chimiques générés, tels que les précurseurs toxiques, les sous-produits et les bases fortes nécessaires au processus [51]. De nouvelles méthodes alternatives pour la production d'indigo ont été développées afin de réduire l'impact écologique de sa fabrication. Dans ce contexte, l'émergence des procédés biotechnologiques a permis de produire de l'indigo par fermentation bactérienne.

1.2.2.3 La production enzymatique d'indigo

La première publication faisant état d'un microorganisme capable de produire de l'indigo est celle de Gray en 1928 [52]. La bactérie qui y est mentionnée est *Pseudomonas indoloxidans*, issue du sol, et a été étudiée pour sa capacité à convertir l'indole en indoxyle et ensuite en indigo, par l'expression d'un naphtalène dioxygénase (NDO) (Figure 4). Depuis, de nombreux travaux ont été entrepris pour produire de l'indigo à partir de souches d'*Escherichia coli* recombinantes. Trois revues, Han et al. 2008, Park et al. 2020 et Fabara et Fraaije 2020, ont résumé les avancées dans l'utilisation de la biotechnologie pour la production d'indigo [53–55].

Pour la plupart des études, des bactéries *E. coli* recombinantes ont été principalement utilisées et deux types d'oxygénases ont été étudiés : les monooxygénases et les dioxygénases. Les voies de réaction de ces deux types d'enzymes sont présentées dans la figure 4. Les dioxygénases catalysent l'oxydation de deux sites d'un substrat en consommant une molécule de dioxygène. Parmi cette catégorie d'enzymes, la NDO a été largement étudiée pour la bioproduction de l'indigo. En 2014, Zhang et al ont obtenu 0,2 g/L d'indigo, ce qui constitue le rendement maximal obtenu par la NDO jusqu'à présent [56].

D'autres dioxygénases ont été étudiées, produisant des rendements en indigo plus faibles, inférieurs à 0,1 g/L [57]. Le principal inconvénient de l'utilisation des dioxygénases est la formation d'indirubine, qui peut dériver du *cis*-indole-2,3-dihydrodiol (Figure 4) [58], et la faible activité du système NDO qui conduit à de faibles concentrations d'indigo [59].

Les monooxygénases, qui incorporent un seul atome d'oxygène sur un substrat, représentent une classe d'oxygénases intégrant de nombreuses sous-classes enzymatiques, telles que les monooxygénases contenant de la flavine (FMOs) [60], la phénol hydroxylase [61], la xylène oxydase [62], l'indole oxygénase [63] et la monooxygénase du cytochrome P450 (CYP) [64].

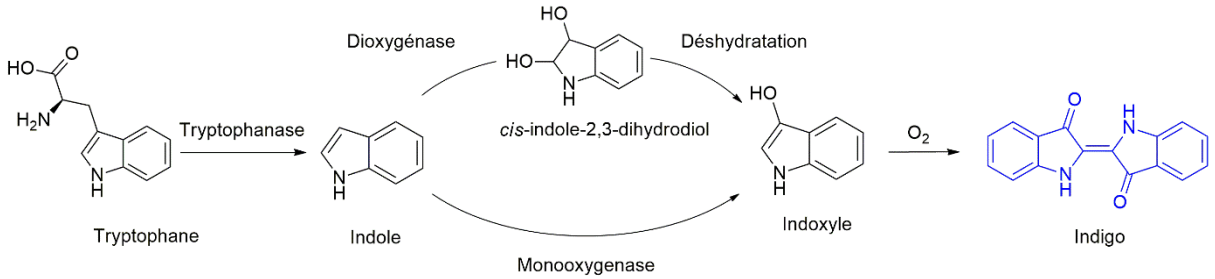


Figure 4 - Biosynthèse de l'indigo à partir du tryptophane chez les bactéries via une mono ou une dioxygénase en indigo

Les rendements en indigo produit par chaque classe d'enzymes peuvent être très variables. Par exemple, la styrène monooxygénase n'a donné que 0,05 g/L d'indigo [65] et l'indole monooxygénase a donné 0,03 g/L d'indigo [63]. Les concentrations en indigo les plus élevées ont été obtenues par la FMO, avec 1,4 g/L d'indigo [66], et par la CYP avec 3,8 g/L d'indigo [64], ce qui constitue le rendement le plus élevé à ce jour. Ces différences de rendement peuvent être expliquées par plusieurs paramètres, notamment l'utilisation de différents précurseurs lors de la culture bactérienne. Par exemple, Han et al. en 2011 ont estimé que 97% du tryptophane fourni était consommé, mais que seulement 47% étaient convertis en indigo [67]. Cependant, bien que l'indole ait un meilleur taux de conversion que le tryptophane [68], il est toxique pour *E. coli* à des concentrations élevées [69], ce qui limite son utilisation comme précurseur de l'indigo en biotechnologie.

La production d'indigo à partir de bactéries permet d'obtenir des rendements intéressants, de l'ordre de quelques grammes par litre de milieu de culture. Néanmoins, le passage à l'échelle industrielle reste à ce jour trop compliqué et coûteux [70]. Compte tenu des difficultés rencontrées au cours des production synthétique et biotechnologique de l'indigo, l'optimisation de la production d'indigo à partir de matériel végétal reste une alternative intéressante, notamment à partir du Pastel des teinturiers, *Isatis tinctoria*.

1.3. *Isatis tinctoria* L.

1.3.1 Description botanique

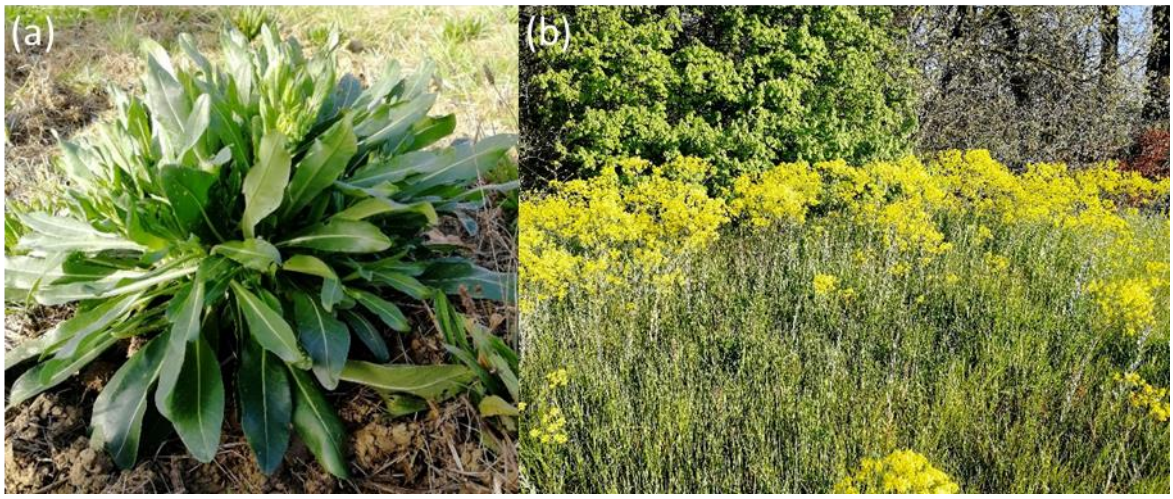


Figure 5 - Rosette de jeunes feuilles de Pastel (a) ; Pastel fleuri de deuxième année (b) cultivé à Labège, près de Toulouse (France)

L'indigo peut être produit à partir de diverses plantes des zones tropicales, subtropicales et tempérées, ainsi que de familles, genres et espèces éloignés [71]. Parmi ces plantes, *Isatis tinctoria*, communément appelée Pastel, fait partie de la famille des Brassicaceae, de la Tribu des Isatidae et du genre *Isatis* [72]. *Isatis candolleana* Boiss. ou *Isatis corymbosea* Boiss. sont d'autres plantes du genre *Isatis* décrites pour leur production d'indigo, bien que moins cultivées comparé au Pastel [73].

Isatis tinctoria est une plante à fleurs bisannuelle, qui peut atteindre 120 cm de hauteur dans sa deuxième année, avec de petites fleurs jaunes rassemblées dans une inflorescence racémeuse (Figure 5 (b)). Les fruits sont des siliques pendantes brun foncé, d'environ 12 à 15 mm de longueur, contenant des graines brunes ailées de seulement 2 à 4 mm de longueur. Avant la floraison, les feuilles de Pastel poussent en rosettes (Figure 5 (a)) ; les feuilles sont vert mat et peuvent être velues ou glabres, il existe en effet une grande variabilité phénotypique des feuilles de Pastel [74].

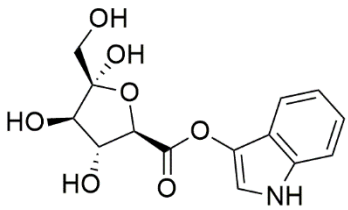
Le Pastel des teinturiers est considéré comme une plante rustique, résistante au stress hydrique, et capable de pousser dans des environnements pauvres en nutriments, sans nécessiter un apport élevé en azote ou en eau [75]. Néanmoins, les conditions de culture peuvent affecter la production du pigment par l'accumulation de métabolites spécialisés, dont les précurseurs de l'indigo [76].

1.3.2 Précurseurs de l'indigo d'*Isatis tinctoria*

1.3.2.1 Structures

Comme décrit précédemment, l'indigo n'est pas synthétisé par la plante elle-même mais résulte de l'hydrolyse de précurseurs présents dans la feuille. Alors que l'indican est le seul précurseur décrit dans plusieurs plantes productrices d'indigo, deux autres précurseurs, l'isatan A et l'isatan B, sont les principaux précurseurs isolés des feuilles d'*Isatis tinctoria*.

Historiquement, Schunck fut le premier à mettre en évidence la présence d'un précurseur spécifique du Pastel qu'il a appelé « α-indican » en 1900 [77]. La même année, Beijerinck confirma la spécificité de ce précurseur de l'indigo du Pastel et propose le nom d'« isatan » [78]. En 1967, Epstein et al. ont identifié l'« isatan » comme un indoxyl-5-cétogluconate correspondant à la formule brute $C_{14}H_{15}NO_7$ avec un poids moléculaire (PM) de 309 g/mol (Figure 6) [79]. De plus, ils ont recommandé de modifier le nom « isatan » en « isatan B » afin d'éviter tout risque de confusion puisque le terme « isatane » était déjà utilisé pour un autre composé.



$C_{14}H_{15}NO_7$
PM = 309,08 g/mol

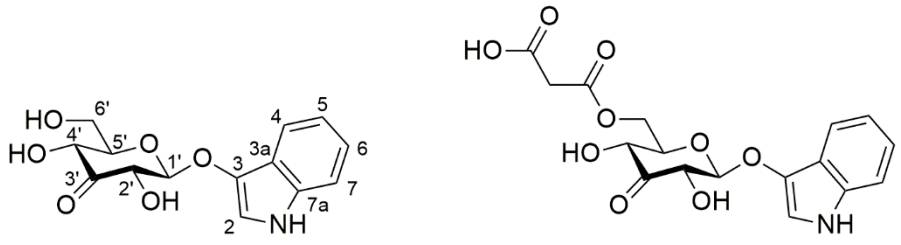
Figure 6 - Structure proposée de l'isatan B par Epstein et al. en 1967 [75]

En 1989, Strobel et Gröger ont mis en évidence dans les feuilles de Pastel à la fois la présence d'indican et d'isatan B. Ils ont été les premiers à publier des données de spectrométrie de masse, notamment celles d'un dérivé tri-acétylé de l'isatan B de PM 435 (*m/z* = 434 $[M-H]^-$ en mode négatif d'ionisation) [80]. A partir de l'analyse HPLC-MS de feuilles de Pastel, Gilbert et Cooke en 2000 [81] et Maugard et al. en 2001 [82] ont observé respectivement un ion à *m/z* = 308 en mode négatif et un ion à *m/z* = 310 en mode positif, qu'ils ont attribués à l'isatan B (Figure 7).

Plus tard en 2004, par HPLC-MS, Gilbert et al. ont observé la présence de trois pics, qui différaient de leur analyse précédente, avec les masses moléculaires suivantes : 295, 293 et 379 g/mol [83]. Sur la base de leurs données MS/MS, ils ont suggéré que ces trois molécules étaient des précurseurs potentiels de l'indigo puisqu'ils présentaient un ion fragment de *m/z* 134 en mode d'ionisation positif, ce qui correspond à un fragment indoxyle. Ils ont conclu que le composé ayant un PM de 295 correspondait à l'indican par comparaison avec un témoin d'indican. De façon surprenante, ils ont attribué les deux autres pics (PM = 293 et PM = 379) au même composé, à savoir l'isatan B, bien que l'isatan B ait été décrit jusqu'alors avec un PM de 309 g/mol.

La même année, Oberthür et al. ont isolé et différencié deux précurseurs de l'indigo présentant des PM de 293 et 379. Le premier a été identifié comme étant l'isatan B sur la base de ses spectres MS (*m/z* 294 $[M+H]^+$ et *m/z* 292 $[M-H]^-$). Sur la base d'une analyse approfondie des données de RMN, ils ont démontré que le composé de PM 293 présentait une fonction cétone en C-3' sur le glucose conduisant à un fragment 3'-céto-glucose [84], lié à l'indoxyle par une liaison *O*-glycosidique au lieu d'une liaison ester. Ces observations les ont conduits à proposer une révision de la structure de l'isatan B (Figure 7), alors que leurs données MS et RMN étaient complètement différentes des données précédemment publiées. Ces différents travaux nous conduisent à proposer que l'isatan B (Figure 6) détecté par Gilbert et al. et isolé par Oberthür et al. pourrait être un composé différent de l'isatan B (Figure 7) décrit pour la première fois par Epstein et al.

En outre, ils ont isolé et entièrement caractérisé l'isatan A (*m/z* 402 $[M+Na]^+$ et *m/z* 378 $[M-H]^-$) comme un malonylester de l'isatan B sur le C-6' du glucose (Figure 7).



Isatan B
$C_{14}H_{15}NO_6$
PM = 293,0899 g/mol

Isatan A
$C_{17}H_{17}NO_9$
PM = 379,0903 g/mol

Figure 7 - Structures de l'isatan B et de l'isatan A (adapté de Oberthür et al., 2004 [80])

1.3.2.2. Biogenèse

Parmi les trois précurseurs reconnus de l'indigo, seules les biosynthèses de l'indican et de l'isatan B de PM 309 (fig 6) ont été étudiées. Il a été supposé que la voie de biosynthèse serait similaire pour ces deux précurseurs, étant donné que l'indole semble être un facteur clé pour leur production [85]. Il est établi que l'origine de la formation de l'indole passe par la voie métabolique du shikimate, avec l'indole-3-glycerol phosphate (indole-3-GP) comme précurseur métabolique de l'indole, comme le montre la figure 8 [85,86]. En 2008, Salvini et al. ont proposé l'implication d'une tryptophane synthase (TSA) pour la conversion de l'indole-3-GP en indole [87]. Toutefois, l'oxydation de l'indole en indoxyle reste inexpliquée. Milcent et al, en 2012, ont suggéré que la réaction pourrait être spontanée [88]. Cette réaction pourrait également être catalysée par une enzyme de type P450, qui existe dans de nombreux organismes [89,90].

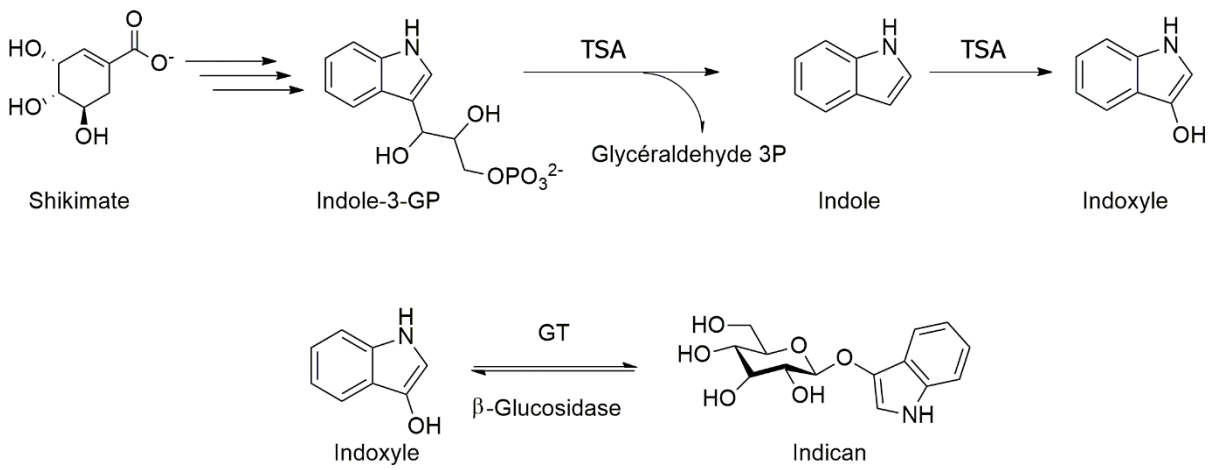


Figure 8 – Biogénèse de l'indican à partir de la voie métabolique du shikimate, suggérée par Warzecha et al., 2007 [85], et Salvini et al., 2008 [83]

Puis, selon Marcinek et al. en 2000, l'indoxyl pourrait être converti en indican par une glucosyltransferase (GT), l'indoxyl-uridine diphosphate glucose glucosyltransférase (UDP-GT), provenant de *Baphicacanthus cusia* [91]. Minami et al. ont également isolé et caractérisé une UDP-GT des feuilles de *Persicaria tinctorium* qui catalyse la glycosylation de l'indoxyle et l'ont nommée indican synthase [92]. Cette protection pourrait permettre à l'indoxyle de rester stable dans la cellule végétale et empêcher sa transformation spontanée en indigo [93].

En 2004, Oberthür et al. ont suggéré que l'isatan B était un dérivé de l'indican par l'oxydation du groupement alcool sur le carbone C-3' du glucose. Cependant, l'enzyme

potentiellement responsable de l'oxydation d'un hydroxyle sur une telle position sur un glucose n'a jamais été décrite dans le règne végétal, seulement chez certains Agaricomycètes [94]. Une hypothèse envisagée pour la biogénèse de l'isatan A suggère l'estérification de la fonction alcool sur le C-6' du glucose de l'isatan B, probablement par une enzyme de type acyltransférase, fréquemment rencontrée chez les plantes [84,95]. Une proposition de ce schéma réactionnel est présentée figure 9.

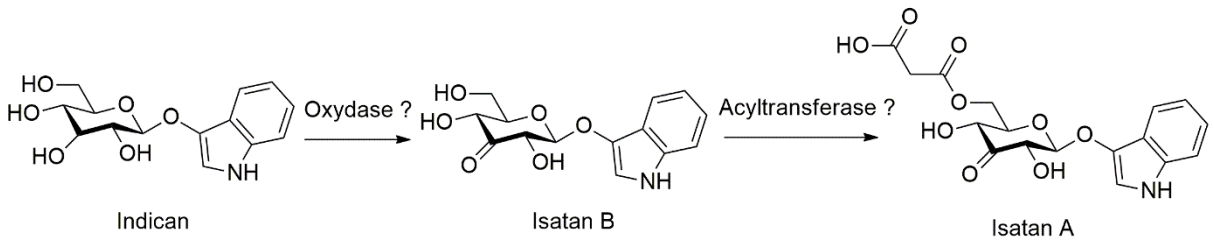


Figure 9 – Schéma de la réaction proposée de la transformation de l'indican en l'isatan B, puis à la formation de l'isatan A

Concernant les rôles de l'isatan A et de l'isatan B ou celui de l'indican dans la feuille, il a été suggéré par Inoue et al. en 2018 qu'ils pourraient être impliqués dans la défense des plantes contre les prédateurs. La formation d'indigo suite à la lyse des feuilles serait un produit difficile à digérer pour les organismes prédateurs [96].

1.3.2.3. Réactivité des précurseurs

Lorsque les feuilles sont blessées, les cellules végétales sont brisées, libérant les précurseurs dans le cytoplasme. Les précurseurs sont censés subir une hydrolyse qui libère un indoxyle libre qui va se dimériser en indigo [79].

Minami et al ont purifié une β-glucosidase [97] localisée dans les chloroplastes de *Polygonum tinctorium* [98]. Ils ont montré que cette enzyme était impliquée dans l'hydrolyse de l'indican qui était localisé dans les vacuoles des feuilles [92]. Oberthür et al. ont également suggéré que les isatans A et B étaient localisés dans les vacuoles sous une forme hydratée [84]. De plus, ils ont démontré qu'une β-glucosidase était capable d'hydrolyser l'isatan B mais pas l'isatan A. Jusqu'à présent, aucune enzyme responsable de l'hydrolyse de l'isatan A n'a été caractérisée mais il est possible d'envisager une lyse de l'ester par une estérase suivi de l'action d'une β-glucosidase.

L'indoxyle formé présente une tautomérie céto-énol, la forme cétonique étant favorisée en milieu acide, et le tautomère énolique étant favorisé en milieu alcalin. Russel et al, en 1969, ont proposé de nombreuses réactions possibles pour l'indoxyle, la plus probable étant la transition de l'indoxyle vers un radical ou une forme anionique [99]. La condensation de deux radicaux indoxyle formerait alors le leuco-indigo, réaction qui serait favorisée en milieu alcalin, comme l'ont confirmé Zelentskii et al. en 1970 [100]. Enfin, le leuco-indigo s'oxyderait en indigo en présence de dioxygène. Ces propositions sont résumées dans la figure 10.

Depuis ces travaux des années 1970, aucune étude n'a porté sur la formation de l'indigo à partir de l'indoxyle. La transition impliquant un intermédiaire radicalaire est donc admise dans la littérature [99,100].

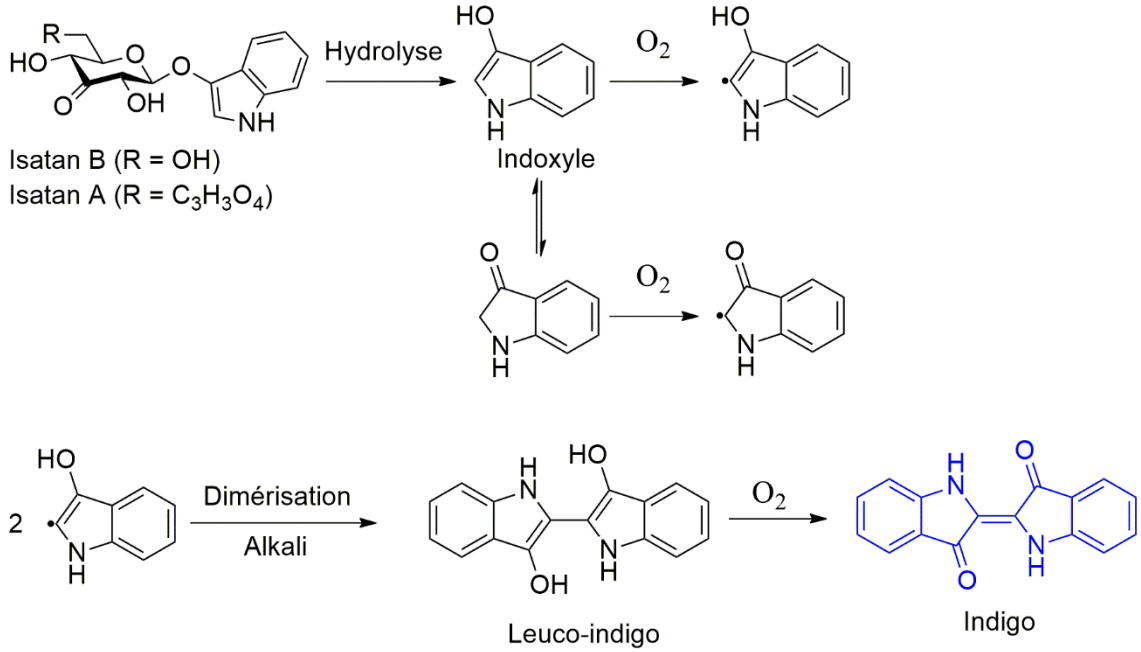


Figure 10 - Proposition de la réaction conduisant à la production d'indigo à partir des principaux précurseurs d'*Isatis tinctoria* (Isatans A et B)

La transformation des précurseurs en indigo n'est pas une réaction complète. Des réactions secondaires peuvent se produire dans la plante broyée ou dans le milieu d'extraction, conduisant à la formation de sous-produits tels que d'autres pigments indigoïdes. Par exemple, un environnement riche en oxygène favorise l'oxydation de l'indoxyle libre en isatine, qui peut ensuite réagir avec l'indoxyle, ou le dioxindole, pour donner de l'indirubine, de l'isoindirubine ou de l'isoindigo (Figure 11) [82,101].

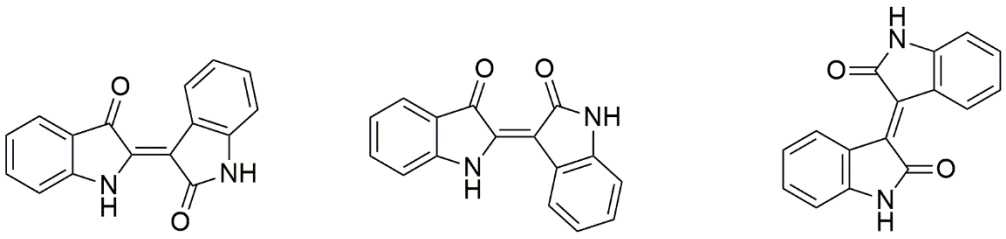


Figure 11 - Structures d'autres pigments indigoïdes

En ce qui concerne leur stabilité, les isatans A et B sont connus pour être plus stables en milieu acide qu'en milieu alcalin où ils se transforment spontanément en indigo [49]. Kokubun et al. ont observé que la concentration en isatan B diminuait dans des feuilles immergées dans l'eau bouillante ou lorsqu'elles étaient séchées [102]. Cette thermolabilité a été confirmée par Oberthür et al. en analysant des extraits de feuilles séchées à 40°C ; non seulement les isatans A et B n'étaient plus détectés, mais aucun produit de dégradation n'a été identifié [49]. Cependant, les auteurs ont observé que la concentration en tryptanthrine augmente dans les feuilles séchées, et ont suggéré un lien possible entre les isatans et cette molécule habituellement isolée des racines de Pastel [103].

Les études sur les isatans A et B ont confirmé de manière constante la grande labilité de ces molécules, liée notamment aux étapes d'extraction mais aussi aux traitements post-récolte des feuilles ou aux conditions de stockage.

1.3.2.4 Variabilité de la teneur en précurseurs

Les essais de quantification des précurseurs dans les feuilles d'*Isatis tinctoria* ont été répertoriés par John et al. en 2009, et aucune autre donnée n'a été publiée depuis [15]. Contrairement à l'indigo, les précurseurs indoliques sont solubles dans de nombreux solvants. Cependant, en raison de leur labilité, certaines méthodes indirectes ont également été développées via la conversion des précurseurs en indigo. Plusieurs dosages ont donc été mis au point pour quantifier l'indican, l'isatan B et l'isatan A à partir de feuilles de Pastel, en utilisant différentes conditions d'extraction et méthodes analytiques, notamment la spectrophotométrie [102], l'HPTLC-densitométrie [49] et l'HPLC-ELSD [76,104]. Les rapports isatan B/indican ont montré une grande variabilité, qui peut être attribuée aux méthodes d'extraction, d'analyse et/ou de quantification

choisies mais aussi au matériel végétal collecté. Néanmoins, il existe un consensus général sur la prédominance de l'isatan B sur l'indican dans le Pastel. En 2004, Oberthür et al. ont été les premiers à quantifier l'isatan A, démontrant qu'il était en fait le précurseur majoritaire de l'indigo provenant des feuilles d'*Isatis tinctoria* [49]. Toutes les autres études ont très probablement inclus l'isatan A dans la quantification de l'isatan B, ce qui a conduit à une surestimation du taux d'isatan B.

Il est également bien établi que les facteurs génétiques, environnementaux et de récolte peuvent affecter la teneur en métabolites secondaires des plantes [105]. La diversité des génotypes d'*Isatis tinctoria* a permis à la plante de s'adapter à des environnements différents et même marginaux, comme l'ont décrit Spataro et al. en 2007 [20]. Cette variabilité peut conduire à des accumulations différentes de précurseurs en fonction du phénotype exprimé. Différents génotypes d'*Isatis tinctoria* provenant de différents pays ont été analysés par Angelini et al. Leurs teneurs en indican et en isatan B ont été quantifiées et la production équivalente d'indigo a été estimée de manière stœchiométrique. Selon le génotype, *Isatis tinctoria* a produit un pigment dont la teneur calculée en indigo variait de 0,66 à 1,63 g/kg de masse de feuilles fraîches [104]. Ces auteurs ont suggéré un programme de sélection de variétés de Pastel pour améliorer le rendement en pigment, cependant aucune étude n'a été publiée depuis.

Comme mentionné précédemment, les facteurs environnementaux externes peuvent avoir un impact sur l'accumulation des précurseurs dans les feuilles. Le Pastel est connue pour être une plante robuste, avec de faibles besoins en azote et une bonne résistance à la sécheresse. En effet, en 2006, Sales et al. ont décrit qu'un environnement enrichi en azote et un apport supplémentaire en eau n'ont pas augmenté la biomasse de la plante ou la production d'indigo [106]. En revanche, les études d'Orsini et al. en 2012 ont montré que la biomasse végétale et le rendement final en pigments augmentaient avec une fertilisation enrichie en azote mais pas la concentration en indigo dans le pigment [107]. En ce qui concerne les précurseurs de l'indigo, Campeol et al. ont observé une plus grande accumulation d'isatan B dans les plantes stressées par un manque d'apport en eau, ce qui pourrait entraîner une production théorique d'indigo plus élevée, mais cela n'a pas été évalué [76].

Stoker et al, en 1998, ont étudié l'effet de la quantité et du type de lumière sur la production d'indigo par *Isatis tinctoria*, en mettant les plantes en contact avec la lumière naturelle ou artificielle. L'étude a montré que la production d'indigo augmentait sous une lumière plus intense, notamment naturelle, et pouvait donc avoir un effet sur la biogenèse

des précurseurs [108]. De plus, la plupart des auteurs ont travaillé sur des plants de Pastel récoltés en été [49,101,103], et Campeol et al. ont notamment montré que les teneurs en précurseurs et les rendements en indigo les plus élevés étaient obtenus en juin et juillet [76].

Egalement, Kokubun et al. ont observé des concentrations plus élevées d'indican et d'isatan B dans les jeunes feuilles du cœur de la rosette que dans les feuilles âgées à la périphérie de la rosette [102]. Cette accumulation dans les jeunes feuilles peut être expliquée par leur vulnérabilité pendant leur croissance [82]. La production d'indoxyles pourrait être un système de défense contre les prédateurs, comme expliqué précédemment.

Les rendements en indigo des plants cultivés sous serre étant inférieurs à ceux cultivés en plein champ, il apparait compliqué de développer une culture sous serre pour la production industrielle. Il est donc difficile de standardiser les conditions de culture et de récolte pour contrôler la quantité de précurseurs au fil des saisons [108]. Les traitements post-récolte sont également très importants, car il n'y a pas de possibilité de conservation des feuilles coupées. Comme indiqué précédemment, le séchage des feuilles entraîne inévitablement la disparition des isatans A et B dans la feuille. Il est donc obligatoire de travailler avec des feuilles fraîchement coupées et de les traiter immédiatement pour la production d'indigo [49]. Il n'existe pas non plus d'emballage durable pour conserver la fraîcheur des feuilles. Le seul moyen de conserver le matériel végétal sans altérer la qualité des pigments reste la méthode traditionnelle, basée sur le broyage des feuilles et la formation de cocagnes.

1.4. La production d'indigo à partir de méthodes médiévales et modernes

1.4.1 La production médiévale d'indigo

Les anciens traités mentionnaient la teinture directe à partir de feuilles fraîches plongées dans de l'eau chaude et laissées à fermenter, sans préciser la température ou la durée nécessaires pour la teinture. Les textiles à teindre nécessitaient plusieurs heures d'immersion dans ces cuves, et le pouvoir colorant de cette méthode de teinture était faible. Pour obtenir une couleur plus foncée sur la fibre, les teinturiers médiévaux ont développé des procédés reposant sur la teinture en cuve pour produire un pigment plus

concentré [109,110]. Ce chapitre détaillera certains des procédés utilisés principalement en France, dans les îles britanniques, en Allemagne et en Italie.

1.4.1.1. Confection des cocagnes

Des descriptions des méthodes de façonnement des cocagnes ont été rapportées dans des documents très anciens provenant de diverses civilisations, notamment les Égyptiens, les Grecs anciens et les Britanniques. Bien que le processus puisse varier en fonction de la région où le Pastel était récolté, les principales étapes consistaient à cueillir les feuilles et à les écraser pour former une pulpe qui était ensuite façonnée en boules avant d'être séchée dans un endroit aéré (Figure 12 (a)) [71,109]. Selon les documents historiques, quelques variantes du procédé sont décrites, notamment l'utilisation de feuilles flétries soit au soleil, soit dans un hangar avant d'être broyées [111].

Les étapes de broyage et de façonnage changent également selon les documents historiques. Par exemple, De Lasteyrie proposait de mouler la pâte de Pastel en forme de brique pour faciliter le séchage [111]. La complexité du processus décrit est également très variable selon les récits. Kokubun et al. en 1998 ont décrit une méthode très simple utilisée par les colons au 18ème siècle et inspirée de l'époque médiévale dans laquelle les feuilles étaient simplement écrasées immédiatement après la récolte dans un baril en bois à l’aide d’une bêche pointue, puis façonnées en boules [102]. En revanche, le procédé rapporté par Chaptal en 1823 est beaucoup plus long et plus complexe mais permettant d'obtenir un matériau de meilleure qualité [112]. Après le broyage des feuilles, le procédé inclut une phase de fermentation en tas sous un hangar. Cette étape pouvait durer jusqu'à 4 mois avant la préparation des cocagnes et leur séchage. Selon la description de Chaptal, les feuilles de Pastel étaient écrasées au moulin sous des meules cannelées, puis étalées en tas, tassées au maximum et laissées à fermenter. Les jus qui s’écoulaient servaient à réhumidifier le tas, et les fissures qui pouvaient apparaître en surface en raison de l’évaporation étaient régulièrement bouchées, afin d'éviter au maximum l'aération de la matière. Le tas pouvait être remué plusieurs fois pour pousser la fermentation au maximum. La pâte obtenue était ensuite utilisée pour former les boules, qui étaient séchées sur des claies dans un endroit bien ventilé et sec (Figure 12 (b)).



Figure 12 – Préparation d'une cocagne à partir de feuilles fraiches broyées (a) ; cocagnes séchées, produites à partir de différentes récoltes et dans différentes conditions (b) ; Photos de Hartl et al., 2015 [34]

Il apparait clairement que, lors de la préparation des cocagnes, plusieurs phénomènes physico-chimiques et biologiques sont mis en jeu. Le broyage des feuilles entraîne une lyse des cellules, mettant en contact le contenu des différents compartiments cellulaires avec l'oxygène. Lors de la première fermentation, les dommages cellulaires s'amplifient et les précurseurs sont progressivement libérés, hydrolysés par des enzymes et transformés spontanément en indigo ou autres pigments indigoïdes au contact de l'air [15]. Un récapitulatif schématique est représenté Figure 13.

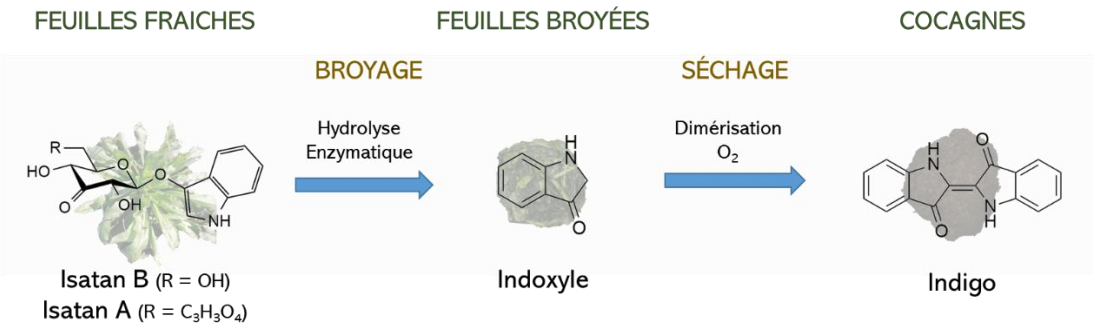


Figure 13 - Représentation schématique des réactions ayant lieu lors de la confection de cocagnes à partir de feuilles fraiches broyées

En 1998, Ewerdwalbesloh et al. ont mis en évidence la grande variété de bactéries présentes dans les cocagnes. En plus de l'hydrolyse des précurseurs par les enzymes végétales, il a été suggéré que ces microorganismes pouvaient jouer un rôle dans la conversion des précurseurs [113].

1.4.1.2. Composition des cocagnes

Le contenu d'une cocagne, préparée directement après le broyage, a été analysé par Kokubun et al. en 1998, mesurant le contenu de la surface, du centre et des couches intermédiaires de la cocagne [102]. Les teneurs en indigo et en indirubine ont atteint respectivement un maximum de 11,72 mg et 1,35 mg par gramme de cocagne sèche. Il s'est avéré que le centre de la cocagne était le plus riche, et la concentration en pigments diminuait en allant vers la couche extérieure de la cocagne. Bechtold et al. ont suggérés en 2009 que les précurseurs étaient probablement plus stables au centre de la cocagne dans un environnement acide et appauvri en oxygène, qu'à la périphérie [15]. D'autre part Kokubun a également montré que la formation d'indigo est favorisée par rapport à l'indirubine dans toutes les strates de la cocagne. Le contenu de ces cocagnes n'a pas pu être évalué précisément pour chaque précurseur avec des méthodes chromatographiques. Seule la quantification des indoxyles libres a été réalisée en utilisant de la rhodanine comme réactif quantitatif, capable de piéger les indoxyles libres. Lors des analyses des cocagnes avec cette méthode, l'isatan B n'a pas pu être détecté, menant à la conclusion que les précurseurs étaient entièrement hydrolysés à la fin de la fermentation. A l'issue des quantifications des pigments et des indoxyles libres, Kokubun

et al. en ont déduit que seulement 14% du contenu en précurseurs de la cocagne était converti en indigo [102].

En séchant pendant plusieurs semaines, l'air s'infiltrait doucement dans la cocagne. Les teinturiers pensaient que les cocagnes laissées à maturation pendant une longue période donneraient un pigment de meilleure qualité [109]. Selon Chaptal, il était possible d'utiliser les cocagnes directement pour la teinture, mais leur faible concentration en indigo donnait une teinture trop faible [112]. Pour concentrer le pigment en dégradant la matière végétale, une autre étape de fermentation était rajoutée ; cette étape appelée « Pastel couché » conduisait à la production de l'agranat.

1.4.1.3 Pastel couché : production de l'agranat

Selon Cardon en 2014, pour la préparation de l'agranat, les cocagnes séchées étaient brisées à l'aide d'un moulin ou d'un maillet en bois et réduites en poudre [109]. Au cours de cette étape, une couche de la poudre broyée était étalée sur une surface plane, d'où le terme de Pastel couché. De l'eau était ensuite ajoutée afin d'amorcer une nouvelle fermentation qui durait jusqu'à 9 semaines, en portant naturellement la température à 50 °C. En raison des vapeurs produites, il fallait ajouter régulièrement de l'eau à ce lit de granulats. Le Pastel couché était retourné régulièrement pour maintenir la température optimale, et pour que la fermentation se poursuive sans apparition de « mauvaises moisissures » [109]. Une baisse de la température indiquait que la fermentation était terminée et que l'agranat bleu formé pouvait être stocké indéfiniment [34]. Au début du XIXe siècle, Chaptal et Puymaurin expliquaient que l'agranat était un produit très riche en indigo, puisque débarrassé de toutes fibres végétales après les fermentations successives [112,114].

L'ensemble du processus de séchage des cocagnes et de couchage de la matière colorante pouvait prendre beaucoup de temps, jusqu'à 6 mois, avant d'obtenir un agranat utilisable en teinture. De plus, la qualité du pigment pouvait varier en fonction du lieu de production, du climat, de la nature du sol ou du procédé de transformation utilisé.

La confection des cocagnes et de l'agranat trop chronophage a conduit au déclin au cours du 19ème siècle de ce procédé utilisant le pastel et qui ne pouvait pas concurrencer la production d'indigo à partir d'*Indigofera*, dont le pigment était plus facile à produire, par fermentation dans des cuves, et moins cher [6,43,115].

1.4.2 Extraction et précipitation

Pour relancer la production d'indigo à partir de pastel et développer un processus durable et mieux maitrisé, des études ont été relancées au cours du 20ème siècle, basées sur l'extraction à l'eau des précurseurs de l'indigo. La première description d'un procédé moderne de production provient de Plowright en 1901. Dans cet article, Plowright décrit l'immersion de feuilles fraiches dans de l'eau chauffée à 90°C, puis en ajoutant une base pour forcer la précipitation de l'indigo [116]. Néanmoins, le pigment produit était pollué d'impuretés issues de la feuille. Le procédé fut successivement amélioré par Goodwin en 1982 [117] puis par Hill en 1992 [118], en filtrant l'extrait puis en ajoutant la base. Cependant, aucune de ces méthodes n'était transposable à l'échelle industrielle étant donné le cout énergétique qu'elles engendraient, notamment sur le chauffage de l'eau d'extraction.

La mise en place d'un procédé à l'échelle industrielle fut développée pour la première fois par Stoker et al. en 1998. Les principales étapes de ce procédé étaient les suivantes : des feuilles intactes et fraîchement récoltées étaient placées dans des cuves, et de l'eau chaude à 60°C était versée pour éliminer la cire végétale. Les feuilles étaient laissées à macérer pendant 17h, puis la température du milieu était ensuite abaissée à 38°C. De l'acide sulfurique était ajouté jusqu'à pH 3,5 qui, selon Stoker et al., stabiliserait les précurseurs et empêcherait leur formation précoce en indigo. Les feuilles étaient ensuite extraites pendant 24 h, puis l'extrait était filtré. Le liquide récupéré était aéré et basifié à pH 9-10, ce qui entrainait la précipitation des pigments. Le rendement en pigments était compris entre 0,38 g/kg et 2,1 g/kg de feuilles fraîches dans des conditions de laboratoire, et la pureté du pigment d'indigo a été estimée entre 20 et 40% d'indigo. Aucun rendement pour une extraction à grande échelle n'a été donné, mais il a été estimé que dans des conditions optimales, 20 g de pigment par kg de feuilles fraîches pouvaient être obtenus [33].

Plusieurs paramètres au cours de la culture et de l'extraction de la plante influencent la pureté du pigment final. En 2004, Garcia-Macias et John ont proposé que le radical indoxyle résultant de l'hydrolyse des précurseurs était suffisamment réactif pour interagir avec d'autres espèces chimiques présentes dans l'extrait de feuilles et pouvait donc conduire à la formation d'impuretés. Ces composés peuvent provenir de la plante

elle-même ou des particules du sol, d'où l'importance de laver les feuilles avant traitement [39].

Certains projets ont été initiés pour améliorer la production de pigment d'indigo à partir d'*Isatis tinctoria*, notamment le projet SPINDIGO (Sustainable Production of Plant-Derived Indigo) en Europe de 2000 à 2004. Le projet SPINDIGO, mené par différents pays européens dont l'Allemagne, l'Italie, l'Espagne et la Finlande, visait à étudier le Pastel pour en extraire un pigment indigo plus pur, avec de meilleurs rendements, dans le but de réintroduire la plante dans l'agriculture européenne [15]. Les études ont porté sur de nombreux paramètres de récolte, comme la date de semis ou la fertilisation des sols, ainsi que sur les méthodes d'extraction. S'il existe des publications indiquant avoir été financée par le projet SPINDIGO, il n'existe à ce jour aucun rapport sur les résultats globaux de ce projet. En 2010, le projet SARE (Sustainable Agriculture research and Education) a été mis en place aux Etats-Unis afin d'étudier la viabilité de la production locale de pigment indigo, jusqu'en 2011. Ce projet a permis des essais de production à petite échelle. Les auteurs de cette étude ont conclu qu'une sélection des plants par les agriculteurs semblait nécessaire pour diminuer la variabilité du pigment obtenu et qu'une mise à l'échelle industrielle devait être développée.

Il n'existe à ce jour aucune étude scientifique publiée depuis le projet SPINDIGO sur l'étude des précurseurs de l'indigo ou sur l'optimisation des procédés de production du pigment à l'échelle industrielle. En 2019, le projet NewCocagne, regroupant quatre laboratoires de recherche (le LCA, PharmaDev, AGIR et l'AGAP institut) et une entreprise (Terre de Pastel) a été mis en place avec pour objectif de mieux comprendre les mécanismes menant au pigment et les moyens de les favoriser. C'est dans le cadre de ce projet financé par la région Occitanie et les fonds européens FEDER que ce travail de thèse a été initié. Le chapitre 2 de ce manuscrit sera ainsi consacré à la présentation des résultats concernant l'analyse des précurseurs de l'indigo présents dans les feuilles du Pastel.

Chapitre 2 – Etude des précurseurs de l'indigo

Les feuilles d'*Isatis tinctoria* sont depuis longtemps utilisées comme source d'indigo, mais également comme plante médicinale, notamment pour ses propriétés anti-inflammatoires et anti-allergiques [18,103,119]. Inévitablement, plusieurs études ont porté sur la caractérisation des composés bioactifs des feuilles de Pastel [119–127] mais également sur les potentiels précurseurs de l'indigo depuis la découverte de l'isatan A en 2004 [76,82,84,104,104,124,128]. Ces derniers ont été mis en évidence de plusieurs manières, notamment par CCM et LC-MS, la méthode la plus informative étant l'analyse par LC-MS [49,81,83,101,128]. C'est pourquoi nous avons choisi dans ce chapitre d'identifier les précurseurs connus du Pastel, l'isatan A et l'isatan B, et d'étudier leur teneur au cours du temps et leur réactivité.

Durant tout ce chapitre, les feuilles de Pastel d'un champ situé à Labège (31) exploité par l'entreprise partenaire Terre de Pastel ont été étudiées. La première partie a été consacrée à leur étude botanique afin de décrire leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques. Dans la seconde partie, le profil chimique du Pastel a été étudié et comparé aux données disponibles dans la littérature, afin d'identifier les principaux métabolites des feuilles de Pastel utilisées dans le cadre du projet NewCocagne, et plus particulièrement les précurseurs de l'indigo. La troisième partie a porté sur le suivi de la teneur en précurseurs, après la récolte et tout au long de l'année. Enfin, la dernière partie a été consacrée à l'étude de la réactivité des précurseurs en condition de production du pigment.

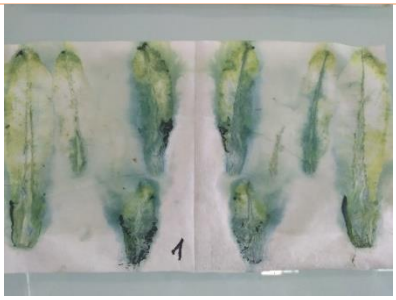
2.1 Etude botanique des feuilles de Pastel

Pour chaque étude présentée au cours de cette thèse, des feuilles de Pastel ont dû être régulièrement prélevées dans le champ mis à disposition à Labège (Haute-Garonne) par le partenaire industriel du projet, l'entreprise Terre de Pastel. Pour estimer quelles étaient les feuilles les plus adaptées pour ces travaux, et quelles parties de la feuille pouvaient être exploitables, des observations macroscopiques et microscopiques ont été effectuées.

2.1.1 Etude macroscopique de la feuille d'*Isatis tinctoria*

Lors de ces récoltes, il a été constaté que les feuilles présentaient des phénotypes variés caractérisés par des feuilles ondulées ou non, poilues ou glabres, et plus ou moins grandes. Afin d'évaluer rapidement si ces phénotypes étaient producteurs d'indigo, plusieurs exemplaires de feuilles de différents plants ont été prélevées et pressées entre deux feuilles de papiers pour faire éclater les cellules végétales et libérer les précurseurs sur le papier. Ces feuilles de papier ont ensuite été laissées sécher à l'air pour permettre l'oxydation des précurseurs en indigo (Tableau 1).

Tableau 1 – Photos de feuilles de phénotypes différents et résultats obtenus après pressages entre deux feuilles de papier (réalisé par Clément Chastrette)

Description feuille	Feuille avant mise sous presse	Feuille après mise sous presse
- Limbe à marge ondulée, base atténuée et apex obtus - Couleur verte - Feuille lisse		
- Limbe à marge ondulée, base arrondie et apex aigu - Couleur verte - Feuille lisse		
- Limbe à marge ondulée, base atténuée et d'apex obtus - Couleur verte - Feuille velue		

- Limbe à marge crénelée base atténuée et apex aigu - Couleur vert-violacé - Feuille lisse		
- Limbe à marge lisse, base atténuée et apex aigu - Couleur vert-violacé - Feuille velue		

L'observation des feuilles a montré que toutes les morphologies présentaient un potentiel de production d'indigo. Toutefois, certains phénotypes ont donné une empreinte bleue plus intense, c'est le cas des feuilles à limbe ondulé, ou à l'inverse, les feuilles violacées ont coloré plus faiblement le papier. Il a aussi été remarqué que les petites feuilles semblaient avoir une empreinte bleue plus marquée que celle les grandes feuilles.

Cette étude a permis de constater que toutes les feuilles, quel que soit leur phénotype, ont produit de l'indigo une fois pressées. Tous les types de feuilles ont donc été récoltés, à l'exception des feuilles présentant une teinte violette, bien qu'aucune production de pigment ou étude de la teneur en précurseur n'ait été réalisée à partir de ces différents phénotypes afin de confirmer ces observations. En revanche, c'est à partir de cette observation qu'une comparaison de la teneur en précurseurs des grandes et des petites feuilles a été réalisée. Elle sera présentée dans le chapitre 2.3.3.2.

2.1.2 Etude microscopique d'une coupe de feuille d'*Isatis tinctoria*

Afin d'étudier l'organisation tissulaire des feuilles de Pastel, l'examen microscopique d'une coupe transversale de feuille d'*Isatis tinctoria* a été réalisée grâce à

l'expertise d'Isabelle Fourasté (Professeure de pharmacognosie à la faculté de Pharmacie, actuellement à la retraite). En Figure 14, une coupe transversale de feuille a été colorée au réactif carmino-vert aluné de Mirande et la nervure centrale a été observée au microscope, à un grossissement x40. Sur cette photographie, on constate que la face adaxiale de la nervure centrale est plane tandis que la face abaxiale est concave. Le système conducteur de la nervure est constitué de 5 à 7 faisceaux libéro-ligneux distincts. Des faisceaux conducteurs secondaires sont également visibles dans le limbe qui est étroit. Des poils tecteurs unicellulaires, pour la plupart cassés lors de la manipulation, recouvrent la surface des épidermes inférieurs et supérieurs.

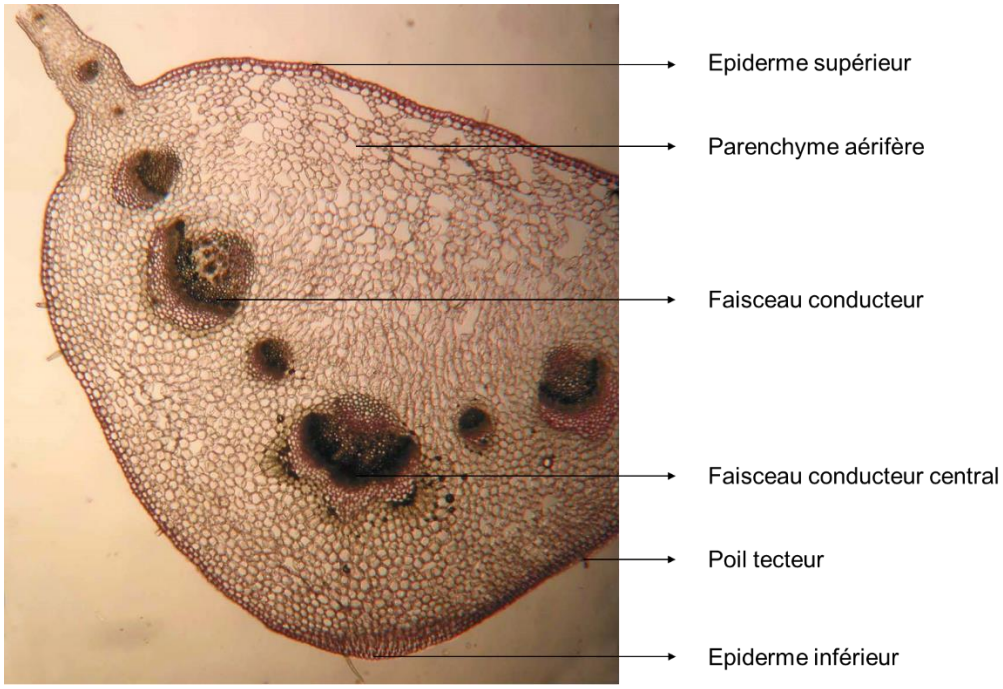


Figure 14 – Photographie de la nervure centrale d'une feuille d'*Isatis tinctoria* à partir d'une coupe transversale colorée (x400)

A partir de cette même coupe, un grossissement supérieur (x100) a été appliqué sur le faisceau conducteur central (Figure 15 (a)) et sur un fragment de limbe (Figure 15 (b)). Il est possible de que le dédoublement des cellules dans l'endoderme, prenant une couleur foncée, soient des cellules à myrosinase. En effet, ces cellules impliquées dans l'hydrolyse des glucosinolates sont habituellement localisées en périphérie du faisceau conducteur [129] (Figure 15 (a)). Enfin, sur le fragment de limbe, on a pu noter que les poils tecteurs sont unicellulaires et possèdent une paroi ponctuée.

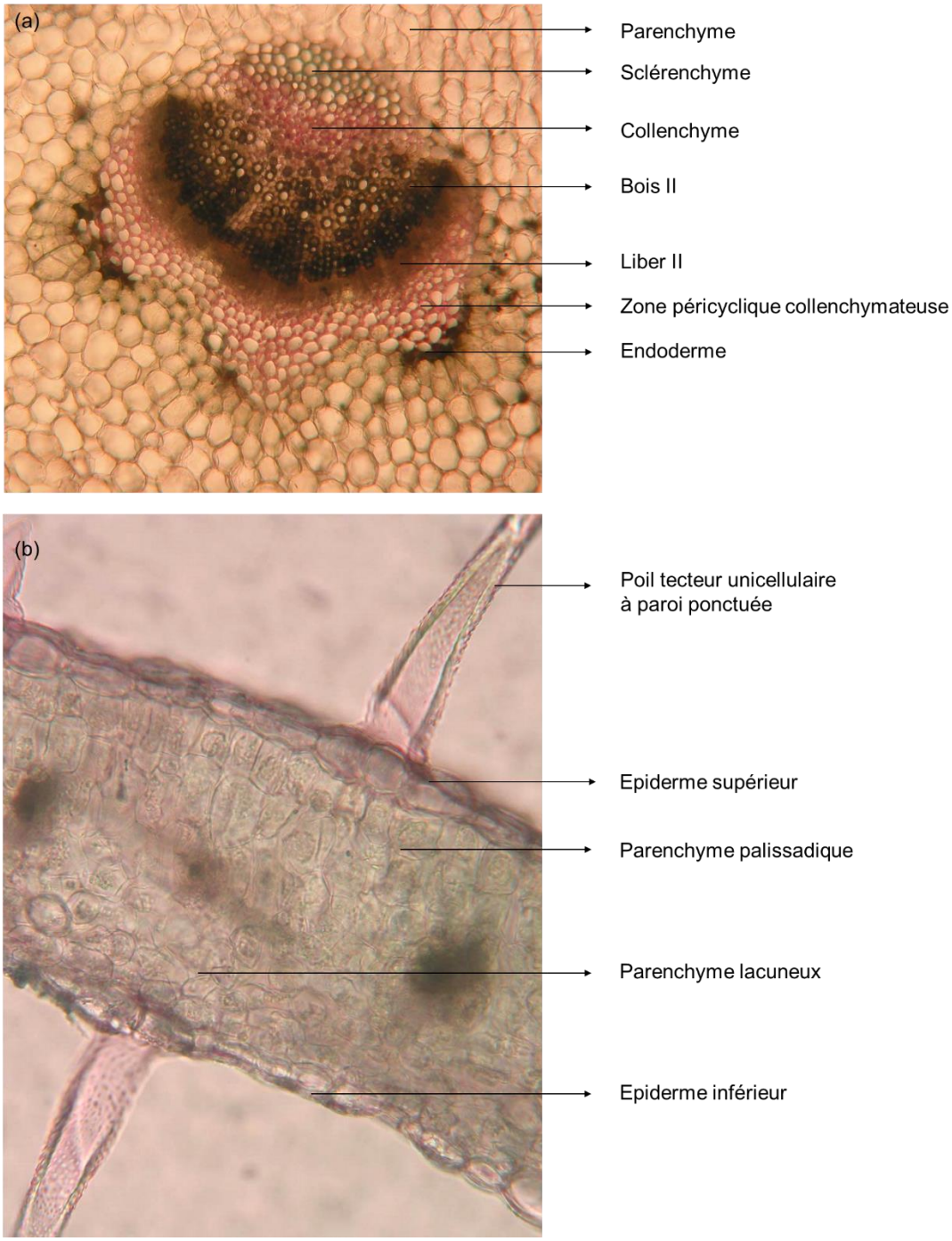


Figure 15 – Détail du faisceau conducteur central dans la nervure centrale de la feuille d'*Isatis tinctoria* (grossissement x 100) (a) ; Détail du limbe et de poils tecteurs d'une coupe de feuille d'*Isatis tinctoria* (grossissement x 100) (b)

Au cours d'une autre expérience, des coupes ont été réalisées sans coloration, pour être observées au microscope dans une matrice aqueuse (Figure 16). En quelques minutes, des cristaux d'indigo sont apparus dans le limbe, dans les poils tecteurs et autour du limbe (diffusion dans la matrice aqueuse). Cette observation suggère que la formation d'indigo est possible dans tous les tissus de la feuille, et donc que les précurseurs sont probablement localisés dans tous les tissus de la feuille. Par ailleurs, la

présence de cristaux d'indigo insolubles dans l'eau, en dehors des tissus suggère que les précurseurs ou les indoxyles ont diffusé en dehors des tissus et qu'il se sont dimérisés et oxydés spontanément en indigo.

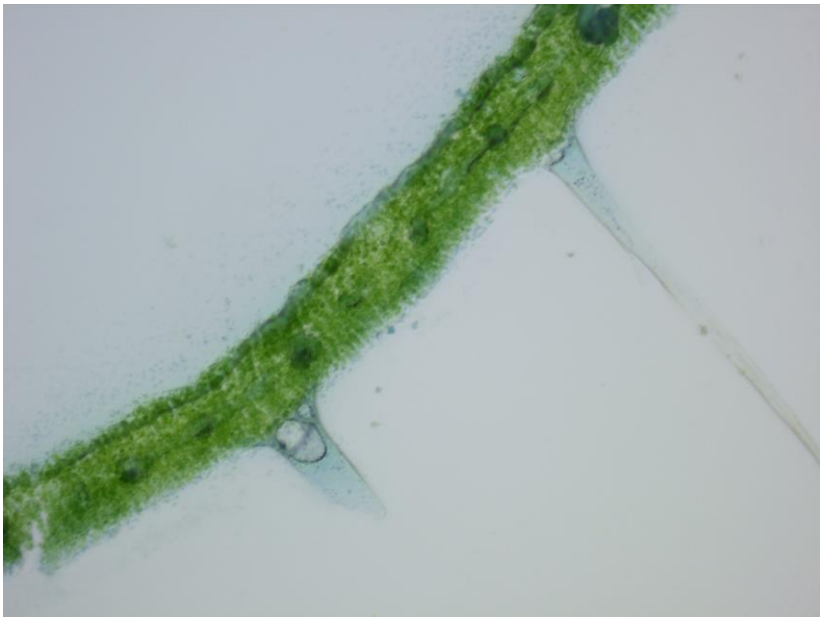


Figure 16 - Formation d'indigo sur une coupe transversale de feuille de Pastel observée au microscope dans de l'eau (grossissement x40).

L'histolocalisation des précurseurs *in situ* pour confirmer cette hypothèse a été réalisée en partenariat avec le laboratoire l'UMR AGAP Institut, à Montpellier, sous la supervision de Jean-Luc Verdeil. Une méthode de localisation par microscopie multiphotonique couplée à l'analyse spectrale a été mise au point avec un témoin d'indican afin de visualiser le noyau indolique à 405 nm. Au terme de cette expérience, le précurseur a été localisé dans tous les tissus de la feuille fraiche, dans les vacuoles des cellules.

Ces études macroscopiques et microscopiques ont permis de montrer que l'ensemble de la feuille est exploitable puisque les précurseurs ont été localisés dans tous les tissus du limbe et la formation d'indigo a pu être observé au microscope. Pour tous les chapitres suivants, tous les phénotypes de feuilles vertes de Pastel ont été prélevés, sans distinction, pour l'analyse des feuilles et pour la production d'indigo. Seules les jeunes feuilles du cœur de la rosette feront l'objet d'une étude particulière.

2.2 Déréplication d'un extrait méthanolique de feuilles fraiches de Pastel

La déréplication est une technique très répandue à l'heure actuelle afin d'identifier des composés déjà connus sans devoir les isoler au préalable. L'identification repose sur des techniques analytiques telles que la Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) ou la Spectrométrie de Masse (SM) et a permis depuis sa première utilisation de développer des bases de données en ligne pour de nombreuses molécules d'origine biologique [130].

Il existe quelques études du profil métabolique du Pastel dans la littérature. La plupart concerne l'identification de composés aux propriétés anti-inflammatoires [18,124]. Les nombreux composés dérépliqués sont des alcaloïdes (dont les précurseurs de l'indigo), des phénylpropanoïdes (comprenant des acides phénoliques, des flavonoïdes et des stilbénoïdes), des glucosinolates, des caroténoïdes et des terpènes [10].

Afin d'analyser la composition des feuilles de Pastel, la méthode employée par Oberthür et al. en 2004 a été adaptée.

2.2.1. Préparation d'un extrait méthanolique de feuilles de Pastel

Différents solvants d'extraction ont été testés, tels que le méthanol, l'eau et l'acétone. C'est le méthanol qui a montré le pouvoir extractif le plus important. Il a été également constaté qu'il y avait une dégradation rapide des précurseurs (Isatan A et Isatan B) lors des extractions à l'eau et lorsque les extraits étaient conservés à température ambiante avant l'analyse. Ce point important, qui sera détaillé dans le chapitre suivant, nous a conduit à limiter le plus possible le chauffage des extraits et donc à évaporer le méthanol sous pression réduite à température ambiante et à éliminer l'eau résiduelle extraite des feuilles fraiches par lyophilisation.

Ainsi pour réaliser l'analyse des métabolites des feuilles d'*Isatis tinctoria*, des feuilles fraiches ont été immergées dans du méthanol et broyée avec un mixeur plongeant pendant 5 minutes. Après filtration, et évaporation des solvants, l'extrait a été resolubilisé dans un mélange méthanol/eau (80/20) à la concentration de 5 mg/mL pour les analyses.

2.2.2.Analyse par UHPLC-HRMS de l'extrait méthanolique

Les extraits méthanoliques ont été analysés par Chromatographie liquide à Ultra Haute performance (UHPLC) couplée à un Spectromètre de Masse Haute Résolution (HRMS) équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ou ESI pour ElectroSpray Ionization). La séparation des composés a été réalisée sur une colonne C18. Les conditions d'élution utilisées sont décrites dans le chapitre 4.4.1. Elles ont été mises au point au laboratoire pour l'analyse de composés de petit poids moléculaires et de polarité intermédiaire. Elles offrent un bon compromis entre résolution et durée d'analyse pour le type de composés étudiés. En mode négatif d'ionisation, d'avantage d'ions et de fragments ont pu être observés sur les extraits de Pastel, ainsi c'est ce mode qui a été retenu pour l'ensemble des analyses.

2.2.2.1. Identification des précurseurs

L'analyse UHPLC-ESI(-)-HRMS d'un extrait méthanolique de feuilles fraiches de Pastel a permis d'identifier les trois principaux précurseurs du Pastel : l'indican, isatan B et isatan A (Figure 17). Ces données sont en accord avec les données issues de la littérature [84]. L'indican est élué à un temps de rétention (tR) de 3,64 min, l'isatan B à 4,09 min et l'isatan A à 4,70 min. Les pics des trois précurseurs ont tendance à trainer sur la colonne. Ceci est probablement lié à la formation d'hydrates sur les keto-glucose [131] lors de l'élution, phénomène déjà décrit par Oberthür et al. lors de leurs analyses par LC-MS [84].

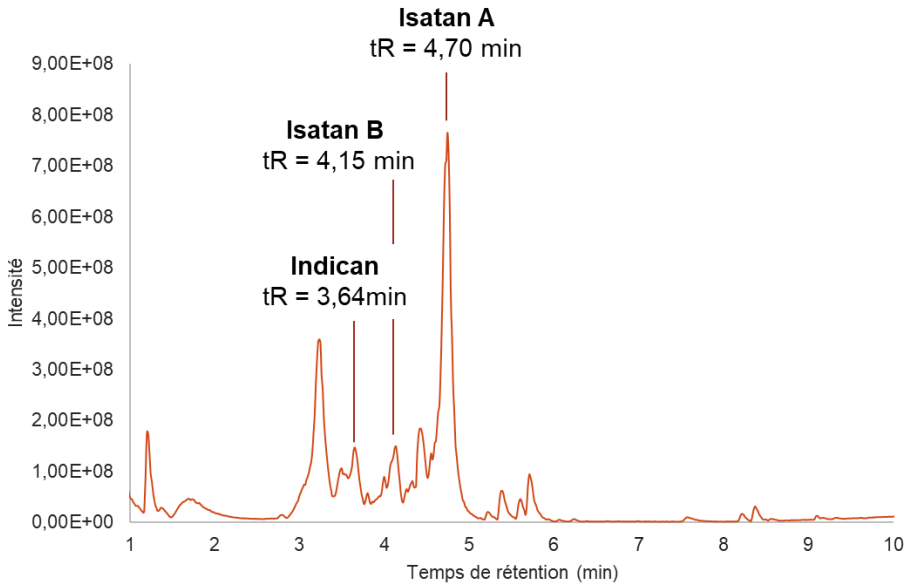


Figure 17 - Chromatogramme UHPLC-ESI(-)-HRMS d'un extrait méthanolique de Pastel, annoté des trois principaux précurseurs de l'indigo

Les trois précurseurs ont été identifiés selon leur masse exacte et leur fragmentation MS/MS (Tableau 2). Parmi les ions observés sur les spectres en Full-MS (voir annexes 1, 2 et 3), un ion correspondant au $[M-H]^-$, toujours minoritaire, ainsi qu'un adduit $[M+FA-H]^-$, toujours le plus intense, ont été identifiés à la fois pour l'indican et pour l'isatan B et ceci dans toutes les analyses réalisées en ESI en mode négatif. Pour l'isatan B, un ion pouvant correspondre à l'adduit formiate de l'isatan B hydraté a été observé (*m/z* = 356,0981).

Pour l'isatan A, en plus de l'ion $[M-H]^-$ de faible intensité, deux ions (les plus intenses) correspondant à $[M-CO_2-H]^-$ et au dimère $[2M-H]^-$ ont pu être annotés. Ce dernier est plus ou moins intense selon les extraits analysés, il est possible que son intensité soit liée à la concentration en isatan A dans l'échantillon. Pour ce précurseur, un ion pouvant correspondre à l'isatan A hydraté a également été observé (*m/z* = 396,0925), ainsi que deux ions pouvant correspondre à un dimère d'isatan A et d'isatan A hydraté (*m/z* = 757,1723) d'une part, et à un dimère d'isatan A hydraté d'autre part (*m/z* = 793,1931).

Le spectre MS/MS de l'ion déprotoné de l'indican $[M-H]^-$ présente des ions fragments issus de la coupure de la liaison *0*-glucosidique entre le glucose (*m/z* = 161) et l'indoxyle (*m/z* = 132). Cette coupure conduit également à l'observation d'un ion annoté comme étant le glucose oxydé en position C3' déprotoné (*m/z* = 159) pour l'isatan B et le glucose oxydé avec un groupement malonyl déprotoné (*m/z* = 262) pour l'isatan A. En

revanche, l'ion fragment correspondant au noyau indoxyle n'est pas observé sur les spectres MS/MS des différents ions de l'isatan A et de l'isatan B.

Tableau 2 - Récapitulatif des ions des principaux précurseurs avec leurs fragmentations respectives, obtenus à partir d'analyse d'extraits méthanoliques de feuilles fraiches de Pastel par UHPLC-(ESI -)-HRMS

Annotations	Type d'adduit	Temps de rétention (min)	*m/z* (ESI -)	Fragmentation	
				m/z	Rel Ab
Indican	$[M-H]^-$	3,64	294,0975	161,11	69%
				132,07	12%
				101,09	5%
				113,05	3%
				159,13	2%
	$[M+FA-H]^-$	3,64	340,1034	161,11	69%
				132,07	12%
				101,09	5%
				113,05	3%
				159,13	2%
Isatan B	$[M-H]^-$	4,15	292,0820		
	$[M+FA-H]^-$	4,15	338,0875	159,07	39%
				204,92	23%
				262,06	5%
				202,20	4%
				140,97	4%
	$[M+FA+H_2O-H]^-$	4,14	356,0981		
Isatan A	$[M-CO_2-H]^-$	4,65	334,0926	274,03	24%
				190,08	21%
				202,18	19%
				174,09	5%
				186,17	5%
	$[M-H]^-$	4,69	378,0825	274,03	19%
				202,15	18%
				190,07	17%
				174,08	13%
				186,00	9%
	$[M+H_2O-H]^-$	4,69	396,0925	333,88	37%
				378,15	10%
				202,08	10%
				369,18	6%
				218,16	6%
	$[2M-H]^-$	4,70	757,1723	333,82	44%
				377,89	17%
				274,06	10%
				377,20	6%
				228,11	4%
	$[M+(M+H_2O)-H]^-$	4,62	775,1819		
	$[2(M+H_2O)-H]^-$	4,53	793 ,1931		

Un composé élué à 4,35 minutes a présenté un profil similaire à celui de l'isatan A, avec deux unités de masse en plus (*m/z* = 336,1085 $[M\text{-}CO_2\text{-}H]^-$; 380,0985 $[M\text{-}H]^-$; 759,1807 $[2M\text{-}H]^-$ et 777,1980 $[2M+H_2O\text{-}H]^-$. La fragmentation de l'ion à 336 (Figure 18) et les données de la littérature [132] ont permis de proposer qu'il s'agissait probablement du malonylindican (PM 380 g/mol, $C_{17}H_{19}O_9N$), un dérivé de l'indican qui comprend un groupement malonyle estérifiant l'hydroxyle en position 6' du glucose, de la même manière que l'isatan A dérive de l'isatan B. Malgré sa grande similarité avec l'indican, l'isatan A et l'isatan B, le malonylindican n'a jamais été décrit comme un précurseur de l'indigo dans la littérature.

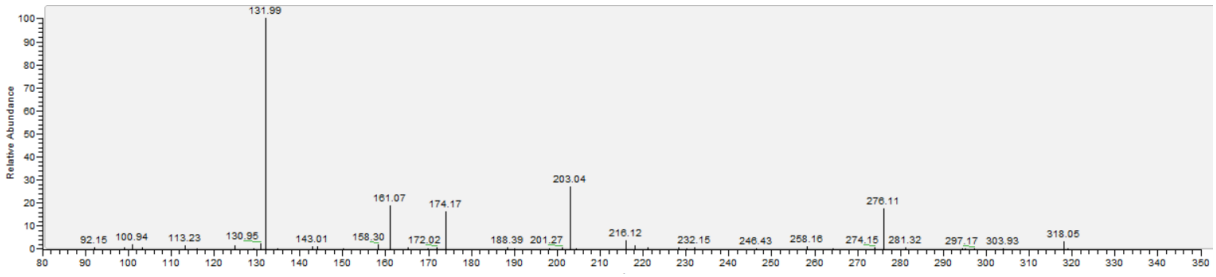


Figure 18 - Fragmentation du malonylindican (*m/z* = 336,1085, tR = 4,35 min)

En plus de ces trois précurseurs majoritaires et du malonylindican, Maugard et al. ont décrit en 2001 un autre précurseur potentiel de l'indigo qu'ils ont nommé isatan C [82]. Sur la base des données de spectrométrie de masse, les auteurs ont proposé une structure de type dioxindole pour l'isatan C, avec un PM de 395 g/mol et une formule brute de $C_{20}H_{13}O_8N$. En 2019, Nguyen et al. ont « précisé » la structure de l'isatan C qui comporterait un noyau dioxindole et une chaine malonyle sur le glucose [128]. Cependant, ils ont attribué à ce composé une formule brute ($C_{17}H_{19}O_{10}N$) et un PM (397 g/mol) qui ne correspondent pas aux données de Maugard et al. Il est donc possible qu'il ne s'agisse pas du même composé ou que les données de masse n'aient pas été correctement interprétées.

Par ailleurs, l'isatan C a été décrit dans des feuilles jeunes récoltées au mois de juin. Les analyses réalisées au cours de ce travail de thèse n'ont jamais mis en évidence l'isatan C décrit par Maugard ou Nguyen, même celles réalisées sur des feuilles jeunes et récoltées en été (voir Chapitre 2.2.3). Il peut s'agir de variation chémotypiques, mais on peut également émettre l'hypothèse que l'isatan C décrit par Maugard corresponde à l'isatan A qui est un des précurseurs majoritaires du Pastel et qui n'a été identifié qu'en 2004 [84]. En effet, Maugard et al. ont détecté en HRMS en mode positif un ion à 777 qu'ils ont attribué à un adduit sodium d'un dimère d'isatan C (PM 395) déshydraté [2(M-

$H_2O)+Na]^+$, mais qui pourrait également correspondre à un dimère d'isatan A (PM 379) hydraté et protoné $[2M+H_2O+H]^+$.

2.2.2.2. Déréplication des autres composés du Pastel

La déréplication de l'extrait MeOH de feuilles fraiches de Pastel a été réalisée en utilisant les logiciels de traitements de données de spectrométrie de masse (Xcalibur, MzMine 2, etc.) et les données de la littérature [124,128,132]. Au total, 37 composés ont pu être annotés parmi les pics les plus intenses observés (annexe 1), répartis dans six familles chimiques différentes. Les composés sans fragmentation ou sous un seuil d'intensité prédéfini n'ont pas été annotés.
Les composés annotés appartiennent aux familles précédemment citées dans le chapitre 1.1 :

- Alcaloïdes (indican, isatan A, isatan B, …)
- Acides phénoliques (acide *p*-coumaroylglucarique, acide féruloyl-glucarique, …)
- Flavonoïdes (hétérosides de l'isoscoparine, l'isovitexine, vicénine-2, …)
- Mono/oligolignols (conifférine)
- Glucosinolates (glucobrassicine, néoglucobrassicine, …)
- Caroténoïdes (dérivés d'apocaroténoïde)

De nombreux composés décrits dans la littérature n'ont pas été détectés. L'absence de certains composés peut être expliquée par le solvant utilisé pour l'extraction. Dans certaines études (notamment sur les composés bioactifs), le solvant principalement employé est le dichlorométhane, il solubilise alors essentiellement des molécules apolaires ou faiblement polaire [124,132]. En employant du méthanol, les composés extraits sont plus polaires, d'où la présence de nombreux composés phénoliques. Le mode d'extraction et les conditions d'extraction peuvent également influencer le profil chimique des extraits, comme la méthode de broyage, sa durée, la température, etc…

Un autre paramètre est le traitement des feuilles après récolte, tel que le séchage, la congélation, etc. Par exemple, la tryptanthrine est un composé bien décrit chez *Isatis tinctoria*, notamment pour ses propriétés anti-inflammatoires [119], mais dans les extraits MeOH de feuilles fraiches, cette molécule n'a jamais été mise en évidence. Cette

molécule a été observée en analysant des feuilles ayant subi un traitement post-récolte, tel qu'un séchage ou une fermentation. L'état des feuilles affecte de manière importante le profil chimique des feuilles de Pastel, avec notamment la disparition de l'isatan A et de l'isatan B, et la formation de composés tels que la tryptanthrine [103].

Cette disparité de profil chimique pourrait également provenir du lieu et des conditions de culture et de récolte du Pastel. Parmi les études déréplicatives des composés du Pastel, les extraits de feuilles provenaient de plantes cultivées dans différentes localités, comme à Dornburg (Allemagne) [124,133], à Amiens (France) [128] ou encore en Sicile (Italie) [134]. L'influence des conditions météorologiques, de la nature du sol et du mode de culture étant peu étudiée et donc non maîtrisée, il est difficile de comparer les résultats obtenus à un instant donné, à Toulouse, avec l'ensemble des données de la littérature.

Enfin, nous n'avons très certainement pas travaillé sur la même variété *d'Isatis tinctoria*. Nguyen et son équipe ont décrit le profil chimique d'une variété de pastel fournie par le jardin des plantes d'Amiens [128], alors que les semences de l'entreprise Terre de Pastel sont constituées d'un mélange de variétés de Pastel qu'ils entretiennent chaque année en conservant les graines des récoltes en cours.

Au cours de ces analyses, un protocole d'extraction des feuilles fraiches de Pastel au méthanol et à température ambiante, au cours duquel les précurseurs sont extraits et non dégradés a été mis au point.

Les précurseurs ont pu être détectés et annotés par UHPLC-HRMS ainsi que d'autres composés co-extraits tels que des glucosinolates et des acides phénoliques.

Il est désormais possible d'identifier les précurseurs présents dans les feuilles de Pastel et donc de réaliser un suivi des précurseurs en fonction du traitement post-récolte appliqué à la plante et de la période de récolte.

2.3 Analyse de la teneur relative en précurseurs

Au cours des trois années de thèse, des récoltes régulières de Pastel ont été réalisées pour produire du pigment et réaliser des analyses d'extrait de feuilles. Ces deux études, lorsqu'elles ont pu être exécutées en parallèle, ont eu pour objectif de corréler la quantité et la qualité du pigment avec la teneur en précurseurs. Pour cela, la teneur en précurseur a été évaluée sur plusieurs mois afin de tenter de déterminer la meilleure saison pour récolter les feuilles de Pastel et produire le pigment. En amont, une adaptation de la méthode analytique a dû être mise au point, notamment afin de garantir une meilleure conservation des précurseurs avant leur analyse par UHPLC-ESI-HRMS.

2.3.1 Récolte des feuilles de Pastel

Entre octobre 2019 et mars 2022, 25 récoltes ont été effectuées pour la production de pigment et 37 récoltes ont été réalisées pour l'analyse des précurseurs.

Les feuilles ont été récoltées sur un champ à Labège (Haute-Garonne, Occitanie), appartenant à la société Terre de Pastel, partenaire du projet. Etant donné qu'*Isatis tinctoria* est une plante bisannuelle, deux emplacements de récolte ont dû être établis ; les semis ont été réalisés chaque année soit dans la partie occidentale du champ (zone bleue sur la Figure 19), soit sur la partie orientale du champ (zone rouge). La zone occidentale (zone bleu) a été exploitée d'octobre 2019 à juin 2020 ainsi que de février 2021 à mars 2022, tandis que la zone orientale (zone rouge) a été exploitée de juillet 2020 à janvier 2021. Les graines employées étaient un mélange de siliques provenant de précédentes récoltes, avec également de nombreuses impuretés dans ces lots (morceaux de plantes, minéraux, etc…). Aucun semis n'a été réalisé au cours de l'hiver 2021-2022, la récolte sur le champ de Labège a donc dû s'arrêter en mars 2022. Quelques plants trouvés en bordure occidentale de la zone occidentale ont toutefois pu être prélevés pour des analyses, mais la faible biomasse n'a pas permis la production de pigments.



Figure 19 - Vue satellite du champ de Labège avec la parcelle occidentale (bleue) et la parcelle orientale (rouge) où les prélèvements de feuilles de Pastel ont été réalisés

Aucune de ces deux parcelles n'a été irriguée et la culture a été réalisée sans engrais ni pesticide. Comme expliqué au chapitre 1.3.2.4, l'irrigation ne semble pas avoir d'impact sur la qualité du pigment, ni sur son rendement, mais plutôt sur la biomasse produite. En effet, pendant les périodes les plus sèches de l'année, le Pastel ne poussait plus au centre du champ. En revanche, il a été observé que les plants se renouvelaient bien à l'extrême ouest (zone bleu clair) de la parcelle occidentale, proche d'un cours d'eau. C'est notamment à partir de ces plants qu'ont été réalisées la plupart des analyses UHPL-ESI-HRMS.

En été 2020, une intense période de sécheresse a été constatée, et comme aucun désherbage n'a pu être réalisé compte tenu de l'exceptionnelle période de confinement au printemps 2020, de nombreux adventices ont proliféré sur la parcelle habituellement exploitée. Seuls les plants de la zone orientale (zone rouge), majoritairement placés à l'ombre, ont pu survivre à la chaleur.

Plusieurs types de prélèvements ont donc été réalisés sur le champ :

- pour une production de pigment en duplicat : au moins 250g de feuilles jeunes si possible
- pour une analyse chimique en triplicat : au moins 90g de feuilles de tout type de taille

D'autres espèces végétales ont proliféré sur ces champs, dont de nombreuses adventices, qui n'ont pas été éliminés par un désherbage. Il a été démontré en 2008 que

la présence de mauvaises herbes dans la production de pigment, notamment dans l'étape de fermentation, conduisait à une baisse de la pureté en indigo [135]. Nous avons donc procédé pour chaque récolte à une coupe sélective aux ciseaux à partir du pétiole des feuilles. Les feuilles en bord de rosette, souvent sales ou abimées ont été écartées, ainsi que les feuilles présentant une couleur violacée.



Figure 20 - Plants d'âges et de tailles différents de Pastel sur le champ de Labège, en octobre 2019

2.3.2 Etude des conditions d'extraction et conservation des extraits MeOH

Afin de confirmer la présence de précurseurs dans les feuilles destinées à la production de pigment, des extraits de feuilles fraiches ont été systématiquement réalisés avec la méthode d'extraction décrite dans le chapitre 2.1.1. Leur présence a été détectée par CCM (révélée avec de la soude) avant évaporation, et par UHPLC-HRMS après évaporation des solvants d'extraction. Comme indiqué dans le chapitre 2.1.1, dans certains cas, alors que les précurseurs ont été détectés par CCM, ils n'ont été détectés qu'avec une faible intensité, voire pas du tout détectés par UHPLC-HRMS. Ceci a mis en évidence une dégradation des précurseurs entre l'étape d'extraction des feuilles fraiches et l'analyse des extraits. Deux hypothèses ont été envisagées : (i) une dégradation lors de l'évaporation des extraits, ou (ii) une dégradation à sec, après évaporation, au cours du stockage des extraits, habituellement entreposés sous hotte à température ambiante.

Nous avons donc tenté d'optimiser les conditions d'évaporation et de stockage des extraits de feuilles fraiches de Pastel.

2.3.2.1. Evaporation des extraits MeOH

Lors des premières extractions, chaque extrait était concentré sous vide, à l'évaporateur rotatif, dans un bain marie à 40°C, afin de pouvoir estimer le taux d'extraction et de réaliser des échantillons à 5 mg/mL pour l'UHPLC-HRMS à partir de l'extrait sec. Lorsque cette analyse est réalisée directement après l'évaporation, les précurseurs sont présents en quantité importante, cette étape d'évaporation à 40°C ne semble donc pas être la seule responsable de la dégradation des précurseurs. Cependant, lors d'un essai de fractionnement d'un extrait MeOH de feuilles fraiches, une fraction initialement enrichie en isatan B a été évaporée dans ces conditions à 40°C et l'isatan B s'est dégradé instantanément. L'analyse de cette fraction par UHPLC-HRMS a montré l'absence d'Isatan B et la présence d'un autre composé de rapport *m/z* = 247,0869 pouvant correspondre à l'ion déprotoné de la tryptanthrine (Figure 21). Ce composé a déjà été observé dans un extrait MeOH de feuilles séchées à 40°C par Oberthur et al. [49], et dans des extraits CH_2Cl_2 de feuilles séchées à 40°C par Mohn et al. [124].

Bien que la tryptanthrine ne soit pas détectée et que l'on observe encore les précurseurs dans nos extraits MeOH évaporés à 40°C, il a été décidé, par précaution, d'évaporer le méthanol sous vide à température ambiante et d'évaporer l'eau résiduelle par lyophilisation afin de limiter le risque de dégradation des précurseurs. Il a en parallèle été nécessaire de déterminer les conditions de stockage de ces extraits.

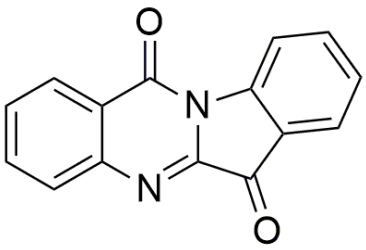


Figure 21 - Structure de la tryptanthrine

2.3.2.2. Conditionnement des extraits MeOH

Un essai de conservation a été mis en place sur un extrait méthanolique d'une récolte de feuilles fraiches effectuée en mai 2021. Cet essai avait pour objectif de suivre la teneur des précurseurs dans le temps à différentes températures (température

ambiante, 4°C, -20°C et -80°C) et dans trois atmosphères sélectionnées (air libre, azote et argon) afin d'évaluer l'influence de la température et du dioxygène de l'air sur les précurseurs. L'extrait a été réalisé selon la méthode précédemment décrite et divisé en 12 parts ; une pour chaque condition testée et en trois réplicats, soit un total de 36 échantillons analysés sur 35 jours. Suite aux analyses UHPLC- HRMS, les sommes des aires sous la courbe (ASC) des ions majoritaires des précurseurs isatan A et isatan B (Tableau 2) ont été regroupées pour chaque échantillon. Etant donné la stabilité de l'indican dans les extraits et le rôle encore incertain du malonylindican dans la formation de l'indigo, il a été décidé d'exclure ces deux composés de nos analyses. Un histogramme représentant la teneur moyenne des sommes des isatan A et isatan B pour chaque réplicat après 15 jours et 35 jours de conservation est représenté sur la Figure 22.

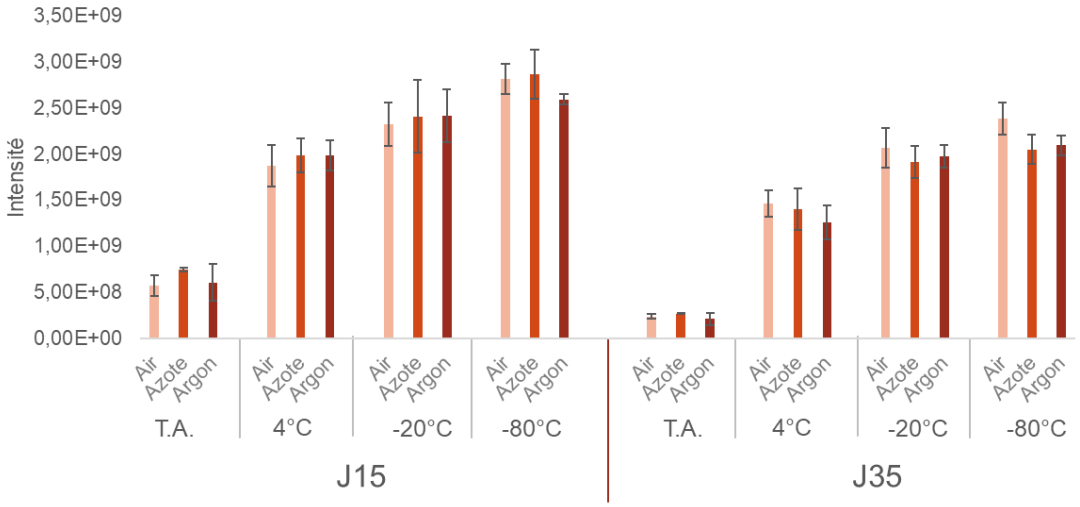


Figure 22 - Histogramme des teneurs en précurseurs dans des extraits MeOH 15 jours après la récolte (J15) et 35 jours après (J35) dans différentes conditions de températures et d'atmosphère.

Après 15 jours, on a pu constater que la teneur en isatan A et en isatan B était nettement plus faible à température ambiante que lorsque les extraits avaient été conservés à froid, et particulièrement au congélateur à - 20°C ou - 80°C. Cette tendance s'est confirmée après un mois de stockage, les précurseurs n'étant plus présents qu'en quantité négligeable à température ambiante, alors qu'ils étaient toujours présents en quantité importante à froid, malgré une baisse significative de leur teneur, notamment à 4°C. Malheureusement, l'absence de témoin à J0 suite à une erreur de manipulation ne nous a pas permis d'affirmer qu'il n'y avait pas eu de dégradation des précurseurs entre J0 et J15 à - 80°C. Cependant, cette étude a confirmé que les précurseurs se dégradaient rapidement à température ambiante et qu'il était indispensable de maintenir les extraits

au congélateur si leur analyse devait être différée. Les teneurs des échantillons stockés à -20°C et à -80°C étant comparables, et le stockage dans un congélateur à -20°C étant plus facile à mettre en place de façon systématique, il a été décidé de conserver tous les extraits à -20°C.

Par ailleurs, que les extraits soient conservés à l'air, sous N_2 ou sous argon, il apparait que les teneurs en précurseurs sont similaires peu importe la température. La présence d'oxygène ne semble donc pas avoir d'effet sur la dégradation des précurseurs au sein d'extrait MeOH sec, sur une période de 35 jours.

En conclusion, ces études confirment que les précurseurs sont effectivement très sensibles et se dégradent en quelques jours après extraction au méthanol s'ils sont conservés à température ambiante. Ainsi, afin de limiter leur dégradation et de conserver une méthode d'extraction simple à mettre en œuvre, le protocole suivant a été mis en place pour extraire les précurseurs et limiter leur dégradation lors du stockage des extraits secs :

-Extraction au MeOH à température ambiante pendant 5 min, au mixeur plongeant.

- Filtration
- Evaporation sous vide du MeOH à température ambiante
- Congélation et lyophilisation de l'eau résiduelle extraite
- Conservation des extraits à -20°C.

2.3.3 Analyses des précurseurs sur différents lots de Pastel

Une première partie de ce chapitre sera consacrée à l'étude des teneurs en précurseurs dans des jeunes feuilles et des feuilles plus âgées. Dans un second temps, afin de déterminer si la période de récolte des feuilles fraiches de Pastel a une influence sur la teneur en précurseurs et si cette dernière peut être corrélée à la qualité et la quantité du pigment indigo obtenu, nous avons cherché à comparer les teneurs en précurseurs en fonction des dates de récolte sur une période de deux ans. Enfin, nous avons également souhaité savoir s'il était possible de produire le pigment pendant plusieurs jours après la récolte, nous avons donc comparé les teneurs en précurseurs en fonction de la durée de stockage des feuilles après leur récolte.

2.3.3.1. Analyse de la teneur en précurseur dans les feuilles de cœur et de bordure de rosette

Lors de la croissance du Pastel, les jeunes feuilles poussent en bouquet et finissent par tomber en panache vers les bordures de la rosette en maturant. En 2001, Maugard et al. ont déclaré que les jeunes feuilles présentes au cœur de la rosette étaient plus riches en précurseurs que les feuilles matures [82]. Depuis, aucune étude n'a été réalisée sur le potentiel indigogène des feuilles en fonction de leur maturité. Nous avons donc comparé la teneur en précurseurs des feuilles du cœur de la rosette et celle des feuilles plus matures en bordure de rosette.

Méthode d'analyse :

Des petites feuilles, des grandes feuilles et un mélange des deux ont été extraits au MeOH. Les extraits ont été analysés par UHPLC-ESI-HRMS selon la méthode décrite au chapitre 2.1.2 et les aires sous les pics des ions majoritaires détectés pour chaque précurseur (isatan A et isatan B) ont été additionnés afin de pouvoir comparer leurs teneurs relatives dans les extraits (Tableau 2). La teneur en glucobrassicine, glucosinolate majoritaire des feuilles de Pastel, ainsi que celles des deux phénols majoritairement observés (l'acide disinapoylglucarique et le 3''-*O*-glucoside d'isoscoparine) ont également été intégrées. Comme pour les précurseurs, les ASC des ions de ces deux composés phénoliques ont été additionnées et les teneurs représentées sous l'étiquette « phénols ».

La Figure 23 montre les résultats des sommes des ACS des précurseurs, des phénols et de la glucobrassicine comme précédemment présenté.

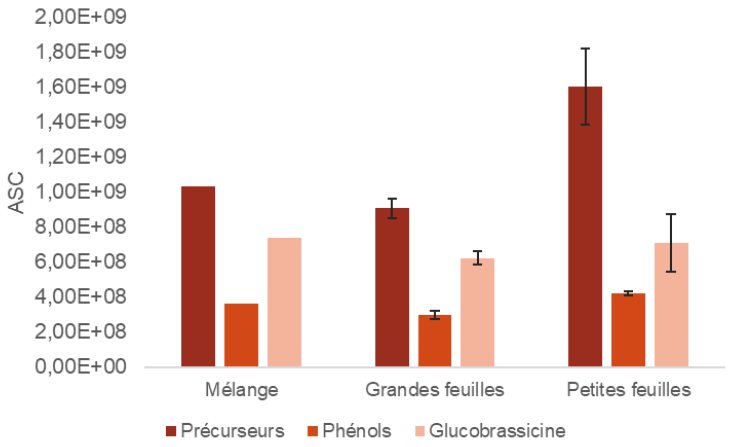


Figure 23 - Histogramme des analyses UHPLC-ESI-HRMS de la somme des teneurs en précurseurs, en phénols et en glucobrassicine dans des feuilles de différentes maturités (en triplicat, sauf pour le mélange de feuilles)

Les extraits de feuilles issues du cœur de la rosette ont présenté une teneur en précurseur plus importantes que celles des feuilles matures et du mélange, tandis que les teneurs en phénols et en glucobrassicine se sont révélées similaires entre les échantillons. Ces résultats sont en accord avec ce qu'avaient proposé Maugard et al. en 2001, mais à l'époque sans incorporer l'isatan A puisqu'il n'avait pas encore été identifié [82]. La cause de cette plus grande teneur n'est pas expliquée, il est probable que ces précurseurs soient synthétisés en plus grande quantité ou accumulés dans les organes en croissance [136], mais également qu'au cours du temps, les précurseurs soient métabolisés spontanément dans les feuilles matures, soit à cause de leur instabilité soit en réponse à une stress extérieur libérant ainsi les indoxyles réactifs pouvant conduire à la production d'indigo ou d'autres composés répulsifs ou toxiques pour les prédateurs par exemple [137].

En parallèle de ces analyses, une production de pigment a été réalisée à partir de feuilles jeunes et de feuilles plus âgées. Les résultats seront présentés au chapitre 3.2.4.

Néanmoins, pour des raisons pratiques lors de la récolte (facilité de récolte, homogénéité des prélèvements sur les deux ans, biomasse plus importante), toutes les analyses de précurseurs ont été réalisés sur des mélanges de feuilles issues à la fois du cœur et de la périphérie de la rosette.

En parallèle, le second paramètre susceptible d'influencer la quantité de précurseurs dans la plante que nous avons souhaité étudier est la période de récolte.

2.3.3.2. Influence de la période de récolte sur la teneur en précurseurs

D'après la littérature (chapitre 1.3.2.4), la teneur en précurseurs dans la plante peut varier en fonction des conditions de culture et de la saison. Il a notamment été décrit que les concentrations en précurseurs dans la plante sont maximales durant les mois d'été, après les périodes de sécheresse [76]. Néanmoins, il n'existe aucune étude corrélant la quantité de précurseurs détectés et le rendement en indigo produit. Le suivi des précurseurs au cours des mois pouvait donc se révéler utile afin d'établir un lien entre la teneur en précurseurs dans la plante et la production de pigments.

Ce sous-chapitre est donc consacré au suivi des précurseurs, sur une période de deux ans, de juin 2020 à juin 2022. Des analyses ont également été réalisées entre septembre 2019 et mars 2020, mais elles n'ont pas été prises en compte. En effet au chapitre 2.2.2.2, nous avons démontré l'instabilité des précurseurs à température ambiante et à 4°C. Or, pendant cette période, la conservation des échantillons se faisait à ces températures et parfois pendant plusieurs jours avant l'analyse de ces échantillons. Ensuite, la pandémie de covid-19 explique qu'il n'y ait pas eu d'analyses entre mars et juin 2020

Il convient à ce niveau de préciser que la comparaison des teneurs a été réellement mise en place à partir de septembre 2021, avec l'ajout d'un étalon interne afin de s'assurer que les variations d'ASC des différents ions observés ne provenaient pas de l'appareil (ex : encrassement de la source, de la colonne, etc…). Le choix de l'étalon interne s'est porté sur un composé indolique susceptible d'avoir un comportement similaire à celui des précurseurs en chromatographie liquide et en spectrométrie de masse. Il était également nécessaire de choisir une molécule absente ou en quantité négligeable dans les extraits MeOH et qui avait un tR différent de celui des précurseurs. Des essais ont été réalisés avec un témoin d'acétate d'indoxyle, d'acide indol-3-acétique et de tryptophane dans un mélange MeOH/H_2O (80/20) permettant de solubiliser l'extrait MeOH sec de feuilles de pastel. Le tryptophane se solubilisant dans ce mélange et son tR étant distinct des composés d'intérêt, il a été retenu pour l'étalonnage interne. Tous les extraits méthanoliques secs ont donc été solubilisés dans une solution à 0,5 g/mL de

tryptophane dans un mélange MeOH/H_2O (80/20) afin d'être analysés par UHPLC-ESI-HRMS.

Les premières analyses réalisées entre juin 2020 et aout 2021 n'avaient pas pour objectif principal de comparer les teneurs de précurseurs entre elles au cours du temps, mais simplement de vérifier la présence des précurseurs en parallèle de leur extraction pour la production du pigment (Chapitre 3.1). Ces analyses ont donc été réalisées sans étalon interne, et sans réplicats, mais les teneurs étant du même ordre de grandeur que celles obtenues lors des analyses avec l'étalon interne, elles ont tout de même été intégrées au graphique représenté dans la Figure 24.

De plus, plusieurs teneurs ne présentent pas d'écart-types, car les analyses n'ont pas pu être réalisées en plusieurs réplicats pour des raisons de récoltes, ou des problèmes techniques liés à l'extraction ou aux analyses.

Enfin, deux parcelles du même champ ont été exploitées en fonction des semis réalisés par l'entreprise partenaire Terre de Pastel. Il n'est pas impossible que ces localités, différemment exposées au soleil et à l'humidité, aient eu une influence sur la production des précurseurs au sein de la plante.

Ces analyses ont permis de constater la présence de précurseurs dans les feuilles tout au long de l'année, avec des sommes d'ASC variables, comprises entre 9E08 et 3E09 (Figure 24).

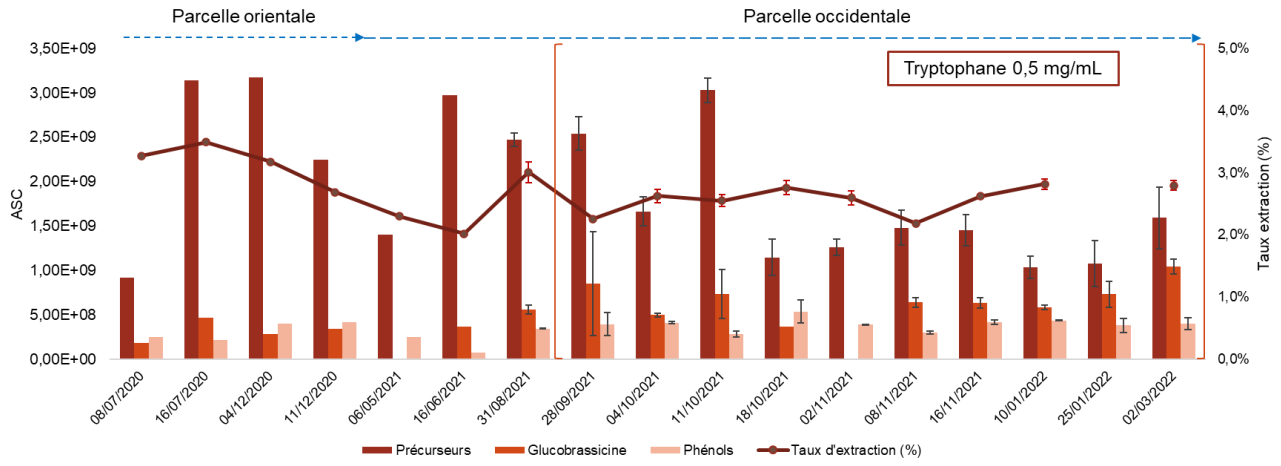


Figure 24 - Histogramme du taux d'extraction et des teneurs en précurseurs, en glucobrassicine et en « phénols » des extraits MeOH de feuilles fraiches de Pastel réalisés de juillet 2020 à juin 2022.

Au cours de cette période, le taux d'extraction, et donc la quantité d'extrait sec obtenu, se sont révélés relativement stables avec une médiane de 2,7%. Les taux les plus élevés ont été observés en été (juillet 2020, 3,5 %) comme en hiver (décembre 2020, 3,2 %).

Concernant la teneur en précurseurs, tous les lots analysés contenaient des précurseurs, en quantité variable. Les teneurs en précurseurs les plus élevées ont été observées pendant l'été (en 2020 et en 2021), mais également en octobre 2021 et en décembre 2020. De plus, des analyses effectuées à quelques jours d'intervalle ont parfois montré des teneurs significativement différentes, comme pour les analyses effectuées en juillet 2020, en décembre 2020 ou encore en octobre 2021. Il apparaît donc difficile d'émettre des conclusions quant à un éventuel lien entre la période de récolte et la teneur en précurseurs, quelle que soit la parcelle étudiée et l'année de récolte. Les analyses menées par Campeol et al. ont montré que les feuilles étaient plus riches en précurseurs pendant les mois d'été [76] et que la quantité d'isatan B semblait positivement corrélée à un stress hydrique. En analysant les conditions météorologiques antérieures aux jours de récolte, il s'avère qu'il n'est pas possible de corréler la teneur en précurseurs à des périodes de pluie ou se sécheresse.

La qualité du pigment obtenu pouvant dépendre des autres métabolites co-extraits, les teneurs en glucobrassicine et en phénols majoritaires ont été également représentées. En comparant les extraits du 11/10/2021 et du 10/01/2022 par exemple, on peut remarquer que l'extrait du 11/10/2021 est plus riche en précurseurs que celui du 10/01/2022, alors que les teneurs en glucobrassicine et en phénols sont similaires. On peut alors se demander si pour un même taux d'extraction, un lot riche en précurseurs et contenant une quantité moindre de glucosinolates et de composés phénoliques est susceptible de produire un pigment de meilleure qualité.

Les teneurs en glucobrassicine et en phénols sont également variables en fonction des récoltes, mais il ne semble pas y avoir non plus de lien évident entre la période de récolte et leur teneur d'une part, et entre les familles de composés d'autre part. Les dérivés indoliques du tryptophane et les composés phénoliques sont impliqués dans la défense de la plante contre d'éventuels prédateurs ou des microorganismes pathogènes. Ils sont considérés comme des phytoanticipines et/ou des phytoalexines [138]. Leur biosynthèse peut donc varier au cours de la croissance de la plante selon les conditions de cultures et les attaques par des phytopathogènes. De plus, lors de l'endommagement des tissus, les glucosinolates sont hydrolysés par des myrosinases libérant des

composés de défense bioactifs tels que des isothiocyanates ou des dérivés nitriles toxiques pour l'agent pathogène [139].

Le principe est similaire avec les précurseurs de l'indigo, leur hydrolyse conduisant à la production de cristaux d'indigo insolubles indigestes pour les prédateurs des feuilles, comme évoqué précédemment [96]. Ces mécanismes peuvent donc être potentiellement impliqué dans la variation de quantité de précurseurs et de glucosinolates observée après la récolte. En effet, lors des récoltes, les feuilles de Pastel, coupées à la base de la rosette, laissaient apparaitre la formation d'indigo, visible à l'œil au niveau de la section de la feuille (Figure 16).

Ces analyses ont donc montré que les plants produisent des précurseurs tout au long de l'année, en quantité variable certes, mais permettant d'envisager la production de pigment quelles que soient les saisons. On peut néanmoins se demander si les feuilles présentant un ratio précurseurs / glucosinolates-phénols élevé ne peuvent pas conduire à un pigment de meilleure qualité.

La variabilité de ces teneurs sur ces deux années peut s'expliquer par de nombreux facteurs intervenant en amont de la récolte, difficiles à maitriser à notre niveau, tels que les conditions climatiques (ensoleillement et pluviométrie), la période de semis, la présence d'adventices, ou encore l'enrichissement des sols. L'étude des de ces paramètres n'a pas été possible dans le cadre de ce travail, mais il sera nécessaire de la mettre en place en collaboration étroite avec l'exploitant.

La dégradation des précurseurs après la récolte est également à prendre en compte. Au laboratoire, les extractions méthanoliques ont le plus souvent été réalisées le matin juste après la récolte, mais en fonction des contraintes liées à la production de pigment ou d'une quantité importante de feuilles à extraire, certaines extractions méthanoliques n'ont pu être réalisées que l'après-midi, voire le lendemain de la récolte. De plus, certains pigments produits dans les mêmes conditions sur deux jours n'avaient pas le même rendement ou la même concentration en indigo. Il s'est donc avéré nécessaire de déterminer si les précurseurs subissent une altération au sein de la feuille après la récolte.

2.3.3.3. Analyse de la teneur en précurseur dans la feuille après récolte

L'objectif de cette étude était de suivre l'évolution de la teneur en précurseurs après la récolte, afin de déterminer quel était le moment idéal pour la production du pigment. La réactivité des précurseurs est bien connue, mais leur évolution dans la feuille intacte après récolte est peu décrite. Oberthür et al. ont observé la dégradation des précurseurs dans des feuilles séchées à température ambiante ou à 40°C après quelques jours [49]. En revanche, les auteurs ont remarqué que les précurseurs étaient toujours présents dans des feuilles ayant subi un traitement par congélation dans l'azote liquide, suivi d'une lyophilisation et une extraction immédiate. Néanmoins, aucune analyse n'a été réalisée sur des feuilles fraiches non traitées.

Deux études ont donc été menées sur des feuilles fraichement récoltées. La première avait pour objectif de suivre les précurseurs à court terme dans la feuille, jusqu'à 24 h après la récolte. La seconde étude a consisté en un suivi sur quelques jours.

La première étude a été réalisée sur un lot de feuilles récoltées mi-juin 2021. Les feuilles ont été laissées à température ambiante et des triplicats de chaque lot à 1h, 2h, 7h et 24h de la récolte ont été extraits. Les extraits ont été injectés rapidement en UHPLC-ESI-HRMS, sans étape d'évaporation préalable. Etant donné que tous les extraits ont été réalisés à partir d'une même quantité de feuilles, dans le même volume de MeOH, il a été considéré que leurs concentrations étaient identiques. La teneur globale en précurseurs a été estimée en additionnant la teneur de l'isatan A et de l'isatan B comme décrit dans le chapitre 2.2.3.1. La somme des ASC de l'acide disinapoylglucarique (*m/z* = 621,1449) et du 3''-*O*-glucoside d'isoscoparine (*m/z* = 623,1587) qui sont supposés être stables a également été ajoutée à l'histogramme en guise d'étalon interne (Figure 25).

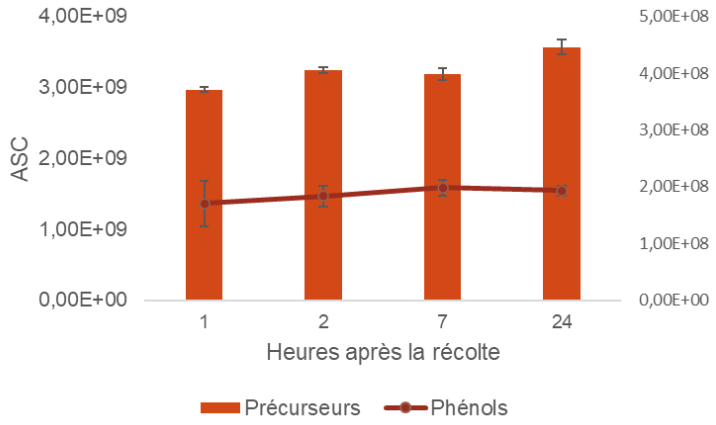


Figure 25 - Histogramme des analyses UHPLC-ESI-HRMS de la somme des teneurs en précurseurs et en phénols dans des feuilles extraites à 1, 2, 7 et 24h après la récolte

Jusqu'à 24h après la récolte, la teneur en précurseur semble assez stable. La production de pigment pourrait donc se faire au moins jusqu'à un jour après la récolte des feuilles en les conservant à température ambiante.

En octobre 2021, une récolte a été réalisée afin de faire le même suivi mais jusqu'à trois jours après la coupe des feuilles. Pour cela, les feuilles ont été conservées à 4°C afin d'éviter un flétrissement trop rapide à température ambiante et une dégradation éventuelle des précurseurs [49]. Le suivi dans le temps des teneurs en précurseurs est présenté en figure 26.

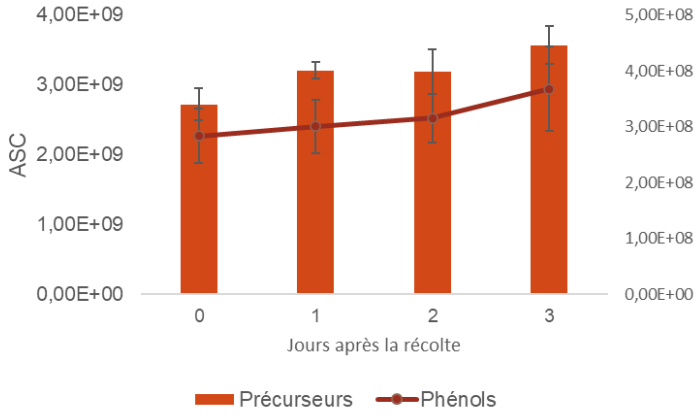


Figure 26 - Histogramme des analyses UHPLC-ESI-HRMS de la somme des teneurs en précurseurs et en phénols dans des feuilles extraites jusqu'à 3 jours après la récolte

Les résultats obtenus ont été similaires à ceux de l'étude sur une journée. La teneur en précurseurs reste stable à J+1 et même jusqu'au quatrième jour après la récolte.

La stabilité des précurseurs sur quelques jours au-delà de la récolte indique que la production de pigment sur plusieurs jours serait donc envisageable. Toutefois le lien

entre ces analyses et la quantité et la qualité du pigment produit restent à déterminer. Ce point sera abordé dans le chapitre 3.

Sur une période de deux ans, un suivi régulier de la teneur en isatan A et en isatan B a permis de montrer que les feuilles étaient riches en précurseurs, peu importe la saison et la maturité des plants, permettant ainsi d'envisager des récoltes de feuilles tout au long de l'année pour la production du pigment.

En parallèle, des analyses ont mis en évidence la stabilité des précurseurs dans les feuilles jusqu'à trois jours après la récolte, ce qui pourrait permettre de produire le pigment en plusieurs fois, sur plusieurs jours après la récolte, afin de faciliter la mise en œuvre de la production du pigment.

2.4 Etude de la réactivité des précurseurs

Le chapitre précédent a permis d'identifier les précurseurs présents dans les extraits méthanoliques de pastel et de mettre au point un suivi de ces molécules thermosensibles. Comme il est désormais possible de détecter ces composés et d'estimer leur teneur dans les lots de Pastel, nous avons souhaité étudier leur réactivité dans différentes conditions, afin de mieux comprendre les paramètres permettant d'améliorer la quantité et la qualité du pigment bleu produit à partir des feuilles de pastel. Les méthodes employées pour ce suivi ainsi que les résultats obtenus seront présentées dans ce chapitre, en deux parties.

La première partie de ce chapitre présentera les premiers essais de suivi de la réactivité des précurseurs, au sein de l'extrait aqueux, dans des conditions similaires à celles employées lors de la production du bleu.

La seconde partie décrira les méthodes mises au point afin d'isoler l'isatans A et l'isatan B à partir d'un extrait méthanolique de pastel et l'étude de leur réactivité dans les conditions de production de l'indigo.

2.4.1 Analyse des précurseurs en conditions de production du pigment

Jusqu'alors, les précurseurs ont été analysés à partir d'extraits méthanoliques de feuilles fraiches broyées, mais la production de pigment repose quant à elle sur l'extraction des précurseurs en milieu aqueux, sur des feuilles intactes. Les précurseurs sont extraits de la feuille avec de l'eau chaude acidifiée. Une étape d'alcalinisation est ensuite nécessaire en présence d'oxygène pour provoquer la conversion des précurseurs en indigo. En théorie, la quantité d'indigo produite devrait être corrélée à la quantité de précurseurs, en sachant que deux moles d'indoxyle forme une mole d'indigo. Néanmoins, lors de la production, les rendements en pigments ainsi que leur concentration en indigo sont très variables, y compris entre réplicats.

Dans ces conditions, d'autres métabolites sont extraits et il est possible qu'ils interagissent potentiellement avec les précurseurs ou les indoxyles. Nous avons donc dans un premier temps analysé la composition de ces extraits acides et basiques par UHPLC-ESI-HRMS et comparé ces nouvelles données avec celles obtenues avec des extraits méthanoliques. L'extrait MeOH a été réalisé comme indiqué dans le chapitre 2.1

et injecté en UHPLC-ESI-HRMS à une concentration de 5 mg/mL. L'extrait aqueux acide a été obtenu en immergeant les feuilles fraiches dans de l'eau à 50°C, acidifiée à pH 2, pendant deux heures. L'extrait aqueux a ensuite été alcalinisé à pH 10,5 avec de la soude, conduisant à la précipitation de l'indigo. Deux prélèvements issus de l'extraction aqueuse en milieu acide (EAa) et en milieu basique (EAb) ont été directement analysés par UHPLC-ESI-HRMS (Figure 27).

Sur les chromatogrammes des prélèvements aqueux acides et basiques, les précurseurs isatans A et B ne sont plus ou que très faiblement détectés, respectivement, dans les aliquots aqueux acides, et ils sont tous les deux absents des aliquots aqueux basiques. En revanche, l'indican (tR = 3,65 min), a été observé dans l'extrait aqueux acide ainsi que dans l'extrait aqueux basique. Les XIC de chaque précurseur se trouvent en annexes Annexe 8 à 10. Par ailleurs, les chromatogrammes UV-visible ont montré la présence d'indigo dans l'extrait aqueux basique (annexe 9), mais pas dans l'extrait aqueux acide (annexe 10).

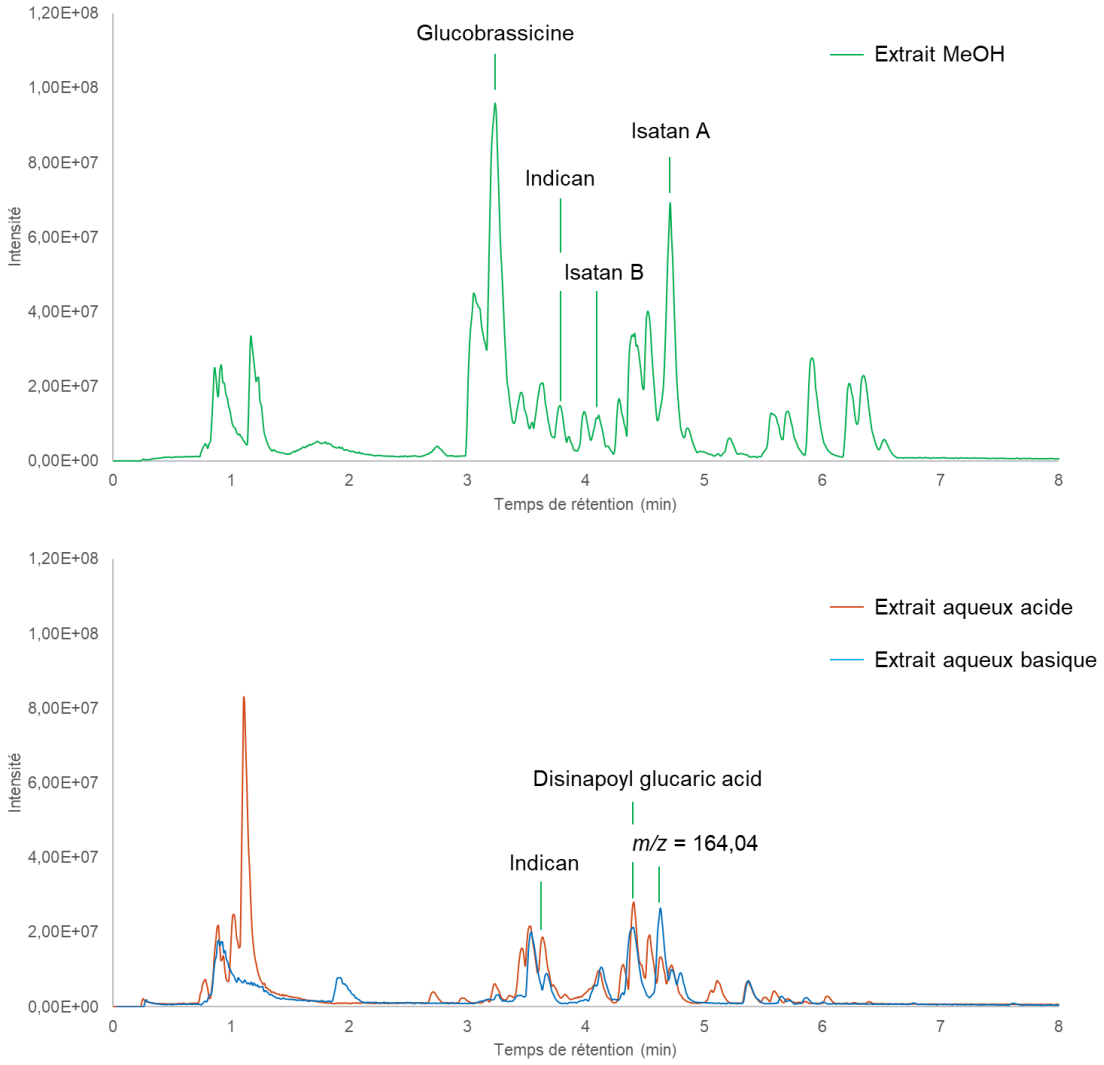


Figure 27 - Chromatogrammes d'un extrait méthanolique (vert), d'un extrait aqueux acide (rouge) et d'un extrait aqueux basique (bleu)

L'absence des précurseurs (isatan A et isatan B) dans l'extrait acide et la détection de l'indigo dans l'extrait basique indiquent que les précurseurs ont bien été extraits et directement hydrolysés dès l'étape d'extraction acide. Les précurseurs sont normalement hydrolysés en indoxyle, qui se dimérisent en leuco-indigo, la forme réduite et soluble de l'indigo [140]. L'indoxyle ainsi que le leucoindigo, les deux intermédiaires réactionnels de synthèse de l'indigo, ont donc été recherchés dans les chromatogrammes des extraits acide et basique, mais aucun *m/z* correspondant à ces composés n'a pu être détecté.

Ces analyses ont donc montré que l'isatan A et l'isatan B sont les deux précurseurs principalement impliqués dans la production de l'indigo à partir des feuilles d'*Isatis tinctoria*, l'indican n'étant pas complètement hydrolysé dans les conditions d'extraction. A ce stade, il n'est toujours pas possible de dire si l'hydrolyse de l'isatan A et de l'isatan B

est due à la température et/ou au pH du milieu, ou à l'activité enzymatique d'une hydrolase. Afin de comprendre les mécanismes réactionnels de formation de l'indigo, la purification des précurseurs s'est donc avérée être une étape essentielle pour étudier leur réactivité, notamment en conditions de production.

2.4.2 Analyse de la réactivité des précurseurs purifiés dans les conditions de production du bleu

Les réactions mises en jeu dans les deux étapes de production sont peu décrites, puisque les dernières études sur la réactivité des indoxyles remontent à 1970 [100], soit bien avant la description d'une mise à l'échelle industrielle de la production d'indigo de Pastel en 1998 [33]. Les interactions entre précurseurs et avec d'autres molécules ne sont ainsi pas connues.

L'isolement des précurseurs va permettre d'étudier leur réactivité sans être gêné par les potentielles interactions et réactions parasites avec les autres molécules extraites des feuilles de Pastel. La première partie de ce sous-chapitre va présenter la méthode mise au point pour purifier les précurseurs. La seconde partie va présenter les deux méthodes de suivi des précurseurs qui ont été mises en place. Pour cette étude, les précurseurs purifiés ont été analysés par UHPLC-HRMS, mais également en voltammétrie cyclique.

2.4.2.1 Isolement des précurseurs

Des premiers essais d'isolement des précurseurs ont été réalisés par Oberthur et al. en 2004 [84]. Selon leur méthode, un extrait MeOH de feuilles fraiches a été fractionné par chromatographie en phase normale. Les fractions contenant l'isatan A et l'isatan B ont ensuite été purifiées sur LH20.

Ce procédé a été appliqué à nos extraits : un extrait MeOH de feuilles fraîches a été fractionné sur une colonne ouverte à moyenne pression (MPLC). Au cours de ce premier essai, la silice s'est teintée en bleu et les analyses UHPLC-ESI-HRMS des fractions ont montré une dégradation des précurseurs lors de la séparation. Une méthode différente de celle proposée par Oberthür et al. a dû être mise au point pour la purification des précurseurs.

Un second essai a été réalisé par chromatographie flash en phase normale afin de limiter la durée de séparation et donc réduire le risque de dégradation des précurseurs sur la phase stationnaire. Le choix de la phase mobile s'est porté sur un mélange CH_3Cl/MeOH/H_2O tel qu'utilisé en chromatographie sur couche mince (CCM). Sept fractions ont ainsi été recueillies.

Sur les chromatogrammes Figure 28 (a), l'isatan B correspond au pic 3 (tR = 13,3 min) et l'isatan A correspond au pic 7 (tR = 34,4 min). La présence d'isatan B et d'isatan A dans ces fractions a été établie par CCM avec l'apparition d'une tache bleue après révélation de la CCM à la soude, correspondant à la formation d'indigo in situ sur la plaque (Figure 28 (b)). Le profil de ces fractions a ensuite été caractérisé plus précisément par UHPLC-ESI-HRMS.

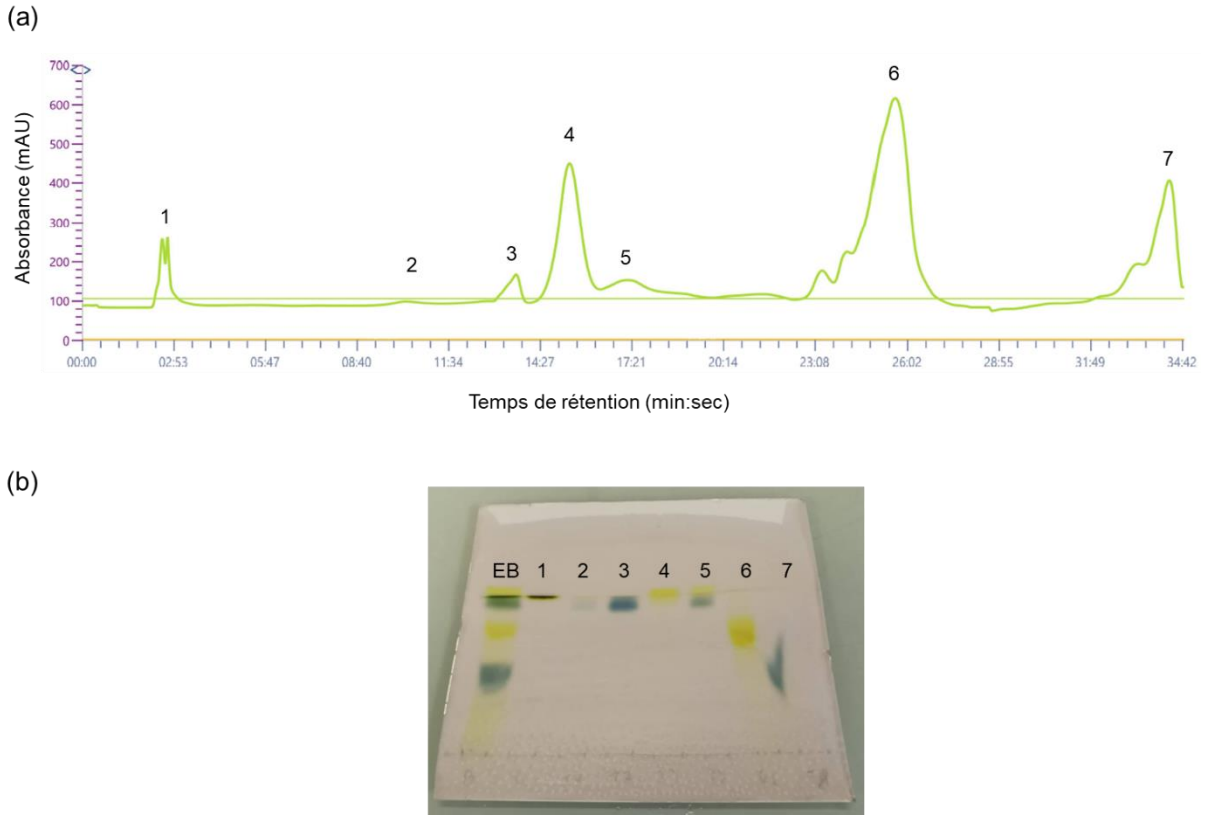


Figure 28 – (a) Chromatogramme UV (280 nm) d'une séparation par chromatographie flash en phase normale d'un extrait MeOH de feuilles fraiches (b) CCM des fractions obtenues par chromatographie flash

Les chromatogrammes des fractions 3 et 7 (Figure 29 et Figure 30) ont montré que l'isatan B et l'isatan A étaient respectivement les composés majoritaires de ces fractions.

Dans la fraction 3, l'isatan B a été détecté grâce à ses ions majoritaires (*m/z* = 338,08 et 292,08, tR = 4 min). La présence d'un ion de *m/z* = 356,10 au même temps de rétention, principalement au début du pic, a été attribué à l'adduit formiate de l'isatan B hydraté, ce qui peut notamment expliquer l'élargissement du début du pic. D'autres ions minoritaires ont été observés, mais n'ont pas été identifiés.

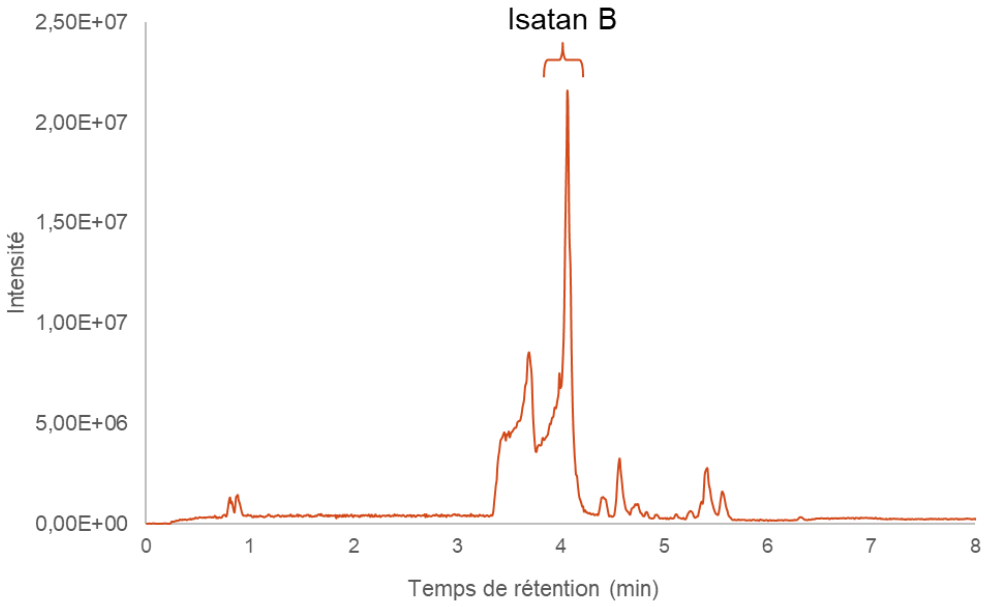


Figure 29 - Chromatogramme de la fraction CH_3Cl enrichie en isatan B

Concernant la fraction 7, le pic le plus intense a pu être identifié comme étant l'isatan A (*m/z* = 334,09 et tR = 4,75 min). Comme pour l'isatan B, la présence d'un ion de *m/z* = 396,09 au même temps de rétention, principalement au début du pic, a été attribué à l'isatan A hydraté. Un pic intense de glucobrassicine a également été observé (*m/z* = 447,05 tR = 3 min), nécessitant une étape supplémentaire de purification. Pour séparer les deux composés, une extraction liquide-liquide a été réalisée avec un mélange AcOEt/H_2O (50/50 v/v). La glucobrassicine, étant très polaire, est restée dans la fraction aqueuse tandis que l'isatan A a partiellement migré vers la fraction acétate d'éthyle. Malgré tout, une proportion d'isatan A est restée dans la fraction aqueuse et ce malgré de nombreux lavages de celle-ci.

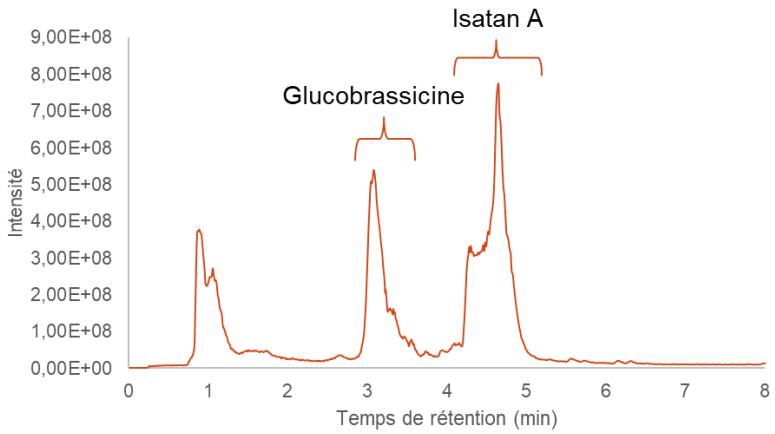


Figure 30 – Chromatogramme UHPLC-ESI-HRMS de la fraction 7 enrichie en isatan A

La fraction AcOEt contenant l'isatan A a été analysée par UHPLC-ESI-HRMS (Figure 31). La glucobrassicine a pu être entièrement éliminée de cette fraction.

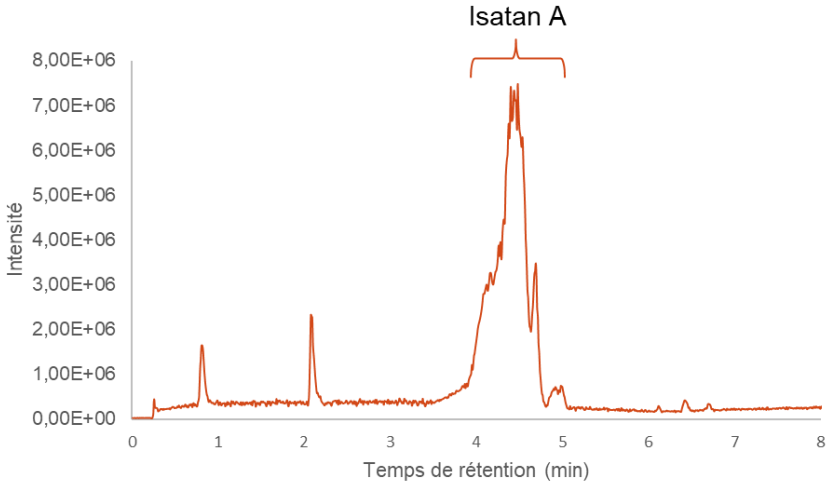


Figure 31 - Chromatogramme UHPLC-ESI-HRMS de la fraction AcOEt enrichie en isatan A

Au final, 7 mg d'une fraction enrichie en isatan B et 15 mg d'une fraction enrichie en isatan A ont été obtenus, représentant respectivement 1,3 et 2,5% de l'extrait brut injecté.

La séparation de l'isatan A et de l'isatan B s'est donc avérée possible avec une méthode relativement efficace à la fois rapide et donc limitant leur dégradation, simple puisqu'une seule étape est nécessaire pour la purification de l'isatan B, et deux étapes

pour l'isatan A, et reproductible. Il est donc possible d'envisager l'étude de la réactivité des précurseurs purifiés dans les conditions de production du pigment sans éventuelles interactions avec d'autres métabolites extraits du Pastel.

2.4.2.2 Analyses en HPLC-MS

Les fractions enrichies en isatan A et en isatan B ainsi que l'indican commercial ont été solubilisés dans de l'eau distillée par sonication puis ont été injectés à 0,5 mg/mL en UHPLC-ESI-HRMS. Les paramètres de température (60°C) et de pH (pH 1, pH 3 et pH neutre) ont été testés séparément dans un premier temps puis en simultané.

Les résultats de l'étude de l'influence du pH sur les précurseurs sont représentés sur les chromatogrammes Figure 32 et Figure 33. L'analyse de l'isatan A en solution aqueuse neutre a donné un signal à peine détectable, contrairement aux chromatogrammes des solutions à pH 3 et pH 1. Lors de la préparation des solutions aqueuses, l'isatan A solide a été difficile à solubiliser sans acide et, malgré une solubilisation au bain à ultrason, un précipité s'est rapidement formé. Le faible signal sur le chromatogramme de la solution neutre peut provenir de cette mauvaise solubilisation. L'ajout d'un acide dans l'eau pourrait donc aider à l'extraction de ce précurseur hors de la feuille. A pH 3 et 1, l'intensité du signal de l'isatan A en masse est similaire. Les

composés se sont effectivement bien solubilisés dans l'eau acide et la molécule semble ne pas s'être hydrolysée, au moins pendant 2h.

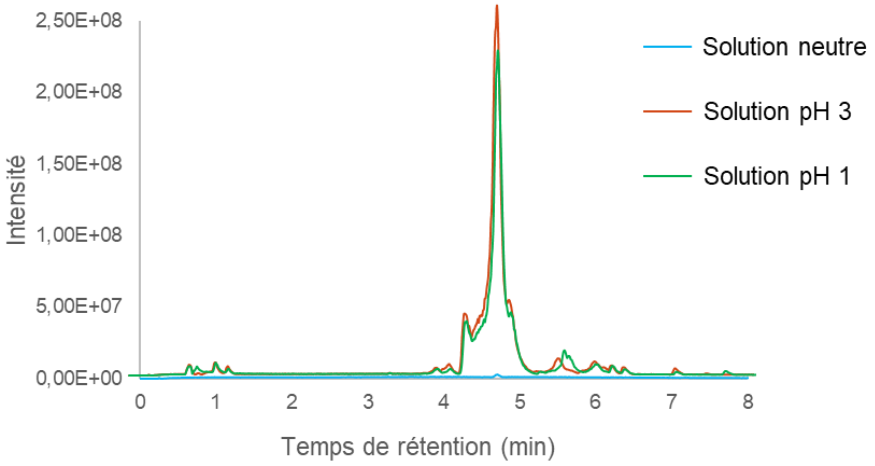


Figure 32 - Chromatogrammes UHPLC-ESI-HRMS des solutions aqueuses d'isatan A en condition neutre, pH 3 et pH 1

Les chromatogrammes UHPLC-ESI-HRMS des solutions d'isatan B sont présentés Figure 33. A l'inverse des solutions d'isatan A, les signaux sont d'intensité comparable sur les chromatogrammes de la solution aqueuse neutre et des solutions aqueuses acides à pH 3 et à pH 1. Cela peut dans un premier temps s'expliquer par le fait que l'isatan B était soluble dans l'eau à pH neutre et dans l'eau acide. Il semblerait que l'isatan B soit tout de même sensible au pH acide, avec une diminution de l'intensité du signal quand le pH diminue. Le signal UV n'a cependant pas montré de formation d'indigo. Il n'a donc pas été possible de confirmer par cette expérience que la dégradation potentielle de l'isatan B à pH acide conduisait à la formation d'indigo ou d'indoxyle.

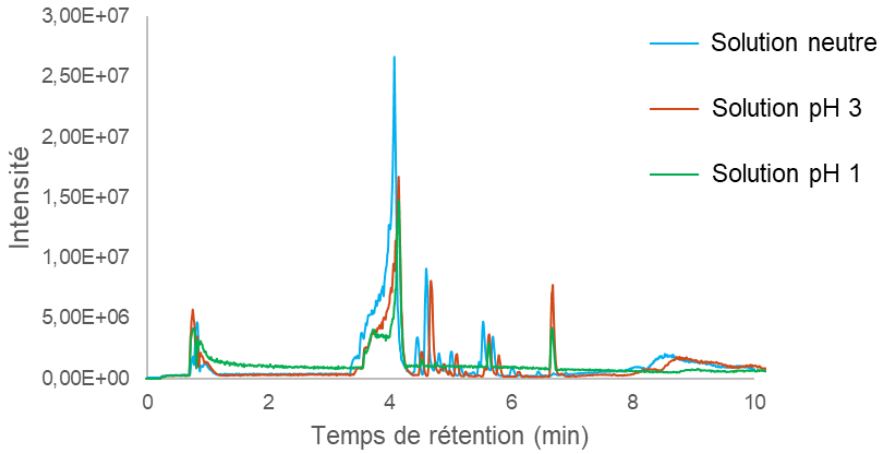


Figure 33 - Chromatogrammes UHPLC-ESI-HRMS des solutions aqueuses d'isatan B en condition neutre, pH 3 et pH 1

Les résultats de cette étude préliminaire de l'influence du pH acide sur les précurseurs ont montré que l'isatan A ne s'hydrolysait pas à pH acide, alors que l'isatan B apparaissait plus instable dans ces conditions. L'hydrolyse des isatans dans les extraits aqueux de feuilles intactes ne semble pas être dû uniquement au pH. La température du bain d'extraction a donc ensuite été testée.

Les solutions aqueuses d'isatan A ont été préparées à pH 3 et pH 1, étant donné la difficulté à solubiliser le précurseur en condition neutre. Les solutions ont été chauffées à 60°C pendant une heure. Après ce traitement, la solution d'isatan A à pH 3 n'a visuellement pas changé. En revanche, à pH 1 et à 60°C, l'isatan A doit être au moins en partie hydrolysé, la formation d'indigo ayant été observée dans le tube à hémolyse (Figure 34 (b)).

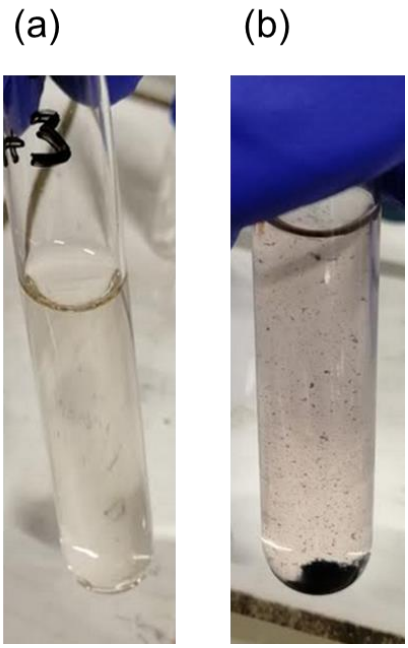


Figure 34 - Solutions aqueuses d'isatan A à pH 3 (a) et à pH 1 (b). De l'indigo a commencé à précipiter dans la solution à pH 1 (b)

La figure 35 présente les chromatogrammes de chaque solution. L'intensité de l'isatan A solubilisé à pH 3 à 60°C (Figure 35) s'est avérée similaire à celle à pH 3 à température ambiante (Figure 32). En revanche, à pH 1 à 60 °C, l'intensité du signal de l'isatan A a

nettement diminué. Une température élevée (60°C) et un pH très acide, c'est à dire autour de pH 1, semblent donc bien entrainer une dégradation de l'isatan A.

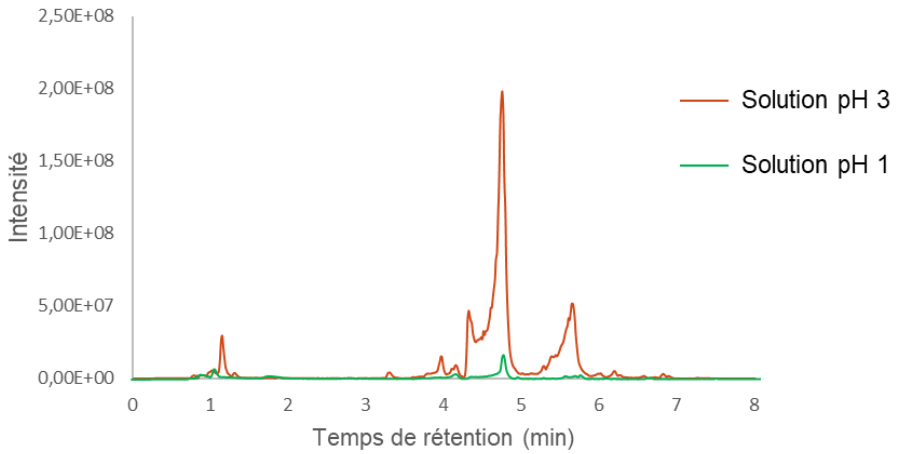


Figure 35 - Chromatogrammes UHPLC-ESI-HRMS des solutions aqueuses d'isatan A à 60°C, à pH 3 et pH 1

Les solutions d'isatan B ont quant à elles été préparées à pH neutre et à pH 3 (Figure 36). L'intensité du signal à pH 3 a été plus faible que celle à pH neutre, comme dans les essais précédents à température ambiante. Néanmoins, à pH identique, une température de 60°C n'a pas semblé dégrader de façon plus importante l'isatan B. A ces deux pH et à 60°C, l'isatan B est donc toujours présent.

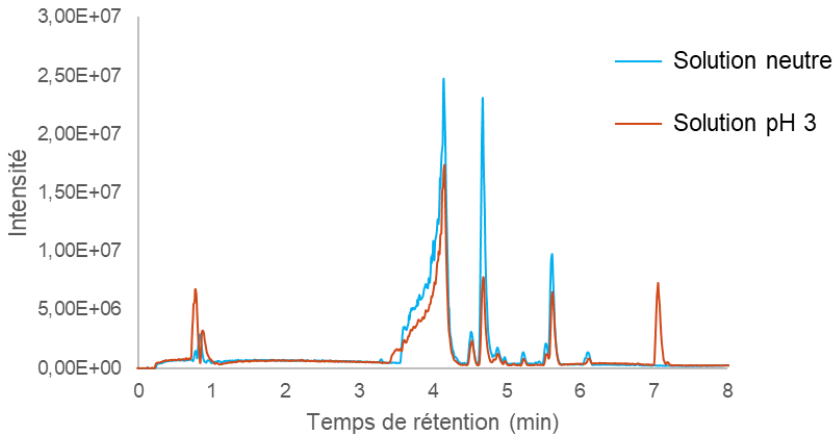


Figure 36 - Chromatogrammes UHPLC-ESI-HRMS des solutions aqueuses d'isatan B à 60°C, à pH neutre et pH 3

Ces premiers essais ont permis de montrer que le pH (pH 3) et la température utilisés lors de la production (60°C) ne dégradaient pas ou peu les précurseurs en une heure. Ces conditions de production ont été modifiées suite à l'optimisation des paramètres (Cf. Chapitre 3.2), une étude de la réactivité de l'isatan A a donc été réalisée dans ces nouvelles conditions (pH 2, 50°C, 2h). Les résultats de l'analyse de l'isatan A par UHPLC-ESI-HRMS (annexe 11) ont montré que dans ces conditions, même si le signal semble moins intense que dans les conditions précédentes (pH 3, 60°C, 1h), l'isatan A est toujours observable et n'est pas complètement dégradé. Ce ne sont donc pas uniquement ces paramètres qui sont responsables de leur complète disparition dans les extraits aqueux de feuilles fraiches.

Au cours de l'extraction aqueuse des feuilles fraiches, il est probable que certaines enzymes soient capables d'hydrolyser l'isatan A et l'isatan B. Oberthür et al. ont décrit l'hydrolyse enzymatique de l'isatan B par une β-glucosidase à pH 6,5 et dans une solution tampon phosphate [84]. En revanche, l'isatan A n'a pas pu être hydrolysé par ces deux enzymes, probablement en raison de l'encombrement stérique de la chaîne malonyle. Des essais ont tout de même été menés sur les deux précurseurs avec une β-glucosidase, mais dans les conditions de production du pigment, c'est à dire à pH 3 et à 60°C. Sur les chromatogrammes des analyses UHPLC- HRMS (Figure 37), les intensités de l'isatan A (a) et de l'isatan B (b) se sont révélées similaires à celles obtenues précédemment dans les mêmes conditions de pH et de température sans enzymes (Figure 35 et Figure 36), suggérant donc que l'isatan A et l'isatan B n'ont pas été hydrolysé dans ces conditions, même en présence de β-glucosidase. Un essai à pH neutre et à 60°C a également été réalisé sur l'isatan B (annexe 12) issu d'une autre purification, et l'intensité du signal du précurseur n'a pas diminué. Contrairement à ce que décrivaient Oberthür et al., l'isatan B ne semble pas avoir été hydrolysé par cette enzyme. Néanmoins, les conditions de traitement n'ont pas été les mêmes, il est possible que la β-glucosidase soit inhibée dans les conditions de production du pigment.

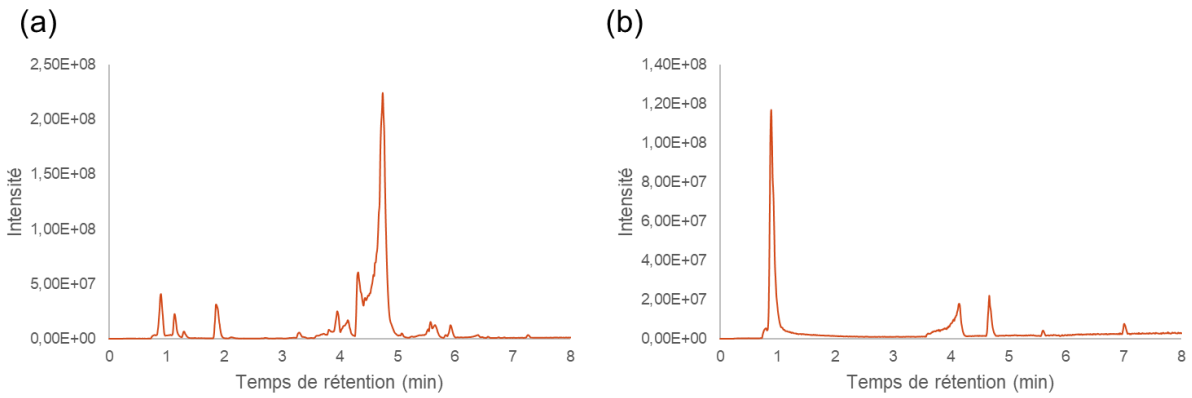


Figure 37 - Chromatogrammes UHPLC-ESI-HRMS des solutions aqueuses d'isatan A (a) et d'isatan B (b) avec une β-glucosidase à pH3, chauffée à 60°C pendant une heure

Les études préliminaires de la réactivité de l'isatan A et de l'isatan B ont montré que les paramètres de pH et de températures du procédé de production n'avaient pas ou que peu d'influence sur leur hydrolyse lors de l'extraction. L'acidification du milieu d'extraction semble améliorer la solubilité de l'isatan A et donc peut-être son extraction de la feuille. L'augmentation de la température semble par contre favoriser la dégradation de l'isatan A à pH 1. L'influence de ces paramètres sera étudiée lors de l'optimisation de la production du pigment en chapitre 3. L'hydrolyse enzymatique au sein de la feuille ou dans l'extrait aqueux acide de feuilles est l'hypothèse la plus probable pour expliquer la disparition de l'isatan A et de l'isatan B à pH 3. Toutefois, la ou les enzymes responsables de l'hydrolyse des précurseurs n'ont pas jamais été identifiées.

Lors de ces études, une méthode rapide permettant de savoir si les précurseurs étaient toujours présents ou s'ils avaient été hydrolysés en indoxyle, a consisté à ajouter en excès une solution de NaOH après les essais à différents pH, températures et avec ou sans β-glucosidase. La conversion des précurseurs du Pastel en indigo à pH basique est en effet bien connue [102,141], donnant un précipité bleu instantanément. Les réactions mises en jeu et la réactivité de l'isatan A et de l'isatan B en milieu acide ne sont en revanche pas décrites. Si les analyses par HPLC-ESI-HRMS de la réactivité des précurseurs en milieu acide ont permis de mettre en évidence la dégradation de l'isatan A à pH1 à 60°C, elles n'ont cependant pas permis de détecter l'indoxyle. Il a donc été nécessaire d'utiliser une méthode permettant de suivre les précurseurs au moment de l'ajout de l'acide ou de la base afin de tenter de mieux comprendre leur réactivité et de détecter l'indoxyle.

2.4.2.3 Suivi en voltammétrie cyclique

La formation de l'indigo requiert la présence de dioxygène et fait donc intervenir des réactions d'oxydo-réduction. L'électrochimie peut apporter des informations, en particulier sur les potentiels redox des composés impliqués. La voltammétrie cyclique (VC) est une méthode permettant de mesurer le potentiel redox d'une molécule en solution et de suivre sa concentration par la mesure du courant. Un balayage de potentiel aller-retour est effectué à l'électrode. Au balayage aller, les espèces électro-actives (oxydation ou réduction) sont transformées ce qui se traduit par un pic au potentiel redox de l'espèce. Au balayage retour, les espèces transformées sont susceptibles d'être électro-actives et subissent un transfert électronique inverse (réduction ou oxydation) pour des systèmes réversibles. Cette méthode électrochimique est appliquée au suivi des réactions et à la détermination des potentiels redox des divers composés mis en jeu. Les mesures sont réalisées à une électrode de carbone vitreux, sous atmosphère d'argon (dégazage et maintien) pour limiter l'action du dioxygène. A la fin de chaque essai, une solution de NaOH à 2M a été ajoutée en excès afin de forcer l'apparition d'indigo.

Avant que la purification de l'isatan A et de l'isatan B ne soient réalisée, les premiers essais ont été menés avec l'indican. Les chromatogrammes UHPLC-ESI-HRMS avaient montré dans le chapitre 2.3.1 que ce précurseur était toujours détecté dans des aliquots d'extraits aqueux acides après deux heures et dans les aliquots d'extraits aqueux basiques pendant une heure. Comme dans le chapitre 2.2.3.1, l'indican a été solubilisé dans de l'eau à pH 3, à une concentration de 2 mM, puis a été analysé avec une électrode de carbone vitreux à t = 0h, t = 4h et t = 24h (Figure 38). Le pic d'oxydation de l'indican est visible dès le t = 0h à 0,72V, mais sans pic retour dans les valeurs négatives, le système est donc irréversible. Au bout de 23h, le voltammogramme est pratiquement inchangé ; des petits pics sont apparus et ont été attribués au couple de l'indigo issu de l'oxydation par O_2 (le maintien sous argon n'étant pas parfait). La dégradation de l'indican est donc très faible à pH 3.

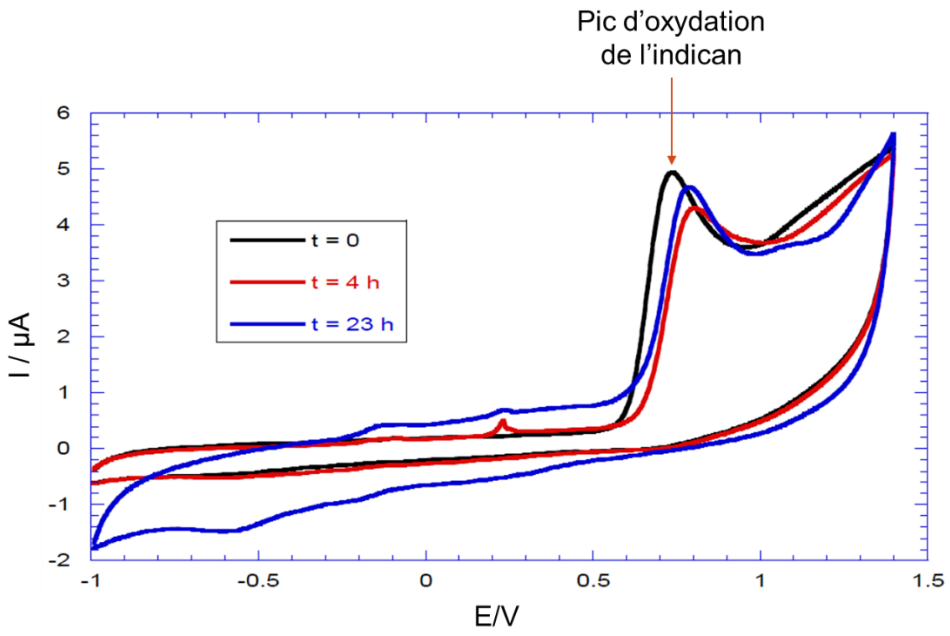


Figure 38 - Voltammogramme de suivi de l'indican (2 mM) à pH 3 pendant 23h avec une électrode de VC, vitesse de balayage 0,1 V/s

Le même essai a été réalisé en solubilisant l'indican (2 mM) dans un milieu aqueux à pH inférieur à 1 (Figure 39). Le pic d'oxydation de l'indican a toujours été visible jusqu'à t = 3h mais a diminué à t = 22h, jusqu'à disparaitre à t = 23h. En parallèle, un pic de réduction est apparu à -0,2 V et un précipité bleu s'est formé dans la solution acide. Il est possible que ce pic de réduction soit le résultat d'une hydrolyse de l'indican et de la formation d'indigo. L'indican est resté stable dans ces conditions jusqu'à t = 4h, tout comme l'isatan A et l'isatan B sont restés stables dans une solution de pH 1 pendant une heure. L'indican n'a pas été hydrolysé en condition de production du pigment à pH 3 jusqu'à t = 4h, ce qui corrèle avec les résultats obtenus sur des aliquots d'extraits aqueux acides de feuilles.

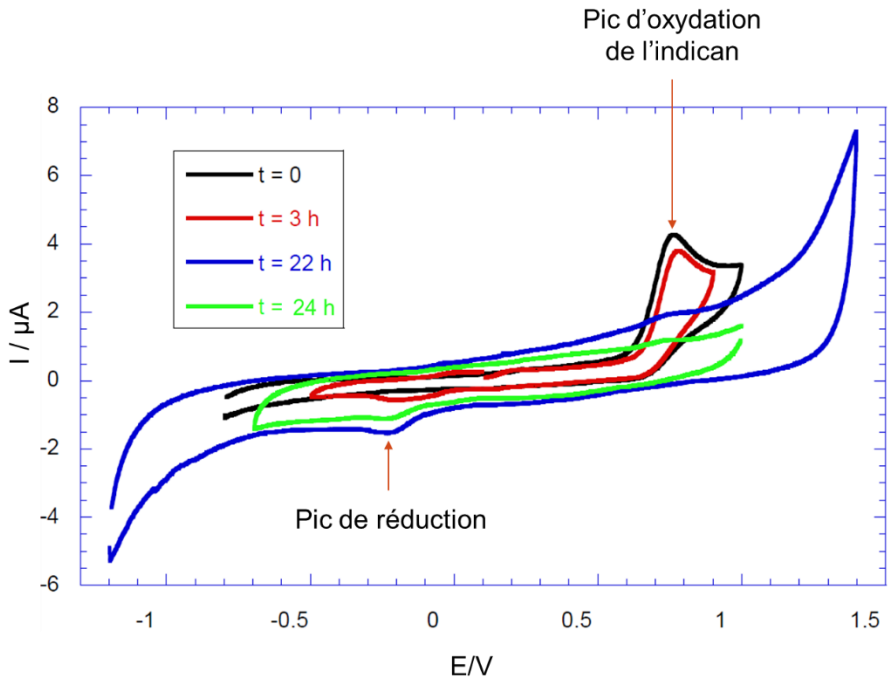


Figure 39 - Voltammogramme de suivi de l'indican (2 mM) à pH inférieur à 1 pendant 24h avec une électrode de VC, vitesse de balayage 0,1 V/s

En parallèle de ces essais, de l'indican a été solubilisé dans une solution aqueuse neutre puis du NaOH à 1M a été ajouté. Sur le voltammogramme présenté Figure 40, le pic d'oxydation de l'indican est apparu à 0,75 V, sans pic retour. Comme aucun autre pic est apparu, l'indican semble donc stable en milieu alcalin.

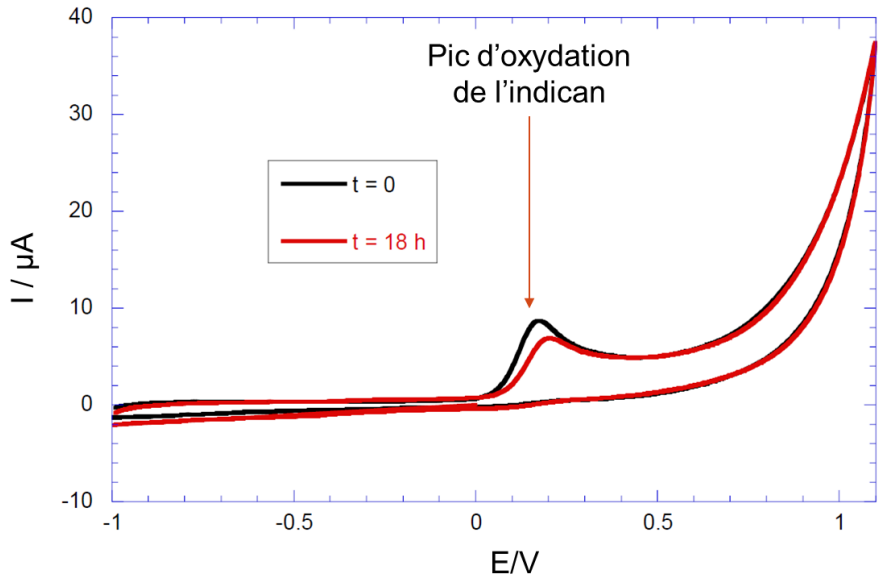


Figure 40 - Voltammogramme de suivi l'indican (2 mM) à pH 10,5 pendant 18h avec une électrode de VC, vitesse de balayage 0,1 V/s

Pour le dernier essai mené sur l'indican, la β-glucosidase (ase) a été ajoutée à la solution aqueuse d'indican à température ambiante à pH 3 et la solution a été bullée avec de l'argon afin de limiter les interactions avec l'oxygène de l'air. Au cours de l'expérience, la solution s'est colorée en vert clair, mais aucun précipité bleu n'est apparu. Le voltammogramme Figure 41 a montré de nombreux pics, dont celui de l'oxydation de l'indican à 0,72 V à t = 0 min, dont l'intensité a diminué jusqu'à t = 17 min. Un pic est apparu à 1,2 V, présent depuis le début jusqu'à t = 17 min. Enfin, un pic à 0,22 V n'est apparu qu'à la fin de l'essai à t = 17 min. L'intensité de ce dernier a semblé augmenter alors que le pic de l'oxydation de l'indican a diminué, suggérant donc qu'il s'agit du pic d'oxydation de l'indoxyle formé. Cette évolution des voltammogrammes semble indiquer que l'indican a été hydrolysé par l'enzyme, stable à ce pH, et que les deux autres pics correspondent à l'oxydation du sucre (à 1,2 V) et de l'indoxyle (à 0,22 V) formés. La réaction d'hydrolyse a été rapide, dès quelques minutes, et l'indoxyle formé s'est avéré stable sous argon. Comme l'indican est toujours détectable dans les extraits aqueux acides de feuilles fraiches intactes, on peut émettre l'hypothèse que (i) la plante ne possède pas de β-glucosidase, ce qui est peu probable, cette enzyme étant ubiquitaire et décrite dans d'autres plantes à indigo (citer Minani 1999), ou que (ii) la β-glucosidase n'est pas active dans les conditions de production du pigment, c'est à dire en milieu aqueux à chaud (50-60°C) et à pH acide (pH = 2-3).

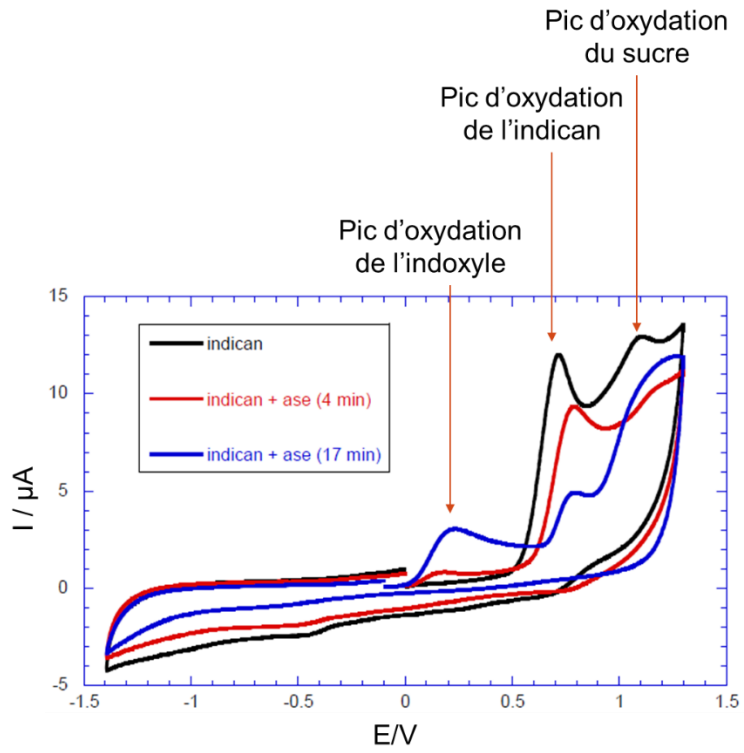


Figure 41 - Voltammogramme de suivi l'indican (2 mM) à pH 3, en présence de β-glucosidase, pendant 18h avec une électrode de VC, vitesse de balayage 0,1 V/s

Ces réponses en milieu acide semblent indiquer un comportement différent de l'indoxyle en fonction du pH. A pH 3, l'indoxyle serait sous une forme stable, probablement sous forme cétonique, tandis que la forme présente à pH 10,5 lors d'ajout de NaOH en excès pour forcer la formation de l'indigo serait une forme énolique, plus instable (Figure 42). La forme instable conduirait alors à la formation d'indigo, mais seulement en présence d'oxygène.

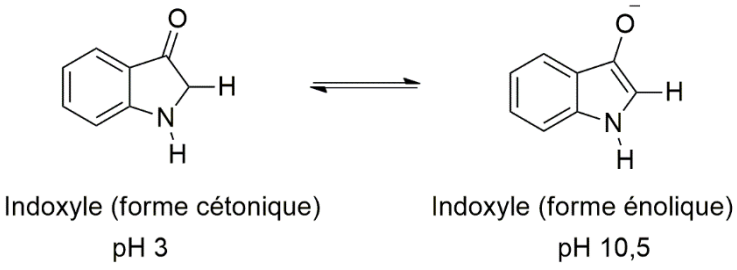


Figure 42 - Indoxyles sous forme cétonique (pH 3) et sous forme énolique (pH 10,5) en solution aqueuse

Les fractions enrichies en isatan A et en isatan B ont été mises en solution aqueuse à pH 3 puis une électrode a été immergée dans les solutions, qui ont été bullées

à l'argon. A la fin de l'essai, la cellule contenant l'isatan B a été chauffée au décapeur thermique, afin d'atteindre une température de 60°C. Les voltammogrammes sont présentés sur la Figure 43 (a) et (b). Pour chacun des précurseurs, un pic d'oxydation de l'isatan a été observé. Toutefois, aucun pic d'oxydation de l'indoxyle n'a été relevé sur les voltammogrammes de l'isatan A et de l'isatan B. Dans les conditions de production du procédé 1, les précurseurs ne semblent donc pas s'hydrolyser.

Lors d'un second essai, la β-glucosidase a été ajoutée aux solutions à pH 3 d'isatan A et d'isatan B. Seule la solution d'isatan B a été chauffée au décapeur thermique (courbe bleue « DT » sur la Figure 43 (b)). En suivant les voltammogrammes pendant 20 minutes (Figure 43 (a) et 43 (b)), aucun autre pic n'est apparu dans les solutions, indiquant que l'isatan A et B n'ont pas été hydrolysés dans ces conditions. Seul l'ajout de NaOH a permis d'observer un précipité bleu au fond des solutions au bout de quelques minutes. Dès lors, on peut affirmer que ces deux précurseurs ne sont pas sensibles à cette enzyme dans les conditions de production que cette β-glucosidase testée n'est pas responsable de l'hydrolyse de l'isatan A à température ambiante et de l'isatan B même après chauffage. Cette expérience de voltammétrie cyclique conforte l'hypothèse émise en chapitre 2.3 que l'isatan A et B ne sont pas hydrolysés en milieu aqueux acide à chaud, et que d'autres enzymes semblent être responsables de leur hydrolyse dans ces conditions. Une purification des enzymes du Pastel et des essais sur les fractions enrichies en isatan A et en isatan B pourraient être envisagés à l'avenir.

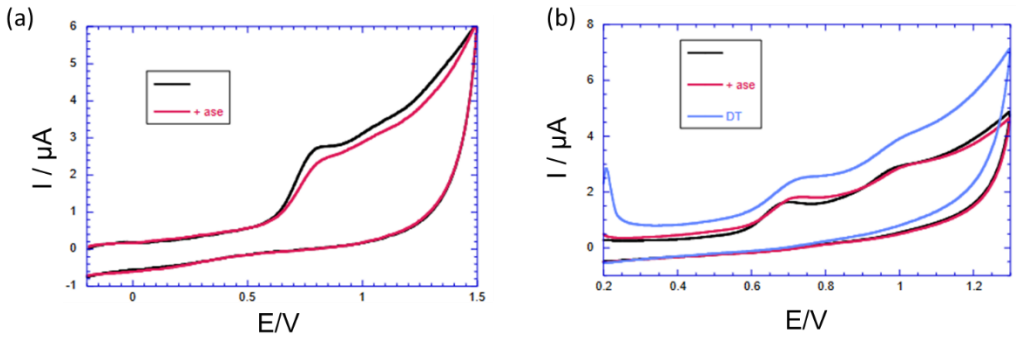


Figure 43 – Voltammogrammes de suivi de l'isatan A (1 mg/mL) à pH 3 à température ambiante, avec et sans β-glucosidase, pendant 20 minutes (a) et de l'isatan B (1 mg/mL) à pH 3, avec et sans β-glucosidase, à 60°C, pendant 20 minutes (b) avec une électrode de VC, vitesse de balayage 0,1 V/s. La courbe bleue (DT) du voltammogramme (b) correspond à un essai avec un pistolet de chauffage

Ces travaux menés sur la réactivité de l'isatan A et de l'isatan B dans les conditions d'extraction aqueuse ont permis d'apporter quelques réponses aux nombreux questionnements qui entourent la production du pigment. Premièrement, nous avons montré que l'hydrolyse des précurseurs lors de la première étape de la production n'est pas due uniquement à la température ou à l'acidité du milieu. Par ailleurs, les précurseurs isolés ont été plutôt stables dans ces conditions pendant quelques heures. En voltammétrie cyclique, les expériences menées sur l'indican ont pu mettre en évidence que l'indoxyle résultant de l'hydrolyse enzymatique du composé avait un comportement différent en milieu acide et en milieu basique. En effet, l'indoxyle sous forme cétonique en milieu acide resterait stable et ne se convertirait pas immédiatement en indigo, contrairement à la forme énolique présente dans le milieu basique, ce qui expliquerait que l'indigo se forme plus rapidement en milieu basique [142].

2.5 Bilan et perspectives de l'étude des précurseurs de l'indigo

Au sein de ce chapitre 2, les précurseurs de l'indigo ont pu être identifiés puis étudiés. Une déréplication des extraits méthanoliques de feuilles de Pastel a été réalisée par UHPLC-ESI-HRMS, permettant notamment d'identifier les deux précurseurs majoritaires de l'indigo dans cette plante, l'isatan A et l'isatan B. C'est à partir de ces extraits méthanoliques que le suivi de la teneur en précurseurs dans les feuilles fraiches a pu être mis en place, permettant d'une part de comparer des lots de jeunes feuilles et de feuilles plus âgées, ainsi que différents lots de plantes récoltés entre 2020 et 2022, et d'autre part d'analyser la stabilité des précurseurs au sein d'un même lot pendant quelques jours après la récolte. Les résultats de cette étude ont confirmé que les jeunes feuilles du cœur de la rosette de Pastel étaient plus riches en précurseurs que les feuilles en périphérie de la rosette. Ils ont également montré que les précurseurs étaient présents tout au long de l'année dans les plants, et qu'ils étaient stables pendant plusieurs jours après la récolte, mais avec des teneurs variables selon les récoltes. Ces variations peuvent être attribuées aux conditions environnementales, mais aussi l'instabilité des

précurseurs. Cette labilité a constitué un obstacle majeur à la mise en œuvre des différentes expériences de ce projet. Des études sur la stabilité des précurseurs dans le temps, au sein des feuilles, ou après leur extraction ont dû être mises en place afin de pouvoir les analyser, les purifier et étudier leur réactivité. Il n'a cependant pas été possible d'isoler les précurseurs en quantité suffisante pour mettre en place un dosage systématique des précurseurs dans les feuilles, ou encore pour étudier leur réactivité de manière plus approfondie par voltammétrie cyclique et par Résonnance Paramagnétique Electronique afin de déterminer si la réaction de dimérisation des indoxyles passe par une intermédiaire radicalaire.

Néanmoins, après avoir mis au point les conditions de conservation des extraits afin de limiter la dégradation de l'isatan A et de l'isatan B, l'étude de leur réactivité a été réalisée sur des fractions enrichies dans les conditions de production du pigment. Les précurseurs n'étaient pas détectables dans des extraits aqueux de feuilles fraiches, probablement déjà hydrolysés lors de l'analyse UHPLC-ESI-HRMS. Des études de l'influence des paramètres d'extraction lors de la production du pigment ont été menés sur des fractions enrichies en isatan A et en isatan B. Les analyses UHPLC-ESI-HRMS et des résultats de voltammétrie cyclique ont révélé que la température et le pH du milieu d'extraction n'étaient pas responsables de l'hydrolyse des précurseurs. Il semblerait que des enzymes foliaires ou provenant de microorganismes symbiotiques soient responsable de cette hydrolyse.

Grâce à ces études, il a pu être possible d'établir que les feuilles de Pastel étaient exploitables tout au long de l'année à l'état frais pour la production de pigment indigo. La nature labile des précurseurs doit néanmoins être prise en compte, afin d'optimiser leur extraction de la feuille tout en maitrisant leur hydrolyse afin que l'indigo ne soit pas formé trop précocement lors de la première étape de production. Le chapitre suivant est donc consacré à l'optimisation des conditions d'extractions des précurseurs du Pastel pour la production du pigment bleu, et à l'analyse de la qualité des pigments obtenus.

Chapitre 3 – Production du pigment indigo

La production moderne de pigment indigo issu d'*Isatis tinctoria* a été décrite à la fin des années 90'. Comme vu au chapitre 1.4.2., quelques articles sortis lors du projet SPINDIGO ont eu comme objectif d'améliorer cette production [143,144]. Les limitations du procédé utilisé étaient notamment des rendements faibles en pigment et d'une qualité très variable. Si plusieurs études ont démontré l'importance de certains paramètres de récolte et de production, comme le pH acide et la température permettant une meilleure diffusion des précurseurs dans le milieu, peu de travaux d'optimisation de ces paramètres ont été mises au point.

Au cours de ce chapitre, les différents facteurs pouvant influencer le procédé d'extraction du pigment ont été étudiés à l'échelle du laboratoire. Pour ce faire, les différents paramètres importants ont étés optimisés au travers de plans d'expériences.

Les conditions optimales sélectionnées ont ensuite été mises en œuvre lors d'un essai pilote se rapprochant de l'échelle industrielle.

En parallèle, une méthode de dosage de l'indigo a été développée afin de pouvoir calculer une concentration d'indigo dans le pigment de manière fiable et répétitive.

3.1 Extraction du pigment indigo à l'échelle du laboratoire

3.1.1 Mise en place du procédé d'extraction du pigment indigo

Le procédé de production du pigment indigo de Pastel est inspiré de celui développé par Stoker et al. en 1998 [33]. Il comprend une étape d'immersion des feuilles après récolte dans de l'eau chaude acidifiée, ce qui permet la diffusion et l'hydrolyse des précurseurs dans le milieu aqueux, puis une étape de filtration. L'extrait est ensuite basifié afin de convertir les indoxyles en indigo. Le pigment formé est finalement filtré, puis séché et pesé.

La méthode de production utilisée au LCA a été mise au point lors de travaux antérieurs portant sur le développement du procédé à l'échelle industrielle. Lors de ces travaux, les paramètres de pré-lavage des feuilles, de températures, de pH, de durée d'extraction ainsi que la nature de l'acide et la nature de la base employée pour la précipitation avaient été étudiés au stade laboratoire mais non optimisés (Tableau 3). La

qualité du pigment était alors uniquement estimée par colorimétrie en comparant le pigment produit à un pigment standard.

Tableau 3 - Paramètres étudiés lors des essais préliminaires d'optimisation de production de 2016

	Paramètres étudiés	Niveau des paramètres
Etat feuilles	Pré-lavage	Oui
		Non
Extraction	pH	3
		5
	Nature acide	Acide chlorhydrique
		Acide citrique
		Acide oxalique
		Acide sulphurique
		Acide phosphorique
	Température (°C)	52
		60
	Durée d'extraction (min)	30
		60
		70
	Milieu d'extraction	Eau robinet
		Eau distillée
Précipitation	pH	3
		5
	Nature base	NaOH
		CaOH

A l'issue de cette étude, les étapes du procédé suivantes ont été retenues :

- un prélavage des feuilles avec 30g/L de SDS
- une extraction des précurseurs en immergeant les feuilles dans de l'eau du réseau, à 60°C, acidifiée à pH 3 avec de l'acide chlorhydrique et pendant une heure,
- une précipitation de l'extrait à température ambiante et avec l'ajout de NaOH pour arriver à un pH de 10,5
- une filtration de l'extrait sur un filtre de porosité 100 µm,
- puis un séchage du pigment récupéré.

Ces étapes ainsi que les paramètres utilisés lors de ce projet ont servi de base pour le projet NewCocagne. Seul le prélavage des feuilles avec un tensio-actif n'a pas été retenu pour des raisons techniques.

Dans un premier temps, les productions ont été réalisées dans un réacteur de 5L, avec l'inconvénient de ne pouvoir faire que des duplicats successifs sur une journée. A chaque récolte, une matière sèche a été réalisée pour estimer un rendement de pigment par rapport à la masse de feuilles sèches.

La qualité du pigment a été évaluée dans un premier temps par colorimétrie. Le résultat est donné sous forme de coordonnée chromatiques L*ab et comparées avec un pigment de référence. La différence de ces coordonnées entre l'échantillon et le témoin est représenté par un ΔE ; plus le ΔE est bas, plus l'échantillon a une teinte proche du témoin et est admis comme étant « de qualité ».

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

Cette méthode n'étant qu'une méthode comparative, elle présente l'inconvénient de ne pas permettre une estimation réelle de la concentration en indigo dans le pigment. La recherche d'une méthode de dosage de l'indigo plus précise a donc été menée.

3.1.2 Développement d'une méthode de dosage de l'indigo dans le pigment

3.1.2.1 Spectrophotométrie UV-visible

Comme expliqué en chapitre 1.1, l'évaluation de la concentration en indigo dans un pigment est difficile à réaliser étant donné la faible solubilité de l'indigo dans la plupart des solvants. L'indigo commercial peut tout de même être solubilisé à faible concentration dans du THF ou du DMF grâce à l'application d'ultrasons. Une mesure du spectre UV de la solution a montré que l'absorbance maximale de l'indigo dans le domaine du visible était à la longueur d'onde λ=611. La suite de ce travail a été réalisée par Clément Chastrette, ingénieur d'étude au LCA.

Les premières gammes étalons ont été réalisées avec un minimum d'indigo commercial solubilisé dans du THF par ultrasons. Cependant, il a été observé que l'indigo a précipité au bout de quelques heures dans les fioles. Ces dernières ont été repassées aux ultrasons et après filtration, il s'est avéré qu'une partie de l'indigo s'est agglomérée

et ne se solubilisait pas entièrement dans le solvant. Des essais identiques ont été réalisés dans du DMF et, même-si la solubilisation semblait plus efficace, les mêmes problèmes sont apparus.

Pour contourner ce problème il a fallu être en mesure de travailler avec des solutions étalons encore plus diluées. Afin de préparer des solutions d'indigo de très faible concentration en utilisant à la fois des pesées significatives de pigment ou d'indigo et en limitant la quantité de DMF utilisé, il a été décidé de préparer les solutions en deux temps. Dans un premier temps, une quantité significative de pigment solide a été dispersé dans du bromure de potassium (KBr), par broyage avec un pilon. Dans un second temps, 10mg de l'homogénat a été prélevé pour être solubilisé dans du DMF sous ultrasons. Pour s'assurer qu'aucun agglomérat ne se forme dans la solution après sonication, celle-ci a été filtrée avant d'être lue au spectrophotomètre UV-visible. A partir de cette méthode, de nouvelles gammes d'étalonnage ont été réalisées (Figure 44).

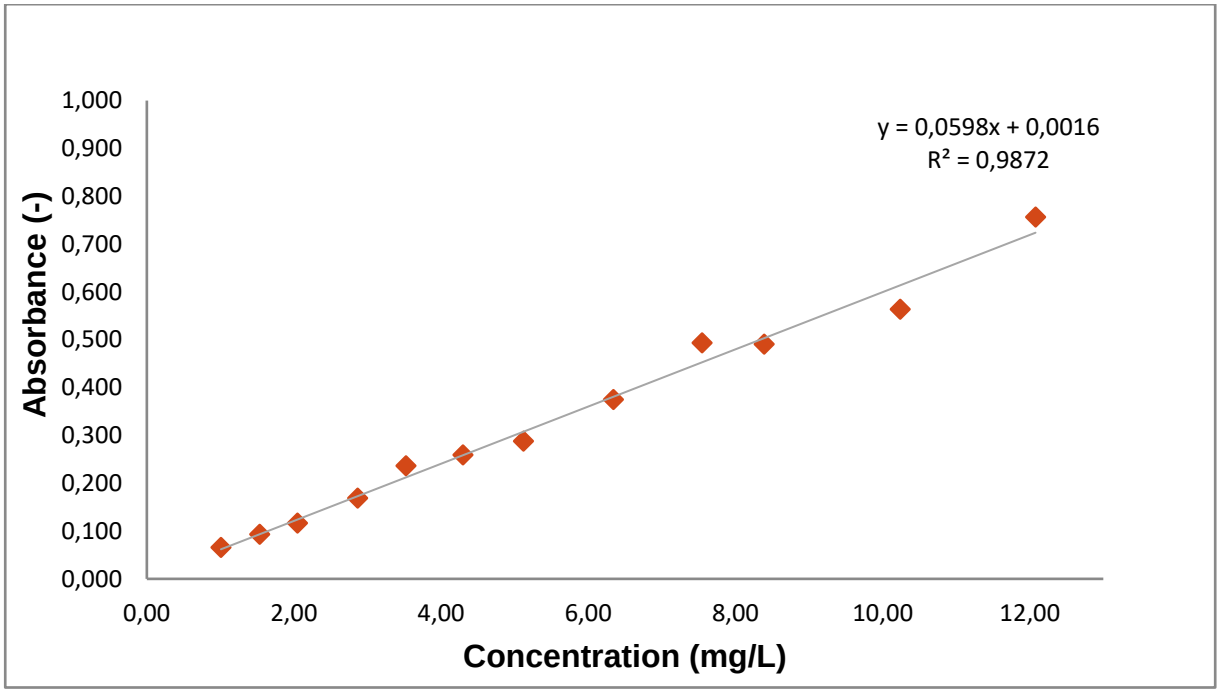


Figure 44 - Courbe d'étalonnage de l'indigo commercial dilué dans du KBr puis solubilisé dans du DMF

Plusieurs essais ont montré que cette méthode était fiable et reproductive. Les solutions doivent toutefois être préparées et analysées rapidement, puisque de l'indigo précipité a été observé 24h après la préparation de la solution.

Cette méthode de quantification permet le dosage de l'indigo dans le pigment, apportant une information importante pour l'optimisation du procédé d'extraction. Elle permet également d'estimer la concentration d'indigo extrait d'une quantité de feuilles sèches, exprimée en $g_{indigo}/kg_{feuilles\ sèches}$.

D'autres méthodes de dosage ont été testées en parallèle par RMN, cette fois-ci dans l'objectif de pouvoir estimer la concentration en indigo, mais également de certaines impuretés connues, comme l'indirubine.

3.1.2.2 RMN

La RMN est une technique spectroscopique permettant d'identifier les composés présents dans un mélange. Si les signaux sont bien définis et résolus, elle constitue également une technique quantitative de choix pour doser les composés en mélange, notamment au sein d'un extrait brut de plante par RMN du proton [145]. Contrairement à la spectrophotométrie UV-visible qui ne nous a permis de doser que l'indigo, cette méthode pourrait permettre de détecter et doser simultanément d'autres composés présents dans le pigment, tel que l'indirubine. En revanche, les obstacles sont les mêmes que ceux cités en spectrophotométrie, à savoir une mauvaise solubilité des pigments dans la plupart des solvants, et donc dans les solvants deutérés. Une première étape a donc consisté à analyser les témoins seuls et en mélange pour s'assurer de la fiabilité de cette méthode.

RMN liquide

De l'indigo et de l'indirubine commerciaux ont été solubilisés dans différents solvants deutérés : THF, DMSO, DMF et pyridine. En RMN du proton, les signaux de l'indigo étaient faibles, même en augmentant la concentration jusqu'à 10 mg/mL. Concernant l'indirubine, les signaux étaient plus intenses. Des mélanges indigo/indirubine (2/1) ont également été analysés, après sonication, dans différents solvants ou mélanges de solvants, à 23°C ou à 40°C, mais aucune de ces conditions n'a permis de solubiliser totalement l'indigo, rendant donc impossible son dosage par RMN du proton en liquide.

Face à ces problèmes de solubilité, nous avons alors évaluer la possibilité de doser l'indigo et les autres composés du pigment par RMN du solide.

RMN du solide

La RMN du solide du carbone permet de s'affranchir des problèmes de solubilité de l'indigo, puisque les pigments sont analysés cette fois sans être préalablement mis en solution. Pour cette étude, une collaboration a été mise en place avec Yannick Coppel, ingénieur de recherche du service de RMN du Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC). Pour des essais préliminaires, l'indigo et l'indirubine commerciaux ont été analysés seuls, en RMN du solide du ^{13}C, étant donné que la RMN du solide du proton conduit à un élargissement trop important des signaux ne permettant donc pas d'envisager une analyse quantitative [146]. Les spectres sont présentés en Figure 45 et Figure 46. Les signaux ont été identifiés en se basant sur les déplacements chimiques décrits dans la littérature [19,147]. L'analyse des spectres RMN du solide du ^{13}C de l'indigo et de l'indirubine a permis d'identifier des signaux caractéristiques permettant de distinguer les deux molécules. Par exemple, le signal des carbonyles C-3 et C-3' de l'indigo à 188,5 ppm est différent de ceux des C=O de l'indirubine, le C-3 résonnant à 185,5 ppm et le C-3' à 173,3 ppm. De même, le signal des C-7/C-7' de l'indigo à δ 152,2 ppm est plus déblindé que les deux signaux des C-7 et C-7' de l'indirubine (δ = 150,4 et 121,6 respectivement).

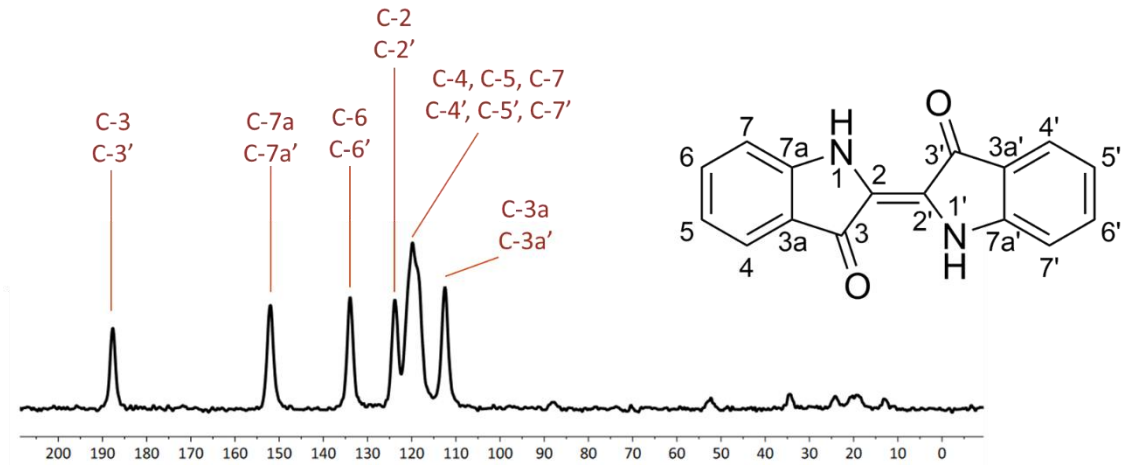


Figure 45 - Spectre de RMN du solide du ^{13}C de l'indigo

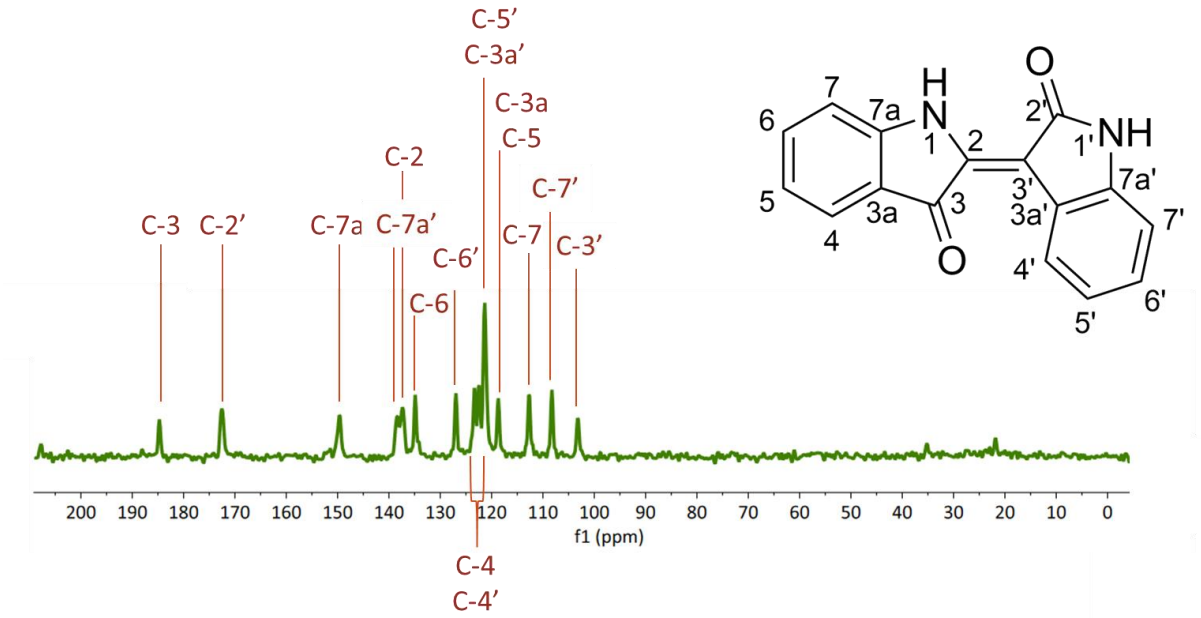


Figure 46 - Spectre de RMN du solide du ^{13}C de l'indirubine, en s'inspirant de l'étude de Alkorta et al. de 2020 [147]

La possibilité de discriminer des signaux de l'indigo de ceux de l'indirubine en RMN ^{13}C nous a conduit à analyser différents pigments afin d'estimer le ratio indigo / indirubine dans un pigment, en intégrant les signaux entre 140 et 200 ppm.

Trois pigments produits en septembre 2021 nommés PE2-FF6, PE2-FF14 et PE2-FF9, contenant respectivement 21%, 9% et 4% d'indigo ont été sélectionnés pour tenter de discerner et d'intégrer les signaux de l'indigo et de l'indirubine en mélange. Les spectres RMN du solide du ^{13}C de ces pigments (Figure 47) ont montré la présence des signaux correspondant à l'indigo et à l'indirubine et l'intégration des signaux entre 140 et 200 ppm a ensuite permis de proposer un $ratio_{indigo/indirubine}$. Il a ainsi été estimé que PE2-

FF6 possédait un ratio$_{indigo/indirubine}$ de 65/35 (+/- 5%), PE2-FF14 un ratio $_{indigo/indirubine}$ de 50/50 (+/- 5%) et PE2-FF9 un ratio $_{indigo/indirubine}$ de 30/70 (+/- 5%).

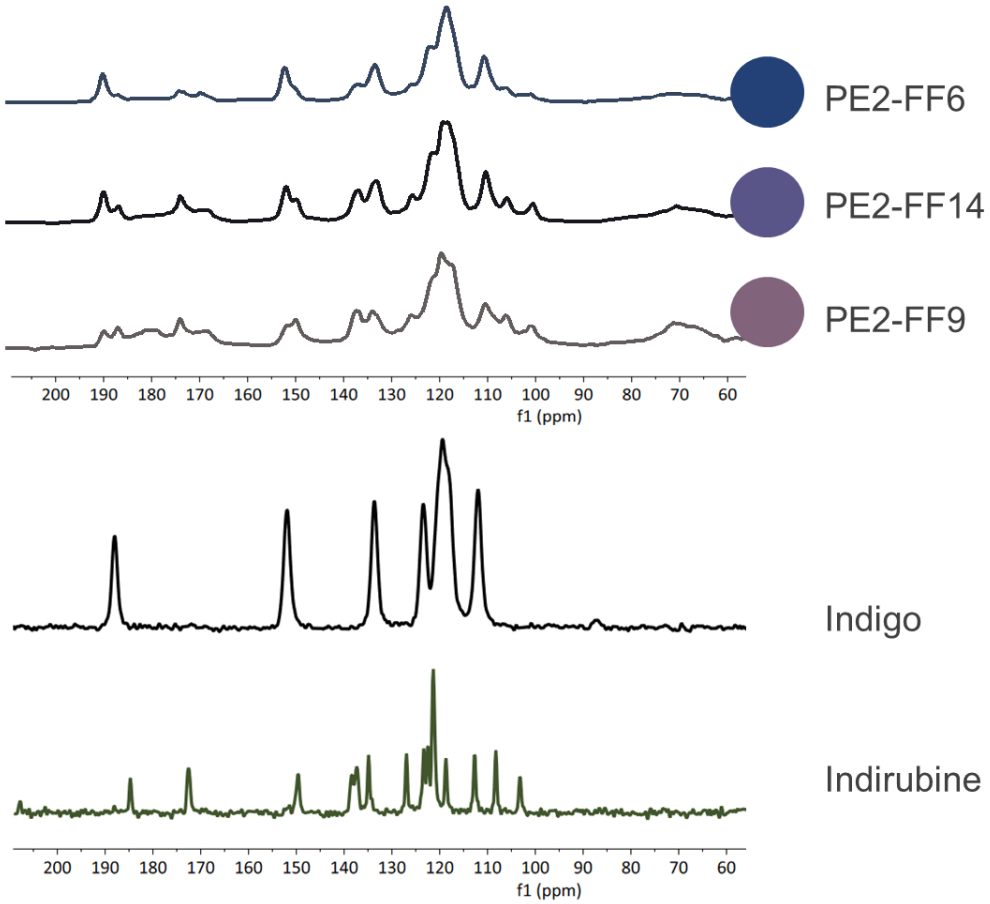


Figure 47 - Spectre de RMN du solide du ^{13}C de trois pigments obtenus en septembre 2021

Cette méthodologie nous a donc permis d'estimer la quantité d'indirubine présente dans un pigment. On a ainsi pu constater que les pigment FF6 (21% d'indigo), FF14 (9% d'indigo) et FF9 (4 %) contenait respectivement 11%, 9%, et 9% d'indirubine. Contrairement à l'indigo, la concentration en indirubine semblerait donc assez stable dans les pigments.

A ce jour, plus de 60 composés, dont de nombreux dérivés indoliques, ont été isolés et identifiés au sein de pigments produits à partir *d'Isatis indigotica* [148]. D'autres signaux sont effectivement observés sur les spectres, notamment vers 170 et 180 ppm, mais nous n'avons pas pu les attribuer. Des essais préliminaires d'analyses de pigments en RMN liquide n'ont pas non plus permis d'identifier d'autres composés, notamment en

raison de la faible solubilité de l'indigo ou d'autres pigments indigoïdes tels que l'isoindigo, la tryptanthrine, etc. dans les solvants deutérés.

Une méthode de quantification rapide de l'indigo a été mise au point en spectrophotométrie UV-visible, permettant d'évaluer la concentration en indigo dans un pigment. Une autre méthode de dosage a été développée en RMN solide, permet quant à elle d'estimer un ratio indigo/indirubine dans le pigment. Compte tenu de la meilleure accessibilité de la spectrophotométrie UV-visible pour nos dosages, seul le dosage de l'indigo a cependant pu être réalisé pour tous les pigments obtenus au cours de ce travail.

3.1.3 Suivi de la production de pigment indigo obtenue à partir des feuilles prélevées sur le champ de Terre de Pastel entre juin 2020 et juin 2021

Un suivi de la production de pigment indigo a été réalisé sur une année complète entre 2020 et 2021. Pour ce faire, des prélèvements réguliers ont été effectués entre juin 2020 et juin 2021 sur les parcelles du champ de Labège. Le protocole de référence décrit dans le chapitre 4.7.1 a été appliqué. Pour chaque essai, le rendement d'extraction a été calculé et le pigment a été caractérisé. Jusqu'en janvier 2021, la seule caractérisation était la mesure de la qualité du pigment obtenue par colorimétrie, cette mesure a ensuite été remplacée par le dosage de l'indigo qui a par la suite pu être mesuré sur tous les pigments déjà produits. Ce dosage permet une caractérisation plus précise et plus objective de la qualité du pigment. Le tableau 4 regroupe l'ensemble des résultats.

Tableau 4 - Rendements et concentrations en indigo des pigments produits avec la méthode standard

RECOLTE PASTEL				PIGMENT INDIGO				
Date prélèvement	Parcelle récoltée	Masse feuilles (g)	Masse sèche (%)	Quantité pigment (g)	Qualité (ΔE)	Pureté indigo ($g_{indigo}/g_{pigment}$)	η pigment ($g_{pigment}/kg_{MS}$)	η indigo (g_{indigo}/kg_{MS})
29/06/2020	Orientale	498	14	1,50	7,52	0,02	21,2	0,42
		499	14	3,21	8,25	0,02	**45,9**	0,92
07/07/2020	Orientale	503	15	1,21	5,48	0,02	16,6	0,33
19/10/2020	Orientale	500	15	1,11	5,6	0,06	14,6	0,88
		439	15	0,98	6,77	0,04	14,7	0,59
20/10/2020	Orientale	508	15	0,74	4,96	0,04	9,7	0,39
		515	15	1,53	3,13	0,03	19,6	0,59
10/11/2020	Orientale	509	15	0,46	5	0,02	6,0	0,12
18/11/2020	Orientale	500	15	0,50	8,8	0,07	6,6	0,46
		504	15	0,50	5,76	0,07	6,5	0,46
04/01/2021	Orientale	450	14	0,75	3,88	0,06	11,9	0,71
21/01/2021	Orientale	500	17	0,70	2,48	0,05	8,24	0,41
27/04/2021	Occidentale	509	10	0,85	-	0,11	16,7	**1,79**
		504	10	1,08	-	0,28	20,7	**5,73**
06/05/2021	Occidentale	401	13	0,57	-	0,22	10,9	**2,39**
		359	13	0,44	-	0,36	9,43	**3,40**

Le rendement d'extraction de pigment le plus important a été obtenu en juin 2020 avec 45,9 $g_{pigment}/kg_{feuilles\ sèches}$, mais qualitativement ce pigment était de médiocre qualité comparé au pigment de référence (ΔE de 8,25) avec un rendement faible en indigo (inférieur à 1g d'indigo/kg de feuilles sèches). Les concentrations les plus élevées en indigo dans le pigment ont été obtenues en avril et mai 2021. Elles correspondent aussi aux meilleurs rendements d'extraction d'indigo par quantité de feuilles fraiches traitées. Avec le climat doux et humide du printemps, cette période correspond à la période la plus propice pour la croissance des plants.

Cette étude a fait ressortir des variations importantes à la fois du rendement d'extraction du pigment et de la qualité du pigment en fonction des saisons, mais également en fonction des réplicats. Ces derniers ont été réalisés sur une même récolte en novembre, avril et mai et ont montré d'autre part des variations importantes aussi bien du rendement d'extraction du pigment que de la qualité du pigment et de la concentration

en indigo. Ces variations peuvent avoir différentes origines. Au niveau de la récolte, les feuilles ont été récoltées en sac puis placées quelques heures après récolte dans un réacteur d'extraction de 5 L. Les feuilles ont pu être plus ou moins sales, et la présence de terre a pu conduire à un taux d'impureté supérieur. D'autre part, ne disposant que d'un seul réacteur de 5 L, la réalisation des duplicatas n'a pu se faire que successivement et non simultanément, ce qui a pu entrainer des variations liées à l'instabilité des précurseurs à température ambiante. Le protocole de production en lui-même comporte plusieurs étapes : extraction acide, précipitation, filtration, qui n'ont pas été optimisées, et qu'il serait nécessaire d'étudier plus en détail.

Grâce à la méthode de dosage précédemment présentée, il a été possible de réaliser un suivi sur une année du taux d'indigo dans les pigments produits à partir de feuilles fraiches de Pastel en utilisant le protocole de référence développé en 2016 au LCA. Une variation importante à la fois du rendement en pigment et de sa pureté au cours des saisons a été mise en évidence. L'étude a également fait ressortir la nécessité d'optimiser les paramètres d'extraction sur des expériences simultanées.

3.2 Optimisation du procédé de production

Afin d'optimiser le procédé d'extraction des précurseurs de l'indigo, les paramètres influents ont été étudiés au travers de plans d'expériences. Cette étude a été réalisée par Clément Chastrette.

3.2.1 Méthodologie

En termes de méthodologie, le principal obstacle pour réaliser l'optimisation du procédé, est de pouvoir réaliser toutes les expériences sur une même récolte et sur un court laps de temps. Pour ce faire, un nouveau protocole opératoire a été définit afin d'étudier le procédé d'extraction et de mener les études d'optimisation. Le réacteur double enveloppe de 5L, trop limitant, a ainsi été remplacé par des récipients de 2L placés en bain marie pour le contrôle de la température. Avec ce système, il est possible de réaliser huit productions de pigment en simultané.

Un premier plan d'expérience a été mis en place pour vérifier l'intérêt d'un prétraitement de lavage des feuilles. Ensuite, afin de pouvoir étudier spécifiquement les paramètres de production, il a été décidé de réaliser une optimisation de l'étape d'extraction des précurseurs.

Pour chaque étude, la méthode des plans d'expériences a été utilisée. Ils ont l'avantage de permettre l'étude de différents facteurs, à plusieurs niveaux, tout en limitant le nombre d'essais à réaliser. Pour nos travaux, des plans de Doehlert ont été choisis (Figure 48). Ils permettent une répartition uniforme des points expérimentaux en minimisant le nombre d'essais. Le nombre d'essais est calculé à partir de l'équation :

$$n=k\,(k+1)+1$$, ou k est le nombre de facteurs.

Pour un plan à deux facteurs, le nombre d'essais sera de 7 essais, avec trois réplicats au centre du domaine, et pour un plan à trois facteurs, il sera de 13 avec trois réplicats au centre.

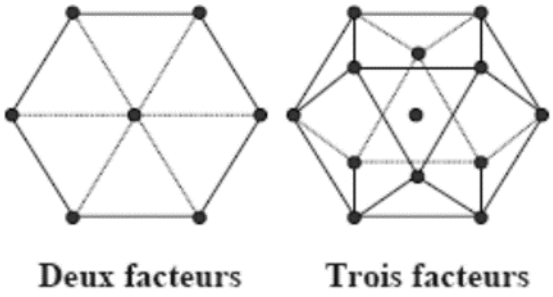


Figure 48 – Répartition des points expérimentaux sur les plans de Doehlert pour deux et trois facteurs

Les modèles mathématiques permettant l'analyse des résultats, pour 2 et 3 facteurs, sont décrit par les équations suivantes :

2 facteurs :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{12}X_1X_2 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2$$

3 facteurs :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2$$

Avec :
Y, la réponse du modèle ;
X_1, X_2 et X_3, les niveaux des variables associées aux différents facteurs 1,2 et 3;
a_0, la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude ;
a_1, a_2, a_3 les effets principaux des facteurs 1,2 et 3 ;
et a_{ij}, les interactions entre les facteurs i et j.

Un plan de Doehlert à 2 facteurs a servi de base pour mettre en place les expériences permettant d'étudier l'influence d'un pré-traitement des feuilles. Les 2 facteurs variants ont été la température (25 à 70°C) et le nombre de lavage (0 à 2). La représentation de la répartition des points d'expérience a conduit à une représentation déformée par rapport à un plan Doehlert classique du fait que dans le cas d'une absence de lavage il n'y a pas le paramètre de la température associé.

Pour l'étude des paramètres d'extraction deux plans d'expérience ont été successivement utilisés. Un premier plan Doehlert à 3 facteurs permettant d'étudier simultanément le pH (2 à 5), la température (25 à 60°C) et la durée d'extraction (1h à 3h)

a été mis en place. Un second plan Doehlert à 2 facteurs pour étudier plus précisément pH (1 à 4,3) et température (25 à 60°C) a été ajouté.

A l'instar de la partie 3.1, les réponses étudiées ont été :

- le rendement en pigment (η pigment) par rapport à la masse sèche de feuille ($g_{pigment}/kg_{MS}$)
- la pureté du pigment ($g_{indigo}/kg_{pigment}$)
- le rendement en indigo (η indigo) par rapport à la masse sèche de feuilles (g_{indigo}/kg_{MS})

3.2.2 Prétraitement des feuilles de Pastel

L'intérêt d'un prétraitement des feuilles de pastel avant extraction a été décrit par Stoker en 1998 [33]. Il le préconisait pour dégrader la pellicule de "cire" à la surface de celles-ci et ainsi faciliter l'extraction des précurseurs de l'indigo. Comlekcioglu et al. en 2015 ont confirmé qu'une température élevée du bain d'extraction permettait de faire fondre les cires de la surface des feuilles et améliorait l'extraction des précurseurs conduisant à une qualité du pigment indigo supérieure [73]. Un lavage des feuilles après récolte a également été évoqué dans les études de Garcia-Macias et al. en 2004 [39]. Ces travaux avaient conclu sur l'existence d'interaction entre les précurseurs hydrolysés et des composés non identifiés de la plante ou des impuretés du sol présentes sur les feuilles. Les impuretés avaient été identifiées comme étant des minéraux et des colloïdes, susceptibles d'être éliminés par simple rinçage.

Des essais de prétraitement ont été réalisé au LCA en 2016 en utilisant le dodécylsulfate de sodium (SDS) comme tensioactif. Ce surfactant était censé permettre la dégradation de certaines cires présentes sur la surface de la feuille [149]. Cependant, ce traitement avait mené à la formation d'une mousse résiduelle lors de la précipitation de l'indigo. C'est pourquoi l'utilisation du SDS dans nos essais n'a pas été retenue. En effet, il serait problématique dans le cadre d'un développement industriel. Pour éliminer les cires de la feuille et les impuretés du sol, il a été décidé d'employer seulement de l'eau, à différentes températures. Les paramètres étudiés ont été :

- le nombre de lavages,
- et la température de lavage.

Afin de limiter la solubilisation des constituants présents à l'intérieur de la feuille dans l'eau de lavage, la durée des lavages a été réduite au maximum. En pratique les feuilles ont été totalement immergées puis l'eau a été évacuée.

La température de lavage est un paramètre intéressant, qui peut permettre le ramollissement des cires présentes à la surface des feuilles. Son impact a été étudié entre 25 et 70°C.

Un plan d'expérience a été mis en place sur la base d'un plan de Doelhert à 2 facteurs : température de l'eau de rinçage et nombre de lavages. Il ne s'agit cependant pas d'un vrai plan Doelhert puisque dans le cas de l'absence de lavage, aucune température ne peut être associée au lavage. Il conviendra donc de considérer l'expérience ne présentant pas de lavage comme étant une référence et d'étudier séparément l'influence de la température pour un lavage, puis pour deux lavages. Le reste du protocole d'extraction est celui décrit en Chapitre 4.7.2. Le domaine expérimental est donné dans le tableau 5. Les variables réelles associées aux variables codées sont données en tableau 6.

Tableau 5 - Domaine de définition théorique du plan d'expérience PE1

	Température (°C)	Nombre de lavages
Maximum	70	2
Minimum	25	0
Pas	22,5	1
Point Central	47,5	1

Tableau 6 - Variables codées et variables expérimentales du PE1

	Variables codées		Variables réelles	
Echantillon	X1	X2	Température (°C)	Nombre de lavage
PE1-FF1	0	0	47,5	1
PE1-FF2	1	0	70	1
PE1-FF3	0,5	1	58,75	2
PE1-FF4	-0,5	1	36,25	2
PE1-FF5	-1	0	25	1
PE1-FF6	-	-1	-	0
PE1-FF7	-1	0	25	1
PE1-FF8	-1	0	25	1

Les résultats obtenus dans le cadre du plan d'expérience PE 1 sont reportés dans le tableau 7. Une représentation des résultats est donnée en Figure 49. La Figure 50 illustre la solubilisation des pigments dans du DMF avant leur lecture en spectrophotométrie UV-visible.

Tableau 7 - Récapitulatif des résultats du plan d'expérience PE1 sur le prélavage des feuilles fraiches de Pastel

PLAN D'EXPÉRIENCE		**RECOLTE**	**PRÉ-TRAITEMENT**		**EXTRACTION AQUEUSE ACIDE**			**PIGMENT INDIGO**			
	Code	Date extraction	Température lavage (°C)	Nombre lavages	pH acide	Consigne bain marie (°C)	Durée extraction (min)	Pureté indigo ($g_{indigo}/g_{pigment}$)	η pigment ($g_{pigment}/kg_{MS}$)	η indigo (g_{indigo}/kg_{MS})	Couleur pigment (DMF)
PE1	PE1-FF1	24/08/2021	70	1	3	60	60	0,06	0	0	
	PE1-FF2	24/08/2021	58,75	2	3	60	60	0,09	10,9	1,0	
	PE1-FF3	24/08/2021	36,25	2	3	60	60	0,10	19,2	2,0	
	PE1-FF4	24/08/2021	25	1	3	60	60	0,09	**22,1**	2,0	
	PE1-FF5	24/08/2021	-	0	3	60	60	0,11	19,3	2,1	
	PE1-FF6	24/08/2021	25	1	3	60	60	0,11	14,8	1,8	
	PE1-FF7	24/08/2021	25	1	3	60	60	0,11	**19,6**	**2,3**	

Les valeurs obtenues pour les expériences FF5, FF7 et FF8, correspondant au triplicat, ont montré une forte dispersion traduisant une faible reproductibilité des extractions. Les valeurs des différents écarts-types relatifs sont données Figure 49.

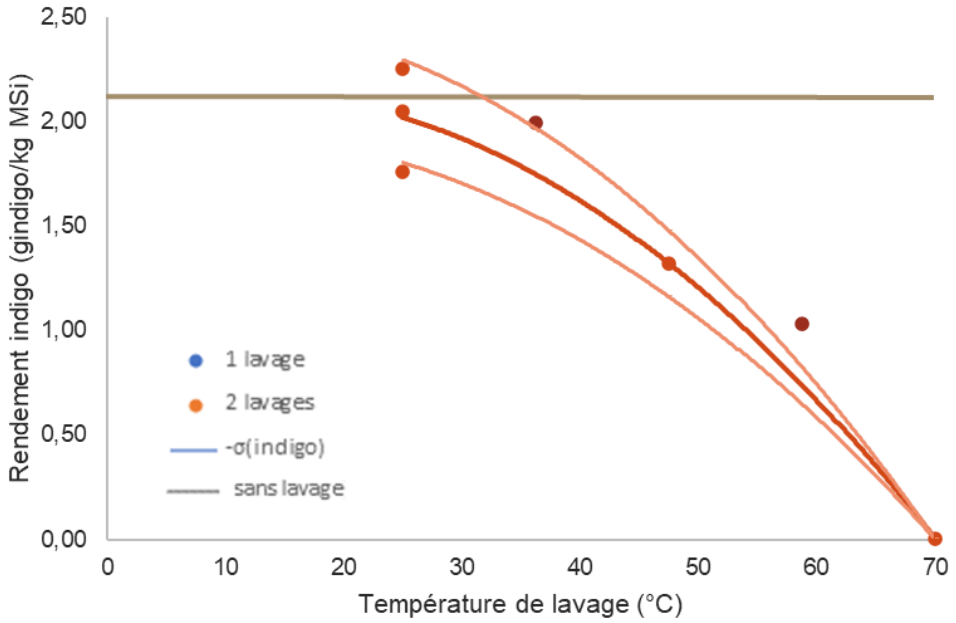


Figure 49 - Influence du prétraitement par lavage des feuilles de pastel sur le rendement en indigo (σ_{indigo} correspond à l'encadrement de la courbe « 1 lavage » en tenant compte de l'écart type calculé sur le triplicat)

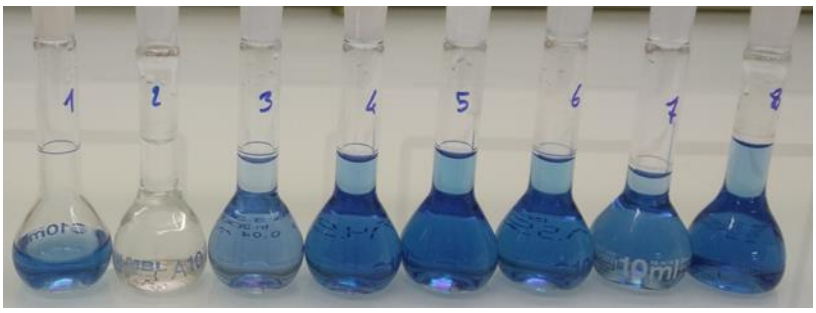


Figure 50 - Pigments extraits à partir des essais PE1-FF1 à PE1-FF8 resolubilisés dans du DMF

Malgré l'écartype élevé, il apparait très clairement que la température de lavage a un rôle négatif sur le rendement en indigo (figure 49). Le second lavage a présenté une courbe similaire à celle d'un seul lavage et semble indiquer que le nombre de lavages n'a pas d'influence sur les rendements en indigo.

Ces expériences montrent à priori le peu d'intérêt de l'étape de rinçage, cependant dans ces essais, seul le cœur des rosettes a été utilisé pour l'extraction, les feuilles n'étaient donc pas sales. Lors d'une extraction à l'échelle industrielle, il ne sera pas possible de sélectionner uniquement les petites feuilles, l'ensemble de la rosette devra être récoltée pour la production. Dans ce cas, il sera certainement important de laver les feuilles afin de limiter au maximum les interactions avec d'autres espèces chimiques, qu'elles soient issues du sol, des feuilles, ou d'autres origines. Afin de se rapprocher de conditions industrielles et d'éliminer les résidus terreux et les insectes qui pourraient être présents sur des récoltes futures, les feuilles seront, pour la suite des études, rincées une fois avec de l'eau à température ambiante.

3.2.3 Optimisation de l'étape d'extraction des précurseurs

3.2.3.1. Préparation des plans d'expérience

Lors de la première étape du procédé, les précurseurs sont d'abord solubilisés et hydrolysés. L'hydrolyse peut, soit être liée à la co-extraction d'enzymes de type β-glucosidase avec les précurseurs, qui en l'absence d'oxygène induiraient leur hydrolyse, soit être une hydrolyse chimique liée au milieu d'extraction acide si le pH est trop acide, comme nous l'avions montré chapitre 2.4.2.2.

Afin d'optimiser l'extraction et l'hydrolyse des précurseurs, il est nécessaire de trouver les paramètres idéaux favorisant leur extraction sans les dégrader, et permettant leur hydrolyse en maintenant la stabilité des indoxyles qui seront par la suite convertis en indigo.

Les différents paramètres pouvant influer sur la qualité de l'extraction sont les suivants :

- pH
- Température
- Durée extraction
- Composition eau
- Nature acide (Chlorhydrique, acétique, citrique, sulfurique, etc.)

Dans l'étude de 2016 effectuée au LCA, la composition de l'eau a été testée. L'eau déminéralisée a donné des rendements d'extraction plus faibles. Pour cette raison, seule l'eau de ville (avec ses potentielles variations) a été considérée dans cette étude.

Concernant la température, Stoker et al. indiquait en 1998 que l'extraction aqueuse des feuilles de Pastel pouvait être réalisée sur 24h à des températures modérées, autour de 60°C, ou plus rapidement à condition de plonger les feuilles dans de l'eau bouillante, permettant ainsi l'éclatement des cellules végétales et la diffusion de leur contenu dans le milieu [33]. Selon eux, le principal inconvénient d'une extraction longue à faible température était le risque de former prématurément l'indoxyle, pouvant avoir pour conséquence de favoriser la formation d'indirubine au détriment de l'indigo. A l'inverse, l'inactivation de ces enzymes à une température trop importante pouvait également être responsable d'une perte de rendement en indigo par l'hydrolyse incomplète des précurseurs [150]. En parallèle, il a été vu dans le chapitre 2.3.3.3 que les précurseurs étaient sensibles à la température et pouvaient se dégrader, potentiellement en d'autres composés que l'indigo, comme la tryptanthrine [49]. Il semble donc nécessaire d'optimiser la température du bain d'extraire afin de trouver le compromis idéal entre la stabilité des précurseurs et la production du pigment bleu.

Selon Garcia, les conditions optimales d'extraction seraient 2h à 50°C [39,150], cependant il ne mentionne pas le pH d'extraction, ni la nature de l'acide utilisé.

L'utilisation d'eau acide pour l'extraction des précurseurs des feuilles a été proposée par Stoker et al., ce qui permettait de stabiliser l'extrait et d'empêcher la précipitation trop précoce de l'indigo [33]. L'auteur expliquait que l'isatan B, à l'époque décrit comme un indoxyle estérifié, était stable à pH acide. Or, nous avons démontré dans le chapitre 2.2.4 que l'ajout d'acide semblait avoir une influence sur la solubilisation de l'isatan A et non pas sur la stabilité des précurseurs. De plus, un pH très acide, inférieur à pH 1, ne semblait pas non plus dégrader ni l'isatan A ni l'isatan B sur au moins une heure. Cet essai a permis de prouver l'importance de l'ajout d'acide afin d'améliorer le pouvoir extractif de la solution aqueuse et qu'il était possible de baisser d'avantage le pH de la solution d'extraction sans risquer l'hydrolyse trop précoce des précurseurs. Il est d'ailleurs possible que l'acide puisse aussi avoir un rôle sur la libération des précurseurs dans le milieu aqueux en lysant les cellules.

Afin d'optimiser les conditions de pH, de durée d'extraction et de température, deux plans d'extractions ont été réalisés pour étudier l'impact de ces paramètres.

En se basant sur le protocole opératoire définit en 4.7.2 un premier plan d'expérience de Doehlert a été mis en place pour étudier l'impact des trois facteurs pH, durée d'extraction et température. Les résultats doivent permettre de comprendre plus

finement les différents phénomènes en cours ainsi que d'optimiser les conditions extractives.

3.2.3.2. Optimisation de l'étape d'extraction acide à trois facteurs

Le domaine expérimental est donné dans le tableau 8. La température maximale est fixée à 60°C. En effet, il est censé de penser que la température favorise l'extraction, toutefois dans l'hypothèse ou des enzymes seraient impliquées, il ne faut pas risquer de les dégrader. Une température supérieure à 80°C pouvant aboutir à la dégradation de l'indican et une température supérieure à 60°C dégrade la β-glucosidase. Les pH acides peuvent favoriser l'extraction, et permettent de stabiliser le milieu d'extraction, l'intervalle d'étude a été choisi entre 2 et 5. La durée d'extraction est fixée entre 1 et 3h, une extraction longue favorisera probablement l'extraction mais risque d'entrainer des composées indésirables qui pourraient interagir avec les précurseurs. Le domaine de définition théorique de PE2 est présenté en tableau 8 et les variables réelles associées aux variables codées sont données en tableau 9.

Tableau 8 - Domaine de définition théorique du plan d'expérience PE2

	pH	Durée (min)	Température (°C)
Minimum	2	68	28
Maximum	5	172	57
Pas	1,5	60	17,5
Point Central	3,5	120	42,5

Tableau 9 - Variables codées et variables expérimentales du PE2

	Variables codées			**Variables réelles**		
Echantillon	X1	X2	X3	pH	Durée (h)	Température (°C)
PE2-FF1	0	0	0	3,51	120,0	43
PE2-FF2	1	0	0	5,02	120,0	43
PE2-FF3	0,5	0,866	0	4,27	172,0	43
PE2-FF4	-0,5	0,866	0	2,74	172,0	43
PE2-FF5	-1	0	0	2,01	120,0	43

PE2-FF6	-0,5	-0,866	0	2,74	68,0	43
PE2-FF7	0,5	-0,866	0	4,27	68,0	43
PE2-FF8	0	0	0	3,51	120,0	43
PE2-FF9	0,5	0,289	0,816	4,27	137,3	57
PE2-FF10	-0,5	0,289	0,816	2,74	137,3	57
PE2-FF11	0	-0,577	0,816	3,5	85,4	57
PE2-FF12	0,5	-0,289	-0,816	4,23	102,7	28
PE2-FF13	-0,5	-0,289	-0,816	2,74	102,7	28
PE2-FF14	0	0,577	-0,816	3,51	154,6	28
PE2-FF15	0	0	0	3,51	120,0	43
PE2-FF16	0	0	0	3,51	120,0	43

Seize expériences ont été réalisées avec le même lot de feuille, les résultats sont donnés dans le tableau 10.

Tableau 10 - Récapitulatif des résultats du plan d'expérience PE2 sur l'optimisation de l'étape d'extraction des précurseurs

PLAN D'EXPÉRIENCE		RECOLTE	EXTRACTION AQUEUSE ACIDE			PIGMENT INDIGO			
	Nom échantillon	Date extraction	pH acide	Consigne bain marie (°C)	Durée extraction (min)	Pureté indigo ($g_{indigo}/g_{pigment}$)	η pigment ($g_{pigment}/kg_{MS}$)	η indigo (g_{indigo}/kg_{MS})	Couleur pigment (DMF)
PE2	PE2-FF1	14/09/2021	3,5	43	120	**0,20**	9,7	2,0	
	PE2-FF2	14/09/2021	5,0	43	120	0,18	10,3	1,9	
	PE2-FF3	14/09/2021	4,3	43	172	0,14	15,5	**2,2**	
	PE2-FF4	14/09/2021	2,7	43	172	0,09	**19,7**	1,9	
	PE2-FF5	14/09/2021	2,0	43	120	0,18	**20,2**	**3,6**	
	PE2-FF6	14/09/2021	2,7	43	68	**0,21**	9,1	1,9	
	PE2-FF7	14/09/2021	4,3	43	68	0,08	4,9	0,4	
	PE2-FF8	14/09/2021	3,5	43	120	**0,20**	12,2	**2,5**	
	PE2-FF9	15/09/2021	4,3	57	137	0,04	18,4	0,8	
	PE2-FF10	15/09/2021	2,7	57	137	0,02	**19,5**	0,4	
	PE2-FF11	15/09/2021	3,5	57	85	0,05	17,4	0,8	
	PE2-FF12	15/09/2021	4,2	28	103	0,06	5,2	0,3	

PE2-FF13	15/09/2021	2,7	28	103	0,03	8,6	0,2	
PE2-FF14	15/09/2021	3,5	28	155	0,09	7,1	0,7	
PE2-FF15	15/09/2021	3,5	43	120	0,16	11,6	1,9	
PE2-FF16	15/09/2021	3,5	43	120	0,09	11,5	1,1	
PE2-FF17	15/09/2021	7,0	43	120	0,11	12,2	1,4	

Des complications expérimentales ont empêché de réaliser toutes les expériences le jour de la récolte des feuilles. Les expériences FF9 à FF17 ontdû être reportées au lendemain, créant ainsi un biais expérimental et fragilisant certaines conclusions. L'expérience FF8 a été l'un des triplicats intercalé en fin de première journée. Tous les pigments produits ont été resolubilisés dans du DMF afin de doser l'indigo et de calculer les rendements d'extraction. La Figure 51 illustre la couleur des solutions obtenues.

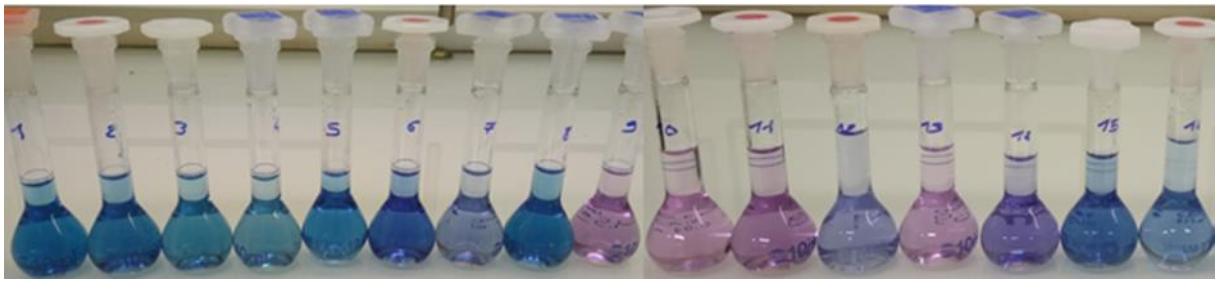


Figure 51 - Pigments PE2-FF1 à PE2-FF8 extraits le 14/09/2021 et PE2-FF9 à PE2-FF16 extraits le 15/09/2021 en solution dans du DMF

L'analyse du plan d'expérience par modélisation mathématique permet d'aboutir aux graphiques présentés Figure 52.

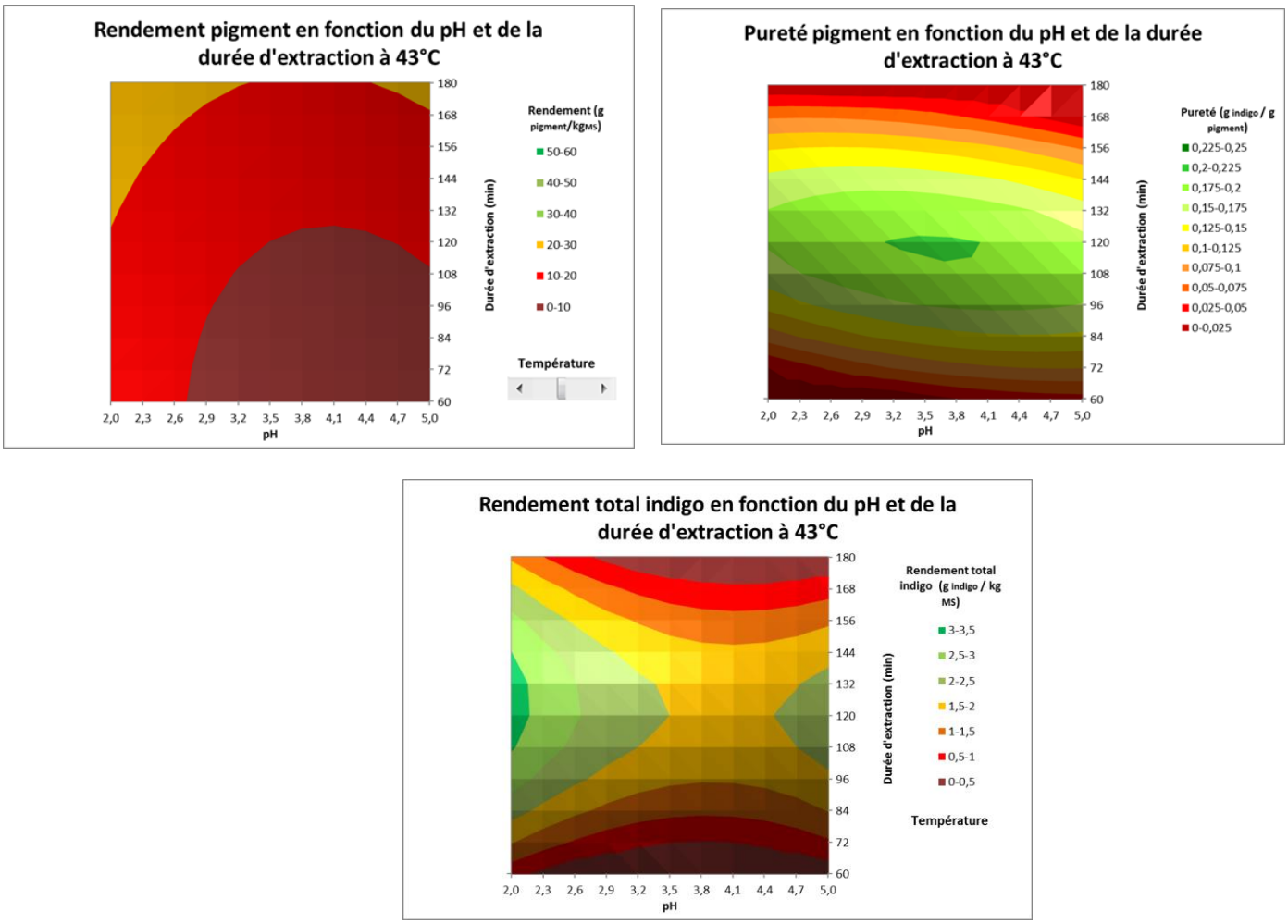


Figure 52 - Modélisation numérique des rendements en pigment, en indigo, et en pureté en indigo dans le pigment en fonction des conditions d'extraction (pH, durée d'extraction) pour une température de 43°C.

Afin de valider la pertinence des résultats, une analyse de variance et un test de Fisher ont été réalisés. L'idée générale est de comparer la divergence des résultats avec celle de la table de Fisher avec un risque α=0,05, sachant que si le coefficient du modèle est inférieur au facteur de Fisher, les résultats sont considérés comme acceptables.

Le facteur du modèle est calculé avec la formule ci-dessous :

$$F_{modèle} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_e^2} \qquad avec \qquad s_e^2 = \frac{\sum (y_i - \overline{y}_i)^2}{dofe} \qquad et \qquad s_a^2 = \frac{\sum (\hat{y}_i - \overline{y}_i)^2}{dofa}$$

Ici y_i représente les valeurs expérimentales, $\overline{y}_i$ la valeur moyenne des différentes répétitions et $\hat{y}_i$ les valeurs calculées par le modèle. dofe représente le nombre de répétitions d'une même expérience et dofa le nombre de degré de libertés du plan d'expérience.

Pour ce plan d'expérience, le facteur du modèle a été calculé pour chaque réponse et est inférieur au facteur de Fisher de 9.

$F_{rendement\ pigment} = 0{,}45$; $F_{pureté\ pigment} = 0{,}78$; $F_{rendement\ indigo} = 0{,}05$.

L'étude, bien qu'incomplète, permet les observations suivantes :

- Plus la durée d'extraction est élevée, plus le rendement en pigment est important. Toutefois la symétrie des graphiques en termes de pureté et de rendement en indigo traduit l'existence d'un temps d'extraction optimal. En effet, à partir de 2h, l'extraction conduit à la production maximale d'indigo, un prolongement du temps provoque l'extraction d'autres éléments que les précurseurs d'indigo polluant ainsi le pigment final. L'optimum « rendement en indigo », prenant en compte à la fois le rendement et la pureté, est ainsi atteint pour une durée d'extraction de 2 heures.
- De la même manière, la symétrie observée pour les pH indique que les pH les plus acides conduisent à un meilleur rendement total, par contre, au-dessous de l'optimum, situé entre 3,2-3,8 à 43°C, la pureté diminue. L'optimum « rendement en indigo » est lui atteint à des pH inférieurs à la limite basse du domaine d'étude. La baisse du pH doit, cependant, rester limitée car un milieu trop acide peut engendrer une dégradation des précurseurs. Il faut également avoir en tête que l'utilisation d'un pH trop bas conduira à une augmentation importante des coûts liés aux produits chimiques (acide pour la réduction du pH et base pour la neutralisation).

3.2.3.3. Plan d'expérience de Doehlert à 2 facteurs : température et pH

Afin de confirmer l'influence de la température et du pH, un troisième plan d'expérience, de type Doehlert à 2 facteurs, a été mis en place. Pour ce troisième plan d'expérience, la durée d'extraction a été fixée à l'optimum identifié dans l'étude précédente, soit une durée de 2h. Des pH légèrement plus acides ont été mis en œuvre. Le nouveau domaine d'étude est donné dans le tableau 11. Les variables codées et réelles sont données en tableau 12.

Tableau 11 - Domaine de définition théorique du plan d'expérience PE3

	pH	Température (°C)
Maximum	4,4	58
Minimum	1	27
Pas	1,7	17,5
Point Central	2,7	42,5

Tableau 12 - Variables codées et variables expérimentales du PE3

	Variables codées		**Variables réelles**	
Echantillon	X1	X2	pH	Température (°C)
PE3-FF1	0	0	2,75	42
PE3-FF2	1	0	4,37	42
PE3-FF3	0,5	0,866	3,5	58
PE3-FF4	-0,5	0,866	1,79	58
PE3-FF5	-1	0	0,99	42
PE3-FF6	-0,5	-0,866	1,79	27
PE3-FF7	0,5	-0,866	3,5	27
PE3-FF8	0	0	2,75	42
PE3-FF9	0	0	2,75	42
PE3-FF10	0	0	2,75	42

Dix expériences ont ainsi été réalisées avec le même lot de feuille, les résultats sont donnés dans le tableau 13. L'analyse du plan d'expérience par modélisation mathématique permet d'aboutir aux graphiques présentés Figure 53.

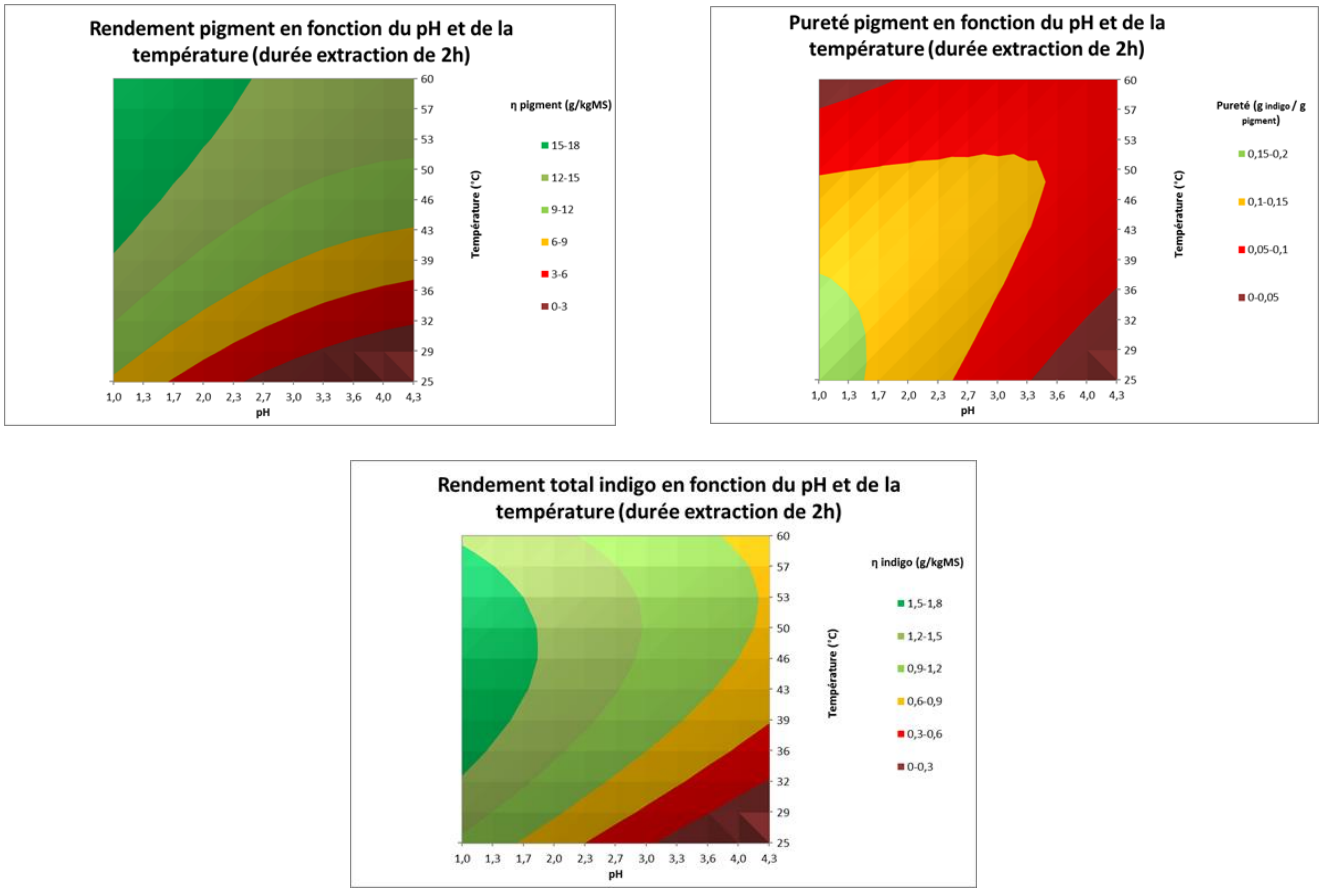


Figure 53 - Modélisation numérique des rendements en pigment, en indigo, et en pureté en indigo dans le pigment en fonction des conditions d'extraction (pH, température) pour une durée d'extraction de 2h.

Tableau 13 - Récapitulatif des résultats du plan d'expérience PE3 sur l'optimisation de l'étape d'extraction des précurseurs

PLAN D'EXPÉRIENCE		RECOLTE	EXTRACTION AQUEUSE ACIDE			PIGMENT INDIGO			
	Nom échantillon	Date extraction	pH acide	Consigne bain marie (°C)	Durée extraction (min)	Pureté indigo ($g_{indigo}/g_{pigment}$)	η pigment ($g_{pigment}/kg_{MS}$)	η indigo (g_{indigo}/kg_{MS})	Couleur pigment (DMF)
PE3	PE3-FF1	12/10/2021	2,75	42	120	0,14	10,6	**1,5**	
	PE3-FF2	12/10/2021	4,37	42	120	0,12	9,2	1,1	
	PE3-FF3	12/10/2021	3,5	58	120	0,05	13,3	0,7	
	PE3-FF4	12/10/2021	1,79	58	120	0,10	**16,6**	**1,6**	
	PE3-FF5	12/10/2021	0,99	42	120	0,09	**15,3**	1,4	
	PE3-FF6	12/10/2021	1,79	27	120	0,17	7,1	1,2	
	PE3-FF7	12/10/2021	3,5	27	120	0,02	1,1	0	
	PE3-FF8	12/10/2021	3,3	42	120	0,07	8,9	0,6	
	PE3-FF9	12/10/2021	3,5	42	120	0,10	8,4	0,8	
	PE3-FF10	12/10/2021	3,5	42	120	0,09	12,3	1,2	

Par le même calcul qu'expliqué précédemment, le modèle a été validé par le test de Fisher, les coefficients du modèle sont les suivants :

$$F_{rendement\ pigment} = 0{,}04\ ;\ F_{pureté\ pigment} = 0{,}23\ ;\ F_{rendement\ indigo} = 0{,}19$$

Le modèle représente de manière adéquate les phénomènes en jeu lors de l'extraction.

Les tendances sont les mêmes que celles observées précédemment, à savoir que plus le pH est acide et la température basse, meilleure est la pureté, plus la température est élevée plus le rendement augmente. Le choix stratégique pour obtenir le meilleur rendement en indigo possible est donc de faire un compromis sur le choix de la température, afin d'obtenir à la fois un bon rendement d'extraction et une bonne pureté en indigo. Le choix du pH devra être corrélé à une étude économique qui devra prendre en compte l'impact de l'acide sur les installations et les risques environnants.

La comparaison des triplicats, réalisés pour les deux plans dans des conditions expérimentales proches, souligne la variabilité des feuilles d'une récolte à l'autre. En effet, lors de la réalisation du dernier plan d'expériences, les rendements en indigo ont été beaucoup plus faibles que lors du précédent.

Au vu des arguments présentés dans cette étude, un pH de 2,0 semble un bon compromis pour réaliser une extraction efficace des précurseurs en limitant l'impact économique de l'acide sur le procédé. A ce pH, la température et la durée d'extraction optimales sont respectivement de 50°C et 2 heures. Ces paramètres sont ceux qui ont été retenus pour la suite de l'étude.

3.2.4 Production à partir de feuilles de maturité différente

Durant les travaux d'optimisation, nous avons principalement récolté les petites feuilles, puisqu'elles sont décrites comme plus riches en précurseurs [82], ce que nous avons confirmé dans le chapitre 2.3.3. Nous avions étudié la teneur en précurseurs dans des jeunes feuilles du cœur de rosette et des feuilles plus matures en bordure de rosette. Une production de pigment a été réalisée en parallèle avec les paramètres optimisés de l'étape d'extraction des précurseurs. Pour cet essai, des jeunes feuilles et un mélange de feuilles de tout âge ont été extraits en deux réplicats chacun. Les résultats sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14 - Résultat de la production de pigment issue de feuilles de cœur de rosette et d'un mélange de feuilles de différentes maturités

RECOLTE			EXTRACTION AQUEUSE ACIDE			PIGMENT		
Date extraction	Nom échantillon	Types de feuilles	pH acide	Consigne du bain marie (°C)	Durée d'extraction (min)	Pureté indigo ($g_{indigo}/g_{pigment}$)	η pigment ($g_{pigment}/kg_{MS}$)	η indigo (g_{indigo}/kg_{MS})
25/01/2022	FF1	Cœur de rosette	2	50	120	0,07	9,32	0,65
25/01/2022	FF2					0,09	11,73	1,06
25/01/2022	FF3	Mélange				0,02	11,38	0,23
25/01/2022	FF4					0,04	16,33	0,65

On peut constater que le rendement en pigment a été plus important pour la production avec les feuilles en mélange, qu'avec les petites feuilles. Cependant, la quantité d'indigo produite a été supérieure à partir des petites feuilles. Ces résultats sont en accord avec les teneurs en précurseurs observées dans les petites et grandes feuilles observées en chapitre 2.3.3. La récolte des petites feuilles issues du cœur de la rosette est donc à privilégier. Cela complique cependant la récolte pour la production à plus grande échelle, l'utilisation d'appareils d'agricultures spécialisés ou la récolte de jeunes rosettes pourrait être envisagée.

3.3 Essai de mise à l'échelle industrielle

Afin de faire un transfert d'échelle et de valider les résultats optimisés à l'échelle « paillasse », il a été décidé de réaliser une extraction en cuve de 200 L sur 20 kg de feuilles.
Pour cela, 27 kg feuilles ont été récoltés et divisés selon trois objectifs :

- 25 kg de feuilles ont été utilisées pour la production optimisée à l'échelle pilote (conditions ciblées : 2 heures, pH 2, 50°C)
- 500 g de feuilles ont été utilisées pour la production à l'échelle du laboratoire réalisée dans les conditions de référence (4.3.1).
- 90 g de feuilles ont été extraites selon la méthode du chapitre 2.1.1 pour réaliser une analyse UHPLC-ESI-HRMS (résultats dans le chapitre 2.3.3.2)

3.3.1. Conditions opératoires des différentes étapes utilisées à l'échelle pilote

Chaque étape du procédé réalisée à l'échelle pilote a été adaptée en se basant sur les manipulations réalisées pour la production à l'échelle du laboratoire.

Récolte

Les feuilles utilisées sont issues de la récolte manuelle du 08/11/2021. Au total, 27 kg de feuilles ont été récoltés. Les plants utilisés étaient des rosettes de bonne taille et bien charnus, et dans la mesure du possible la récolte des jeunes feuilles a été privilégiée.

Pré-traitement des feuilles

Les feuilles ont été rincés à l'eau claire, après avoir été égouttées, elles ont été disposées dans la cuve d'extraction. Une certaine quantité de terre et des insectes ont pu ainsi être enlevés.

Extraction des feuilles

L'eau utilisée est de l'eau de ville, qui a été chauffée à 60°C (température volontairement choisie supérieure à la température de consigne pour tenir compte de la

dissipation thermique lors du remplissage de la cuve non thermostatée). L'eau a été acidifiée, jusqu'à un pH proche de 2, grâce à 330 mL d'acide chloridrique à 37%. La durée d'extraction a été fixée à 2 heures.

Les feuilles ont été maintenues sous l'eau grâce à une grille lestée. Ainsi les feuilles n'ont pas été en contact direct avec l'oxygène de l'air (Figure 54).

La cuve d'extraction n'étant pas calorifugée, un relevé de température a été effectué toutes les heures. A T = 0, en début de l'extraction, après la mise en contact de l'eau chaude et des feuilles, la température a été de 55°C ; à T=1h elle a chuté à 50°C et en fin d'extraction, à T = 2h05, après séparation du milieu d'extraction et des feuilles épurées, la température a été de 43°C.

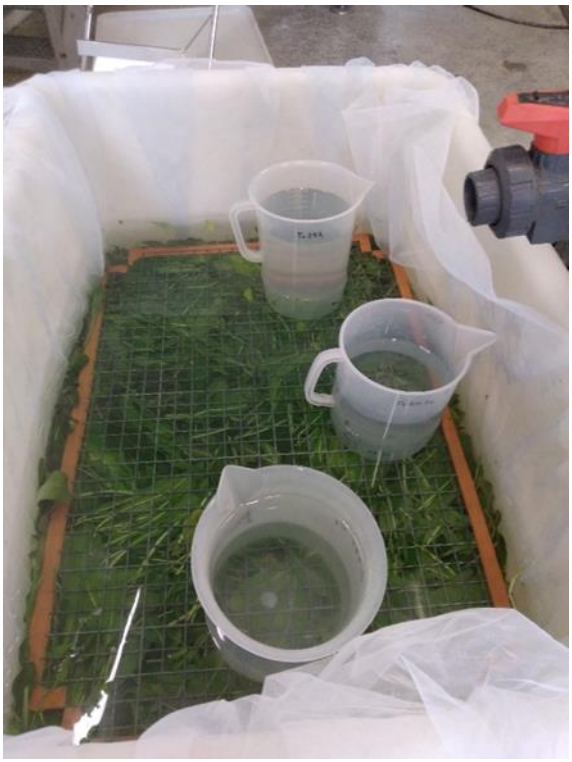


Figure 54 - Feuilles de Pastel immergées dans 175L d'eau acidifiée et chauffée pour la première étape d'extraction des précurseurs, lors de la production à échelle industrielle

Après deux heures d'extractions, l'extrait a été percolé, transvasé dans une seconde cuve, permettant l'oxygénation du milieu, et placé en chambre froide pendant deux heures pour être refroidi. Lorsque la température de l'extrait est redescendue autour de 30°C, une solution de NaOH a été ajoutée jusqu'à atteindre le pH 10,5, où une importante mousse bleue s'est formée. La précipitation de l'indigo a duré 7 jours, à froid, puis le pigment a été filtré sur une toile de 10 µm, placée dans une décanteuse centrifuge.

Le pigment récupéré a ensuite été séché. Le filtrat issu de la centrifugation, contenant encore du pigment, a dû être laissé à décanter afin de récupérer le pigment non retenu par la toile.

3.3.2 Bilan de l'extraction

A l'issu de l'extraction pilote, il a été estimé que 39,7g de pigment ont été produits. L'analyse de la concentration en indigo, réalisée par spectrophotométrie UV-visible a permis de calculer le rendement en pigment par rapport à la masse de feuilles sèches, qui est de 14,6 $g_{pigment}/kg_{feuilles\ sèches}$ et le rendement en indigo par rapport à la masse de feuilles sèches, qui a été estimée à 1,8 $g_{indigo}/kg_{feuilles\ sèches}$.

La production à l'échelle du laboratoire, a donné un rendement en pigment de 11,6 $g_{pigment}/kg_{feuilles\ sèches}$ et un rendement en indigo par rapport à la masse de feuilles sèches de 0,55 $g_{indigo}/kg_{feuilles\ sèches}$. Sur une même récolte, l'essai pilote avec les paramètres optimisés a fourni le meilleur rendement en pigment et en indigo que l'essai à l'échelle du laboratoire, avec les paramètres de référence. Toutefois, les résultats de l'essai pilotes restent inférieurs à ceux obtenus lors des plans d'expérience. Ceci est probablement lié au fait que les feuilles utilisées pour la production de pigment ont été récoltées à des dates différentes et donc avec des conditions météorologiques différentes. La teneur en précurseurs des feuilles récoltées pour cet essai pilote s'est en effet révélée inférieure à celle des feuilles utilisées pour les plans d'expérience (Figure 24, p 63). Cependant, la quantité et la qualité des pigments obtenus lors de l'essai pilote d'une part et de l'essai à l'échelle laboratoire d'autre part sont différentes, alors que les mêmes feuilles ont été extraites. Cela indique que la teneur en précurseurs n'explique pas à elle seule ces différences, et que ce sont essentiellement les conditions d'extraction et de précipitation qui influent sur la quantité et la qualité du pigment.

L’essai pilote a permis d’obtenir des rendements plus importants que ceux obtenus sur le même lot de feuilles à l’échelle laboratoire. La mise en place d’un procédé de production à grande échelle semble prometteuse. Il est possible que des améliorations puisse encore être réalisés en contrôlant mieux l’oxygénation du milieu. D’un point de vue environnemental, les déchets de la production, comme les feuilles extraites et le filtrat basique, pourraient faire l’objet d’une étude afin d’être revalorisés. En 2017, un document issu du projet True Blue de Fibershed, étudiant *Persicaria tinctoria*, expliquait la possibilité de réutiliser les feuilles extraites comme compost [150]. La fermentation de la biomasse pourrait également être employée dans des applications énergétiques, de fertilisants ou encore de production de molécules d’intérêt, notamment les polyphénols cités en chapitre 3 [151].

Conclusion et perspectives

L'amélioration du rendement et de la qualité du pigment indigo produit à partir d'*Isatis tinctoria* a été l'objectif central de cette thèse. Pour mener à bien cette étude, deux grands axes ont été explorés : (1) l'identification, le suivi des teneurs et l'étude de la réactivité des précurseurs de l'indigo et (2) l'optimisation du procédé de production du pigment indigo déjà existant.

Pour le premier axe, une étude déréplicative par UHPLC-ESI(-)-HRMS d'extraits méthanoliques de feuilles fraiches d'*Isatis tinctoria* a permis d'identifier les principaux métabolites des feuilles du Pastel, dont les précurseurs majoritaires de l'indigo, l'isatan A et l'isatan B. La teneur en précurseurs dans ces extraits méthanoliques a été évaluée sur une période de 2 ans, immédiatement après la récolte, ainsi que pendant trois jours après la récolte. Ces analyses ont permis de constater que même si la teneur en précurseurs était variable, tous les lots de feuilles analysés contenaient des précurseurs, et que la teneur en précurseurs était stable dans les feuilles pendant au moins trois jours après la récolte. Ces résultats permettent ainsi d'envisager, théoriquement, de produire du pigment bleu à partir de feuilles fraiches toute l'année, et de répartir la production sur un ou deux jours après la récolte.

En parallèle, l'étude de la réactivité des précurseurs en conditions de production a été envisagée à partir d'extraits aqueux acides complexes de feuilles fraiches, correspondant aux conditions de leur extraction pour la production du pigment. A cette étape du procédé, nous avons montré que les précurseurs ne sont plus présents dans l'extrait et qu'ils sont donc déjà hydrolysés. Afin d'étudier la réactivité des précurseurs et de mieux comprendre les étapes de leur transformation en indigo, nous avons cherché à extraire et isoler ces précurseurs. Pour cela, nous avons cherché à mettre au point une méthode de purification de l'isatan A et de l'isatan B. Cependant, leur grande instabilité, notamment à température ambiante, a énormément entravé nos études. Il a ainsi fallu adapter les conditions d'extraction et de conservation des extraits pour limiter leur dégradation. Des fractions enrichies en isatan A et en isatan B ont pu être obtenues et leur réactivité a pu être étudiée par UHPLC-ESI-HRMS et par voltammétrie cyclique. Ces essais ont permis de mettre en évidence une bonne stabilité des précurseurs dans les conditions de température et de pH du procédé de production du pigment, indiquant en

parallèle que leur disparition, observée en conditions de production, semblait être liée à une hydrolyse provoquée par des enzymes foliaires d'origine végétale ou microbienne.

Il n'existe à notre connaissance aucune étude bibliographique sur l'implication d'espèces fongiques dans la conversion des précurseurs en indigo, contrairement aux microorganismes bactériens décrits dans les cuves de teinture. C'est dans ce contexte qu'une étude du potentiel enzymatique des endophytes fongiques des feuilles de Pastel a été initiée en parallèle de la thèse (annexe 14). Les premiers résultats sont encourageants et suggèrent notamment qu'une introduction dans les cuves d'extraction, de souches fongiques bien sélectionnées, pourrait permettre d'améliorer les rendements de production d'indigo. Ces résultats offrent ainsi de nouvelles perspectives pour la production du pigment bleu d'indigo de pastel dont la validation nécessitera des études complémentaires.

Dans le second axe, le procédé de production du pigment indigo développé au LCA quelques années plus tôt a été repris. La première étape de ce procédé correspond à l'extraction acide des précurseurs, qui s'hydrolysent par la suite en indoxyle. Les paramètres de durée d'extraction, de pH et de température ont été optimisés en utilisant des plans d'expérience établis sur différentes récoltes. Les premiers résultats des analyses statistiques ont montré que les paramètres optimaux pour la production différaient en fonction des objectifs visés : haute pureté du pigment en indigo ou haut rendement en pigment. Afin de concilier le rendement en pigment et sa concentration en indigo, les valeurs optimales pour l'extraction aqueuses ont été fixées à une température de 50°C, un pH de 2 et une durée d'extraction de deux heures. Un pH plus acide pourrait également améliorer d'avantage le rendement, mais n'est pas compatible avec les attentes du milieu industriel à la fois d'un point de vue de quantité accrue de réactif à utiliser, mais aussi d'un point de vue risques corrosifs face aux installations. Un essai à grande échelle a pu être mis en œuvre avec les paramètres sélectionnés. Les résultats se sont avérés cohérents avec ceux obtenus lors des plans d'expérience, et les rendements supérieurs à ceux réalisés en parallèle avec les anciens paramètres de production. Cet essai pilote a permis de valider la méthode statistique et a montré des résultats encourageants pour la production du pigment à l'échelle industrielle.

Pour optimiser la production du pigment, Il avait également été envisagé au début du projet de croiser les résultats de ces deux axes de travail réalisés en parallèle afin de déterminer si une corrélation pouvait être établie entre la teneur en précurseurs détectés

par UHPLC-ESI-HRMS et le rendement et la qualité du pigment obtenu. Cependant, en raison de contraintes techniques liés à l'instabilité des précurseurs, à la nécessité de traiter un volume important d'extrait pour la production du bleu, au fait que l'extraction des précurseurs et la production du pigment ont été réalisées sur deux sites distincts (Pharmadev et LCA), ou encore en raison de difficultés d'approvisionnement, il s'est avéré compliqué de pouvoir recueillir suffisamment de données comparables pour conclure. En parallèle, nous avons observé sur certains essais, tels que les réplicats, que la production de pigment à partir de feuilles récoltées le même jour et extraites dans les mêmes conditions pouvait conduire à des rendements et des puretés de pigments différents. Certains paramètres de production du pigment ne sont donc toujours pas pleinement maitrisés, seule l'étape d'extraction aqueuse des précurseurs a été étudiée et optimisée. L'étape de précipitation de l'indigo reste encore à examiner, notamment le pH, la durée de précipitation et l'oxygénation du milieu, une oxygénation trop importante du milieu conduisant notamment à la production d'indirubine.

Enfin, des essais de conservations de la feuille avaient été mis en place, afin de pouvoir conserver la feuille à plus long terme après la récolte. Des premiers travaux de production sur des feuilles congelées, des feuilles gelées à l'azote liquide et des feuilles séchées à 30 °C ou à 40°C ont été réalisés, mais n'ont pas été concluants. Dans l'objectif de recréer l'ancienne cocagne utilisée en teinture, les feuilles ont été ensilées, sans oxygène, afin de limiter la fermentation aérobie. Les premiers résultats ont montré que de l'indigo s'était formé dans les feuilles ensilées pendant un mois. Une méthode de dégradation de la matière végétale devra être développée, notamment à partir d'enzymes, afin de poursuivre cette étude.

Le Pastel des teinturiers a failli disparaitre au profit d'une production plus rentable, mais plus polluante. Le renouveau de cette plante a été possible grâce à une succession de projets, qui permettent d'avancer vers une production plus durable en Occitanie. Ces travaux de thèse ont permis une meilleure compréhension des précurseurs de l'indigo, depuis leur analyse dans la feuille jusqu'à leur conversion en indigo. L'optimisation du procédé de production a permis de mieux concevoir l'influence de l'étape d'extraction sur la formation du pigment et le développement de méthodes de dosage de l'indigo a permis une meilleure caractérisation du pigment final. Ces premiers travaux ouvrent la voie à d'autres études, notamment l'optimisation de l'étape de précipitation de l'indigo et l'étude

de l’implication éventuelle des champignons endophytes dans la biogénèse et/ou l’activation des précurseurs de l’indigo.

Chapitre 4 - Matériel et méthodes

4.1 Solvants et réactifs

Les solvants méthanol, acétate d'éthyle, acétonitrile et chloroforme utilisés en chromatographie étaient de qualité HPLC (Fisher Scientific®). L'eau distillée et l'eau ultrapure ont été obtenues par filtration d'eau de ville à l'aide d'un système Milli-Q (Merck®).

De l'acide formique (Sigma®), du méthanol de grade HPLC (Fisher chemical®) et de l'acétonitrile de grade HPLC (Fisher chemical®) ont été utilisés pour les analyses UHPLC-ESI-HRMS.

La production de pigment a nécessité de l'hydroxyde de sodium à 97% (VWR®) et de l'acide chlorhydrique à 33% (VWR®).

Pour les analyses en spectrophotométrie UV-visible, du *N,N*-Diméthylformamide (Sigma®), de l'acétate d'éthyle de grade HPLC (VWR®) et du bromure de potassium à 98% (VWR®) ont été utilisés.

La préparation des milieux de culture a été réalisée à partir d'extraits de malt (BIOKAR Diagnostics), de glucose anhydre (Labogros Grosseron), d'agar (BIOKAR Diagnostics), de peptone (Fischer Scientific®), de chloramphénicol (Fischer BioReagents®), de sulfate de cuivre (Acros Organics®) et de sulfate de zinc (Acros Organics®).

4.2 Matériel végétal

Les plants de Pastel (*Isatis tinctoria*) ont été cultivés sur un champ appartenant à la société Terre de Pastel, à Labège (Haute-Garonne, France), entre octobre 2019 et mars 2022. Les deux parcelles prélevées sur le champ de Labège sont situées coordonnées 43°32'03.7"N 1°31'00.7"E (parcelle occidentale) et coordonnées 43°31'58.5"N 1°31'21.7"E (parcelle orientale).

Les échantillons collectés ont été utilisés au LCA pour la production de pigment, au laboratoire PharmaDev pour l'extraction des feuilles. Les feuilles ont été récoltées à la main, en sélectionnant des feuilles saines. Entre 1 et 5g de feuilles ont été séchées à

100°C pour estimer la teneur en eau dans les feuilles. Les dates et les lieux de récolte ont été compilées dans le tableau 15.

Tableau 15 - Récoltes réalisées sur le champ de Labège en fonction de la date de récolte et la parcelle récoltée

RECOLTE		FEUILLES RECOLTEES		FINALITE DE LA RECOLTE
Date récolte	Parcelle champ	Masse feuilles fraiches (g)	% eau dans la feuille fraiche	
06/12/2020	Occidentale	150	85%	Extraction MeOH
25/02/2020	Occidentale	50	85%	Extraction MeOH
27/02/2020	Occidentale	23	85%	Extraction MeOH
29/06/2020	Orientale	27	86%	Extraction MeOH
		997		Production de pigment
07/07/2020	Orientale	500	88%	Production de pigment
08/07/2020	Orientale	50	88%	Extraction MeOH
16/07/2020	Orientale	50	88%	Extraction MeOH
23/07/2020	Orientale	31	88%	Extraction MeOH
31/08/2020	Orientale	31	87%	Extraction MeOH
02/09/2020	Orientale	100	85%	Extraction MeOH et extraction eau acide
11/09/2020	Occidentale	100	85%	Extraction MeOH et extraction eau acide
02/10/2020	Orientale	250	85%	Extraction MeOH et extraction eau acide
19/10/2020	Orientale	939	85%	Production de pigment
20/10/2020	Orientale	1023	85%	Production de pigment
10/11/2020	Orientale	509	85%	Production de pigment
18/11/2020	Orientale	1004	85%	Production de pigment
30/11/2020	Orientale	100	85%	Extraction eau acide
02/12/2020	Orientale	80	85%	Extraction MeOH et extraction eau neutre
04/12/2020	Orientale	100	84%	Extraction MeOH et extraction eau neutre à t.a. et 60°C
11/12/2020	Orientale	375	84%	Extraction MeOH et extraction acétone
04/01/2021	Orientale	450	86%	Production de pigment
21/01/2021	Orientale	170	83%	Extraction MeOH
		500		Production de pigment
04/03/2021	Occidentale et orientale	45	88%	Extraction MeOH
27/04/2021	Occidentale	1013	90%	Production de pigment
06/05/2021	Occidentale	760	87%	Production de pigment
01/06/2021	Occidentale	33	90%	Extraction MeOH
16/06/2021	Occidentale	360	90%	Extraction MeOH
30/06/2021	Occidentale	560	88%	Production de pigment
24/08/2021	Occidentale	1260	82%	Production de pigment pour le plan d'expérience PE1

30/08/2021	Occidentale	27000	82%	Production de pigment à échelle industrielle à Terre de Pastel
31/08/2021	Occidentale	95	82%	Extraction MeOH
14/09/2021	Occidentale	3060	86%	Production de pigment pour le plan d'expérience PE2
28/09/2021	Occidentale	100	87%	Extraction MeOH
04/10/2021	Occidentale	180	77%	Extraction MeOH
11/10/2021	Occidentale	360	79%	Extraction MeOH
12/10/2021	Occidentale	1720	86%	Production de pigment pour le plan d'expérience PE3
18/10/2021	Occidentale	60	85%	Extraction MeOH
19/10/2021	Occidentale	60	85%	Extraction MeOH
02/11/2021	Occidentale	150	81%	Extraction MeOH
08/11/2021	Occidentale	90 19000	86%	Extraction MeOH Production de pigment à échelle industrielle
16/11/2021	Occidentale	150	79%	Extraction MeOH
10/01/2022	Occidentale	150	79%	Extraction MeOH
14/01/2022	Occidentale	115	82%	Extraction MeOH
25/01/2022	Occidentale	660	79%	Extraction MeOH et extraction acétone
02/03/2022	Occidentale	180	85%	Extraction MeOH
Total feuilles récoltées (g)		**64769**		

4.3 Extractions

4.3.1 Extraction méthanolique des feuilles fraiches de Pastel

30 g de feuilles ont été broyées dans 100 mL de méthanol à température ambiante, avec un mixeur plongeant, pendant 5 min. Quelques extraits ont été réalisés à partir d'une quantité différente de feuilles, le rapport masse de feuilles fraiches / méthanol est resté de 0,3. L'extrait a ensuite été filtré sur un filtre en papier puis concentré sous vide à l'évaporateur rotatif. Suivant les extractions, l'extrait a été concentré sous vide à 40°C, ou à température ambiante. Dans ce dernier cas, après évaporation du MeOH sous vide, le ballon a été congelé, puis lyophilisé pendant 24 à 48 h. Il a ensuite été conservé à température ambiante au congélateur -20°C ou à -80°C sans atmosphère particulière. En général, entre 0,7 et 1g d'extrait sec ont été obtenus à partir de 30 g de feuilles sèches.

4.3.2 Essais de conservation des extraits MeOH

Une récolte de 120 g de feuilles a été réalisée en 10/05/2021. Les feuilles fraiches ont été broyées dans 410 mL de méthanol et l'extrait a été filtré à l'aide d'un entonnoir en verre et concentré sous vide à 40°C. L'extrait sec a été pesé (2,67 g) et a été repris dans 222 mL d'un mélange MeOH/H_2O (9/1) pour obtenir une concentration de 12 mg/mL. A partir de cette solution, 180 vials de 1 mL ont été réalisés pour quatre températures différentes (température ambiante, 4°C, -20°C et -80°C), trois gaz différents (atmosphère ambiante, azote et argon) et deux périodes d'analyse différentes (t0, t + 15 jours et t + 35 jours). L'azote et l'argon ont été introduits dans les vials avec une aiguille, puis les vials ont été fermés avec un bouchon et du parafilm.

4.3.3 Suivi des précurseurs après la récolte

4.3.3.1 Suivi jusqu'à 24h après la récolte

Une récolte de 360 g de feuilles fraiche a été réalisée le 16/06/2021 et divisée en 12 paquets de 30 g de feuilles. Trois paquets de feuilles laissées à température ambiante ont été extraits avec 100 mL de méthanol 1 heure, 2 heures, 7 heures et 24 heures après la récolte. Tous les extraits ont été filtrés et ont été injectés immédiatement après leur extraction en UHPLC-ESI-HRMS, sans évaporation. Les réplicats ont ensuite été regroupés et évaporés sous vide à 40°C pour obtenir quatre extraits secs.

4.3.3.2 Suivi jusqu'à une semaine après la récolte

Une récolte de 500 g de feuilles fraiche a été réalisée le 11/10/2021 et divisée en 12 paquets de 30 g de feuilles. Trois paquets de feuilles ont été extraits avec 100 mL de méthanol immédiatement. Le reste des feuilles a été conservé à 4°C, puis extraits 1 jour, 2 jours et 3 jours après la récolte. Pour chaque extrait, un aliquot d'environ 3 mL a été prélevé, concentré sous vide et solubilisé à une concentration de 5 mg/mL dans un mélange MeOH/H_2O (8/2) contenant 0,5 mg/mL de tryptophane pour être analysés par UHPLC-ESI-HRMS.

4.4 Analyses

4.4.1 UHPLC-HRMS

Les extraits méthanolique sont été préparés à une concentration de 5 mg/mL dans du MeOH pour l'analyse par UHPLC-ESI-HRMS. A partir d'octobre 2021, les extraits ont été solubilisés dans un mélange MeOH/H_2O (8/2) contenant 0,5 mg/mL de tryptophane pour les analyses.

Les analyses ont été réalisées avec un système UHPLC Ultimate 3000 (Dionex) couplé à un spectromètre de masse LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, UK). Les échantillons ont été séparés sur une colonne C18 Acquity (1,7 µm ; 2,1x100 mm) équipée d'une colonne de garde chauffée à 40°C, et éluée à un débit de 0,3 mL/min pendant 15 min. La phase mobile A était de l'eau ultrapure acidifiée avec 0,1% d'acide formique (AF) et la phase mobile B était de l'acétonitrile acidifié avec 0,1% d'AF. Le gradient de solvant était le suivant : 0 min 95% A / 5% B ; 0,5 min 95% A / 5% B ; 10 min 5% A / 95% B ; 12 min 5% A / 95% B ; 12,5 min 95% A / 5% B jusqu'à 15 min. Le débit était de 0,3 mL/min, la température de l'échantillonneur automatique était réglée à 15 °C et le volume d'injection fixé à 5 µL pour les extraits. La détection par spectrométrie de masse a été réalisée à l'aide d'une source electrospray (ESI) en mode d'ionisation négative. La plage de balayage de masse était de *m/z* 100 - 2000 pour tous les échantillons, avec une résolution de 15 000. La tension du spray d'ionisation était réglée à 3,5 kV et la température du capillaire à 300°C. Pour chaque scan MS complet, une fragmentation MS/MS des trois ions les plus intenses était réalisée (mode « data dependant-scan ») en utilisant la dissociation induite par collision (CID) à 35 unités d'énergie arbitraires. L'ensemble des données a été traitée sur MZMine2.

Pour évaluer la teneur en précurseurs, des extraits MeOH de feuilles fraiches ont été injectés en triplicat à 1,25, 2,5, 5 et 10 mg/mL. Pour chaque précurseur, la somme des aires sous la courbe (ASC) des ions majoritaires a été calculée pour le suivi des teneurs. Pour l'isatan A, les ions *m/z* = 334,0926, *m/z* = 378,0825, *m/z* = 396,0925, *m/z* = 757,1723 et *m/z* = 775,1819 ont été additionnés ; pour l'isatan B les ions *m/z* = 292,0820 et *m/z* = 338,0875 ont été additionnés. Pour le suivi des précurseurs, la somme des ASC des ions de l'isatan A et la somme des ASC des ions de l'isatan B ont été additionnées (Figure 55).

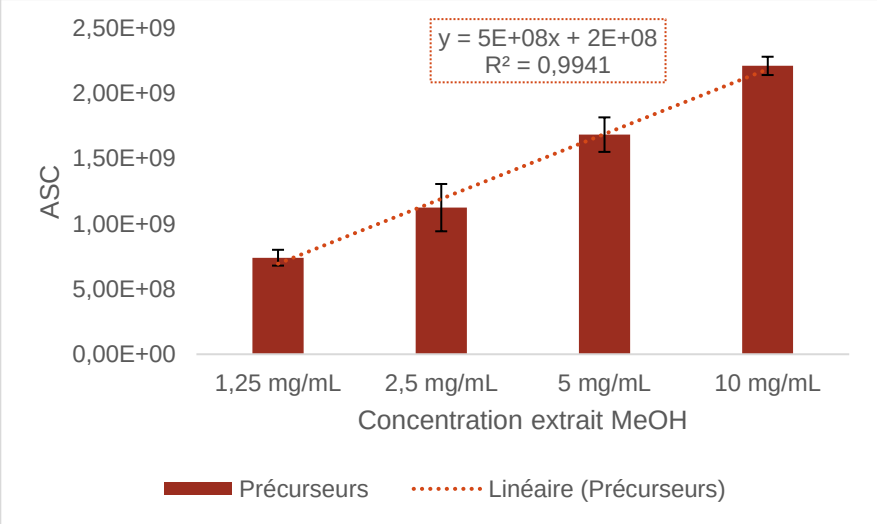


Figure 55 – Teneur des précurseurs isatan A et isatan B dans des extraits MeOH de feuilles fraiches réalisés à différentes concentrations

Pour les phénols, l'ASC de l'ion *m/z* = 621,1448 (l'acide disinapoylglucarique) et l'ASC de l'ion *m/z* = 623,1573 (3''-*O*-glucoside d'isoscoparine) ont été additionnés. Pour la glucobrassicine, seule l'ASC de l'ion m/z = 447,0529 a été utilisée.

4.4.2 Chromatographie sur couche mince (CCM)

10 µL d'un extrait méthanolique de feuilles fraiches de Pastel à 5 mg/mL dans du MeOH ont été déposés sur une plaque de silice G 60 F254 (Merck). La migration a été réalisée dans le mélange $CHCl_3$/MeOH/H_2O (60/35/5 (v/v/v)) sur 8 cm. La plaque a été séchée puis révélée par trempage dans de la soude (NaOH 5%, Sigma) (Oberthur, 2004). La révélation par spectrométrie de masse haute résolution a été réalisée en modes positif et négatif d'ionisation à l'aide de l'interface CAMAG. Sur une même plaque CCM, trois dépôts ont été réalisés puis la migration a été réalisée dans les conditions décrites plus haut. Seul un dépôt a été révélé. Les prélèvements ont été effectués sur les deux autres dépôts grâce aux Rf définis sur la partie de la plaque révélée par la soude. Les composés ont été désorbés par un mélange eau/acétonitrile.

4.4.3 Spectrométrie par Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton ^{1}H en solution

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton ont été enregistrés au service commun de RMN de l'Université Paul Sabatier de Toulouse, au Module de Haute

Technologie, sur un appareil de type Bruker Avance 500 MHz équipé d'une cryosonde. Les témoins d'indigo ont été solubilisés dans 600 µL de THF deutéré, de DMF deutéré, d'acétone deutéré, de pyridine deutérée ou de DMSO deutéré. Des mélanges d'indigo et d'indirubine ont été réalisés pour des essais de dosage en RMN. 4,6 mg d'indigo et 2,3 mg d'indirubine ont été solubilisés dans 600 µL de THF deutéré, de DMF deutéré, d'acétone deutéré, de pyridine deutérée ou de DMSO deutéré.

4.4.4 Spectrométrie par RMN du carbone ^{13}C solide

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du carbone ont été enregistrés au service commun de RMN de l'Université de Toulouse, au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC), sur un appareil de type Bruker Avance 400 III HD équipé d'une sonde de 4mm. Les témoins d'indigo et d'indirubine ainsi que les pigments produits à partir du Pastel ont été analysés sous forme de poudre amorphe. Les échantillons ont été tassés dans des rotors en zircon de 4 mm, en quantité suffisante pour les remplir, et ont été mis en rotation à 11 kHz, à température ambiante.

4.5 Fractionnement des extraits méthanoliques de Pastel

4.5.1 Chromatographie liquide flash en phase normale

La séparation a été réalisée sur une PuriFlash XS520Plus (Interchim)Les extraits de feuilles fraiches utilisées pour l'extraction ont été préalablement lyophilisés pendant 48h. 600mg d'extrait sec ont été mélangés à 3g de célite et 30ml de MeOH, puis concentré sous vide. Le mélange solide a été déposé dans une colonne flash vide, puis connecté à 50g de silice de granulométrie 15 µm. Le gradient d'élution est présenté dans le Tableau 16.

Tableau 16 – Gradient d'élution utilisé en chromatographie flash

Temps (min)	Débit (mL/min)	%A	%B	%C
0,00	15	90	10	0
9,00	15	90	10	0
10,00	15	80	18	2
19,00	15	80	18	2
20,00	15	60	35	5
29,00	15	60	35	5
30,00	15	35	60	5
40,00	15	35	60	5

Le suivi du fractionnement a été réalisé à l'aide d'un détecteur DAD dans la gamme de longueurs d'ondes 200-400nm. 63 fractions ont été collectées automatiquement selon leur absorbance à 280 nm et ont été rassemblées selon leur profil s'absorbance et chromatographique (CCM) en 7 fractions. Les fractions contenant l'isatan A et l'isatan B ont été évaporées sous vide à température ambiante. 7,07mg d'isatan B et 121,16 mg d'un mélange isatan A et de glucobrassicine ont été obtenus. Leur profil a été analysé par UHPLC-ESI-HRMS.

4.5.2 Purification de l'isatan A

L'isatan A a été isolé de la glucobrassicine par séparation liquide-liquide. La fraction a été solubilisée dans 10 mL d'eau distillée et lavée cinq fois par des ajouts successifs de 10 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique a été collectée et concentrée sous vide à température ambiante pour conduire à 15,3 mg d'isatan A. La phase aqueuse a été lyophilisée pour obtenir 104 mg d'un mélange de glucobrassicine et d'isatan A. Leur profil a été analysé par UHPLC-ESI-HRMS.

4.6 Etude de la réactivité des précurseurs dans les conditions de production du bleu

4.6.1 Essais à température ambiante

5 mg d'isatan A et 2,3 mg d'isatan B ont été solubilisés dans de l'eau distillée pour atteindre une concentration de 1 mg/mL, à température ambiante. Les solutions ont été fractionnées et chacune a subi différents traitements, en trois réplicats :

- Dans 1 mL de solution, 1 mL d'eau distillée a été ajouté.
- Dans 1 mL de solution, 1 mL d'une solution aqueuse d'HCl à 0,01 mol/L a été ajouté pour obtenir un pH de 3.
- Dans 1 mL de solution, 1 mL d'une solution aqueuse d'HCl à 0,3 mol/L a été ajouté pour obtenir un pH de 1.
- Dans 1 mL de solution, 1 mL d'une solution aqueuse de NaOH à 0,1 mmol/L est ajoutée pour obtenir un pH de 10 et donner la solution basique

Après une heure, 200 µL de chaque solution à 0,5 mg/mL de précurseurs ont été prélevés pour être analysés par UHPLC-ESI-HRMS.

4.6.2 Essais à 60°C

8,7 mg d'isatan A et 7 mg d'isatan B ont été solubilisés dans de l'eau du robinet à des concentrations de 1 mg/mL. Les deux solutions ont été fractionnées comme le montre la Fig. 56 d'abord pour tester l'influence de deux pH différents : pH 1 et pH 3 pour la solution d'isatan A et de pH 3 et pH neutre pour la solution d'isatan B. La préparation des solutions a été réalisée comme en 4.6.1. Ces solutions ont ensuite été chauffées à 60°C ou laissées à température ambiante (T.A.) pendant 1 h. Un aliquot de chaque solution a été prélevé et analysé à une concentration de 0,5 mg/mL en UHPLC-ESI-HRMS. 10 mg de β-glucosidase d'amande (Sigma®) ont été incorporés à chaque échantillon et agité pendant 30 minutes. Un aliquot de chaque expérience a été prélevé et analysé à une concentration de 0,5 mg/mL en UHPLC-ESI-HRMS.

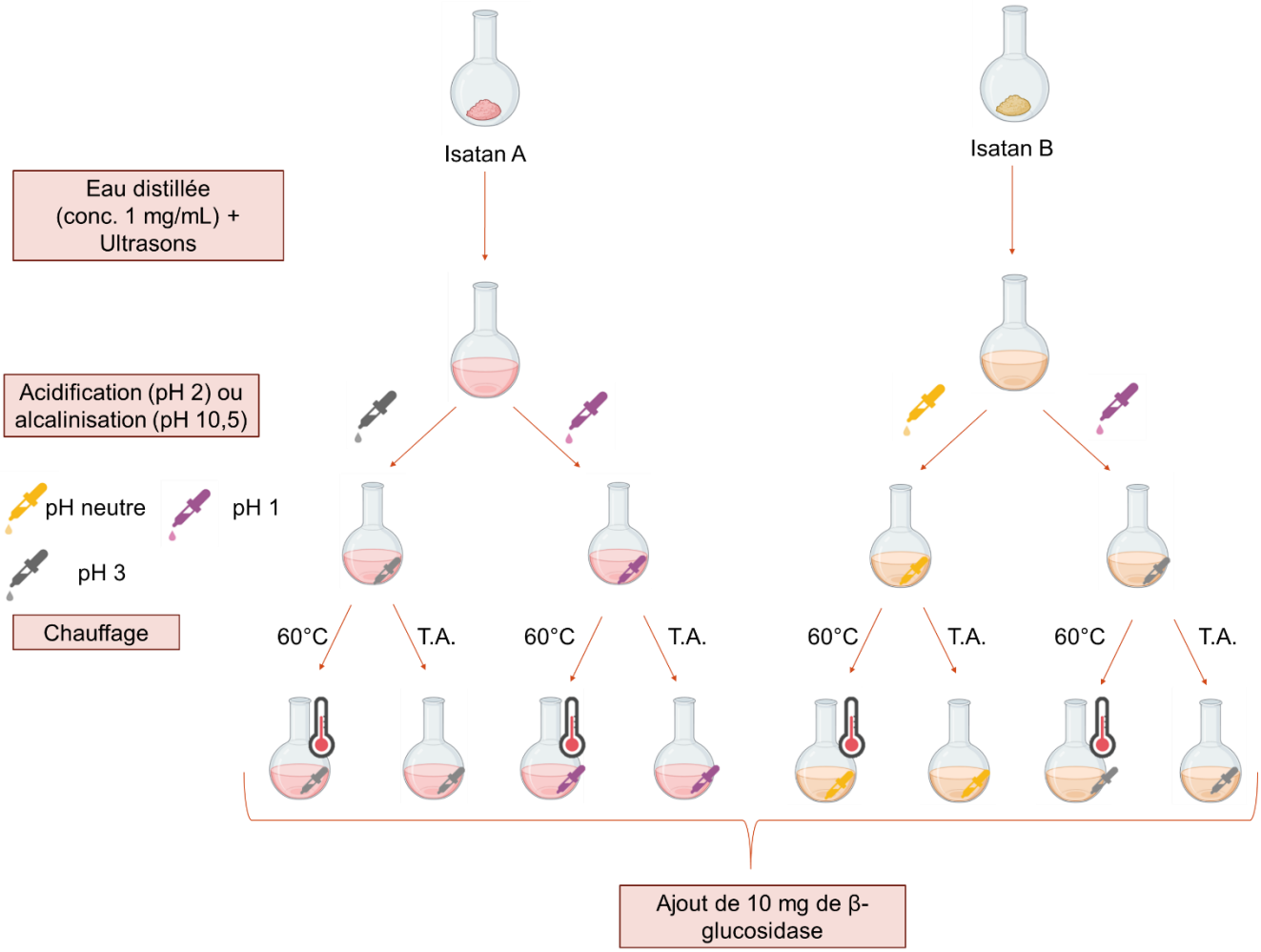


Figure 56 - Représentation de la préparation des échantillons dans différentes conditions de production pour l'étude de la réactivité des précurseurs

4.6.3 Voltammétrie cyclique

Les mesures électrochimiques ont été réalisées avec un potentiostat Autolab 20 (EcoChemie) dans les tampons de pH utilisés (du sulfate de sodium 0,1 M a pu être utilisé pour assurer la conductivité du milieu) avec les mini-cellules (1,5 à 3 mL) : électrode auxiliaire, fil de Pt ; référence, électrode au calomel saturé ECS ; électrode de travail, carbone vitreux CV diamètre 1 mm et platine Pt diamètre 0,5 mm. Les voltammogrammes ayant été mieux définis sur carbone vitreux, on restera sur les résultats obtenus à cette électrode.

La principale méthode utilisée est la voltammétrie cyclique qui consiste à effectuer à une électrode fixe un balayage de potentiel aller et retour à différentes vitesses de balayage de potentiel (la plus classique est de 0,1 V/s). Pour un substrat oxydable, on peut obtenir ce type de voltammogramme :

Au balayage aller, le composé est oxydé à son potentiel redox et le courant de pic est relié à sa concentration. Au balayage retour, le composé oxydé est réduit et donne un pic retour. On a alors affaire à un système réversible, le produit est stable. Les potentiels standards E° sont calculés par la demi-somme des potentiels de pics aller et retour du voltampérogramme.

Si le produit n'est pas stable, il n'y a pas de pic retour, le système redox est irréversible. On peut alors augmenter la vitesse de balayage de potentiel pour faire éventuellement apparaître ce pic retour et évaluer la durée de vie du produit. Dans ces cas, les voltammogrammes sont normalisés par rapport à la vitesse de balayage de potentiel v, on trace le courant I/v1/2 en fonction du potentiel E/ecs. Sachant que le courant mesuré d'un système diffuionnel est proportionnel à la racine carrée de la vitesse de potentiel v1/2, tout écart laisse présager de réactions chimiques couplées ou de phénomènes d'adsorption.

1,42 mg d'isatan A, 0,68 mg d'isatan B et 4 mg d'indican ont été solubilisés respectivement dans 1,42 mL et 0,68 puis analysés en voltammétrie cyclique. Une fois les voltammogrammes obtenus, les solutions ont été acidifiée à pH 3 avec 1 mL d'une solution d'HCl à 5%. Les solutions ont été chauffées à 60°C pendant 1h, puis séparées en deux pour être traitées avec 5 mg de β-glucosidase ou sans traitement enzymatique. Les solutions ont ensuite été analysées en voltammétrie cyclique puis basifiée avec un excès d'une solution de NaOH à 5%.

4.7 Procédé de production du pigment de Pastel

4.7.1 Production du pigment au LCA (méthode de 2016)

Le procédé d'extraction correspond à une méthode mise en place par le LCA pour 500 g de feuilles. Les feuilles fraiches ont été immergées dans 4 L d'eau du robinet chauffée à 60°C et acidifiée à pH 3 avec 5 mL d'acide chlorhydrique (HCl) à 37%, dans un réacteur double enveloppe de 5 L. Les feuilles ont été maintenues immergées pendant une heure, sans être agitées. L'extrait a été filtré dans une passoire pour retenir les feuilles et d'autres grosses impuretés. Après refroidissement à température ambiante, l'extrait a été alcalinisé avec 45 mL d'une solution de soude à 1M pour atteindre un pH

de 10,5. Selon les conditions employées, la solution a été bullée avec un tuyau relié à une pompe, agitée manuellement ou avec une palle à 100 rpm ou laissée sans agitation pendant une heure. L'extrait a ensuite été placé pendant au moins 24 h en chambre froide, à 4°C. Pour récupérer le pigment, deux conditions ont été mises en place : par filtration sur un fritté de porosité 100 µm puis 45 µm après avant juillet 2021, puis par centrifugation. Le pigment récupéré a été rincé plusieurs fois à l'eau distillé puis mis à sécher dans une étuve à 50°C pendant 24 h, avant d'être pesé.

4.7.2 Plan d'expérience

Trois plans d'expérience ont été mis en place pour le suivi de différents paramètres à des périodes données différentes, respectivement nommés PE1 (08/21), PE2 (09/21) et PE3 (10/21). Lors de l'expérience sur le pré-traitement des feuilles (PE1), les feuilles fraiches ont été nettoyées avec de l'eau du robinet puis l'eau de rinçage a rapidement été évacuée. Les feuilles fraîches ont été immergées dans 1,5 L d'eau du robinet, dans des flacons de 2 L, et les flacons ont été immergés dans des bains marie, selon les températures, durées et pH présentés en tableau 17.

Tableau 17 - Paramètres d'extraction et de précipitation de la production de pigment effectuées pour les plans d'expérience PE1, PE2 et PE3 en 2021

Plan d'expérience	Date extraction	Echantillon	Type feuilles	Masse feuilles fraiches (g)	Masse sèche feuilles	Température (°C)	Nombre lavages	Volume eau (L)	Nature acide	pH acide	Consigne bain marie (°C)	Durée extraction (min)	Nature base	pH basique	Date fin précipitation à 4°C
PE1	24/08/2021	FF2	Jeunes/ petites	179,8	18,1%	70	1	1,50	HCl	3,0	60,00	60	NaOH	10,47	26/08/2021
	24/08/2021	FF3	Jeunes/ petites	179,9	18,1%	58,75	2	1,50	HCl	3,0	60,00	60	NaOH	10,54	26/08/2021
	24/08/2021	FF4	Jeunes/ petites	180,3	18,1%	36,25	2	1,50	HCl	3,0	60,00	60	NaOH	10,46	26/08/2021
	24/08/2021	FF5	Jeunes/ petites	179,9	18,1%	25	1	1,50	HCl	3,0	60,00	60	NaOH	10,52	26/08/2021
	24/08/2021	FF6	Jeunes/ petites	180,1	18,1%	-	0	1,50	HCl	3,0	60,00	60	NaOH	10,69	26/08/2021
	24/08/2021	FF7	Jeunes/ petites	180,2	18,1%	25	1	1,50	HCl	3,0	60,00	60	NaOH	10,5	26/08/2021

	24/08/2021	FF8	Jeunes/ petites	180,2	18,1%	25	1	1,45	HCl	3,0	60,00	60	NaOH	10,51	26/08/ 2021
PE2	14/09/2021	FF1	Jeunes/ petites	187,3	13,9%	25	1	1,50	HCl	3,51	42,5	120	NaOH	10,59	16/09/ 2021
	14/09/2021	FF2	Jeunes/ petites	187,1	13,9%	25	1	1,50	HCl	5,02	42,5	120	NaOH	10,48	16/09/ 2021
	14/09/2021	FF3	Jeunes/ petites	187,2	13,9%	25	1	1,51	HCl	4,27	42,5	172	NaOH	10,48	16/09/ 2021
	14/09/2021	FF4	Jeunes/ petites	186,9	13,9%	25	1	1,51	HCl	2,74	42,5	172	NaOH	10,54	16/09/ 2021
	14/09/2021	FF5	Jeunes/ petites	189,4	13,9%	25	1	1,50	HCl	2,01	42,5	120	NaOH	10,52	16/09/ 2021
	14/09/2021	FF6	Jeunes/ petites	186,9	13,9%	25	1	1,50	HCl	2,74	42,5	68	NaOH	10,58	16/09/ 2021
	14/09/2021	FF7	Jeunes/ petites	186,9	13,9%	25	1	1,50	HCl	4,27	42,5	68	NaOH	10,46	16/09/ 2021
	14/09/2021	FF8	Jeunes/ petites	187,1	13,9%	25	1	1,50	HCl	3,51	42,5	120	NaOH	10,47	16/09/ 2021
	15/09/2021	FF9	Jeunes/ petites	187,1	13,9%	25	1	1,51	HCl	4,27	56,8	137	NaOH	10,49	17/09/ 2021
	15/09/2021	FF10	Jeunes/ petites	187,1	13,9%	25	1	1,50	HCl	2,74	56,8	137	NaOH	10,47	17/09/ 2021
	15/09/2021	FF11	Jeunes/ petites	187,1	13,9%	25	1	1,50	HCl	3,5	56,8	85	NaOH	10,48	17/09/ 2021
	15/09/2021	FF12	Jeunes/ petites	187,2	13,9%	25	1	1,50	HCl	4,23	28,2	103	NaOH	10,57	17/09/ 2021
	15/09/2021	FF13	Jeunes/ petites	187,2	13,9%	25	1	1,51	HCl	2,74	28,2	103	NaOH	10,50	17/09/ 2021
	15/09/2021	FF14	Jeunes/ petites	186,9	13,9%	25	1	1,51	HCl	3,51	28,2	155	NaOH	10,50	17/09/ 2021
	15/09/2021	FF15	Jeunes/ petites	187,0	13,9%	25	1	1,50	HCl	3,51	42,5	120	NaOH	10,49	16/09/ 2021
	15/09/2021	FF16	Jeunes/ petites	187,2	13,9%	25	1	1,51	HCl	3,51	42,5	120	NaOH	10,48	16/09/ 2021
	15/09/2021	FF17	Jeunes/ petites	186,9	13,9%	25	1	1,50	-	7	42,5	120	NaOH	10,48	16/09/ 2021
PE3	12/10/2021	FF1	Jeunes/ petites	187,1	14,0%	25	1	1,51	HCl	2,75	42	120	NaOH	10,49	14/10/ 2021
	12/10/2021	FF2	Jeunes/ petites	187,0	14,0%	25	1	1,50	HCl	4,37	42	120	NaOH	10,5	14/10/ 2021
	12/10/2021	FF3	Jeunes/ petites	187,2	14,0%	25	1	1,50	HCl	3,50	58	120	NaOH	10,47	14/10/ 2021
	12/10/2021	FF4	Jeunes/ petites	187,3	14,0%	25	1	1,50	HCl	1,79	58	120	NaOH	10,49	14/10/ 2021

12/10/2021	FF5	Jeunes/ petites	186,7	14,0%	25	1	1,51	HCl	0,99	42	120	NaOH	10,5	14/10/ 2021
12/10/2021	FF6	Jeunes/ petites	186,9	14,0%	25	1	1,50	HCl	1,79	27	120	NaOH	10,49	14/10/ 2021
12/10/2021	FF7	Jeunes/ petites	187,2	14,0%	25	1	1,50	HCl	3,50	27	120	NaOH	10,51	14/10/ 2021
12/10/2021	FF8	Jeunes/ petites	186,9	14,0%	25	1	1,51	HCl	3,30	42,0	120	NaOH	10,54	14/10/ 2021
12/10/2021	FF9	Jeunes/ petites	186,9	14,0%	25	1	1,50	HCl	3,50	42,0	120	NaOH	10,53	14/10/ 2021
12/10/2021	FF10	Jeunes/ petites	102,8	14,0%	25	1	1,50	HCl	3,50	42,0	120	NaOH	10,52	14/10/ 2021

4.8 Evaluation de la qualité du pigment

4.8.1 Colorimétrie

La qualité du pigment est évaluée par spectrophotométrie, selon le référentiel CIELAB. Les mesures ont été réalisées avec un appareil de spectrocolorimétrie (CM-3500d Spectrocolorimètre, Konica Minolta, Japan). Les valeurs de L*, a* et b* ont été obtenues automatiquement avec le logiciel SpectraMagic ™NX (version 1.9, Minolta Co., Tokyo, Japan). Le standard choisi était un pigment produit en 2006 par la méthode de production précédemment décrite (Chapitre 5.7.1).

Le système colorimétrique CIELAB définit les coordonnées d'une couleur comme ceci : L* correspond à la luminance allant de 0 (noir) à (blanc), a* correspond au nuancier de couleurs allant du -128 (vert) au 127 (rouge) et b* correspond au nuancier de couleurs allant de -128 (bleu) à 127 (jaune). Le changement global de couleur ΔE* est calculé pour chaque pigment à partir de l'équation suivante :

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

ΔL*, Δa* et Δb* correspondent respectivement aux différences de L*, a* et b* par rapport à leur valeur initiale [152].

4.8.2 Spectrophotométrie UV-visible

La lecture de l'absorbance a été réalisée sur un spectrophomètre Shimadzu 1800. Les spectres UV-visible sont été obtenus par un balayage progressif des longueurs d'onde entre 200 et 700nm et l'absorbance a été obtenue en sélectionnant une longueur d'onde précise. L'étalonnage de l'indigo a été réalisé avec trois solutions d'un mélange de 30 ± 1 mg d'indigo commercial avec 300 ± 5 mg de KBr (Figure 44). Après homogénéisation à l'aide d'un pilon, 30 ± 1 mg du mélange a été dissout dans 25 mL de DMF, mis sous ultrasons et filtré avec un filtre de porosité 0,45µm. L'absorbance pour chaque échantillon a été lue trois fois à λ = 611 nm. Les pigments ont été analysés selon cette méthode.

Références

[1] Mocquard J, Le Lamer A-C, Fabre P-L, Mathieu C, Chastrette C, Vitrai A, et al. Indigo dyeing from *Isatis tinctoria* L.: From medieval to modern use. Dyes Pigments 2022:110675. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110675.

[2] Stasiak N, Kukula-Koch W, Glowniak K. Modern industrial and pharmacological applications of indigo dye and its derivatives-a review. Acta Pol Pharm 2014;71:215–21.

[3] Kramell AE, Wertmann P, Hosner D, Kluge R, Oehler F, Wunderlich C-H, et al. A multi-analytical techniques based approach to study the colorful clothes and accessories from mummies of Eastern Central Asia. J Archaeol Sci Rep 2016;10:464–73. https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2016.11.021.

[4] Rohani N, Salvant J, Bahaadini S, Cossairt O, Walton M, Katsaggelos A. Automatic pigment identification on roman egyptian paintings by using sparse modeling of hyperspectral images. Eur. Signal Process. Conf. EUSIPCO, IEEE; 2016, p. 2111–5. https://doi.org/10.1109/EUSIPCO.2016.7760621.

[5] Splitstoser J, Dillehay T, Wouters J, Claro A. Early pre-Hispanic use of indigo blue in Peru. Sci Adv 2016;2:e1501623–e1501623. https://doi.org/10.1126/sciadv.1501623.

[6] Balfour-Paul J. Indigo. vol. 264. British Museum Press London; 1998.

[7] Kramell AE, García-Altares M, Pötsch M, Kluge R, Rother A, Hause G, et al. Mapping Natural Dyes in Archeological Textiles by Imaging Mass Spectrometry. Sci Rep 2019;9:2331. https://doi.org/10.1038/s41598-019-38706-4.

[8] Humphrey PI. The Use of Mass Spectrometry to Differentiate Blue Dyes From Indigo and Woad. McNair Sch Res J 2017;10:73–87.

[9] Pauk V, Michalčáková J, Jagošová K, Lemr K. Origin of indigo colorants revealed by ion mobility spectrometry coupled to mass spectrometry followed by supervised classification. Dyes Pigments 2022;197:109943. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109943.

[10] Speranza J, Miceli N, Taviano MF, Ragusa S, Kwiecień I, Szopa A, et al. *Isatis tinctoria* L. (Woad): A Review of Its Botany, Ethnobotanical Uses, Phytochemistry, Biological Activities, and Biotechnological Studies. Plants 2020;9:298. https://doi.org/10.3390/plants9030298.

[11] Feng J, Huang D, Yang Y, Chen J, Qiu S, Lv Z, et al. *Isatis indigotica*: from (ethno) botany, biochemistry to synthetic biology. Mol Hortic 2021;1:1–14. https://doi.org/10.1186/s43897-021-00021-w.

[12] WFO (2022): *Isatis indigotica* Fortune. World Flora Online 1846. http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000732392 (accessed December 8, 2022).

[13] Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Tropicos.org. Isatis indigotica Fortune. Tropicos n.d. https://www.tropicos.org/name/4102170 (accessed December 8, 2022).

[14] Sanda B, Liliana I. Natural dye extraction and dyeing of different fibers: a review. Innov Emerg Technol Text Dye Finish 2021:113–35. https://doi.org/10.1002/9781119710288.ch4.

[15] Bechtold T, Mussak R, editors. Handbook of natural colorants. Chichester, U.K: Wiley; 2009.

[16] Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. Phytochemistry 2001;56:5–51. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00316-2.

[17] Mithöfer A, Boland W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. Annu Rev Plant Biol 2012;63:431–50. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103854.

[18] Hamburger M. *Isatis tinctoria* – From the rediscovery of an ancient medicinal plant towards a novel anti-inflammatory phytopharmaceutical. Phytochem Rev 2002;1:333–44. https://doi.org/10.1023/A:1026095608691.

[19] Plitzko I, Mohn T, Sedlacek N, Hamburger M. Composition of *Indigo naturalis*. Planta Med 2009;75:860–3. https://doi.org/10.1055/s-0029-1185447.

[20] Spataro G, Taviani P, Negri V. Genetic Variation and Population Structure in a Eurasian Collection of *Isatis tinctoria* L. Genet Resour Crop Evol 2007;54:573–84. https://doi.org/10.1007/s10722-006-0014-4.

[21] Prasad R. Indigo—The Crop that Created History and then Itself Became History. Indian J Hist Sci 2018;53:296–301. https://doi.org/10.16943/ijhs/2018/v53i3/49461.

[22] Paul R, Blackburn RS, Bechtold T. Indigo and Indigo Colorants. In: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, editor. Ullmanns Encycl. Ind. Chem. 1st ed., Wiley; 2021, p. 1–16. https://doi.org/10.1002/14356007.a14_149.pub3.

[23] Chavan RB. Indigo dye and reduction techniques. Denim, 2015, p. 37–67. https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-843-6.00003-2.

[24] Das M, Devi KP. Dihydroactinidiolide regulates Nrf2/HO-1 expression and inhibits caspase-3/Bax pathway to protect SH-SY5Y human neuroblastoma cells from oxidative stress induced neuronal apoptosis. Neurotoxicology 2021;84:53–63. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.02.006.

[25] Mohammadi H. Sodium dithionate (Na2S2O4) induces oxidative damage in mice mitochondria heart tissue. Toxicol Rep 2022. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.06.016.

[26] Choi K-Y. A review of recent progress in the synthesis of bio-indigoids and their biologically assisted end-use applications. Dyes Pigments 2020;181:108570. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108570.

[27] Chakraborty J, Chavan R. Dyeing of denim with indigo. Indian J Fibre Text Res 2004;29:100–9.

[28] Christie R. Why is indigo blue? Biotech Histochem 2007;82:51–6. https://doi.org/10.1080/00958970701267276.

[29] Kettner F, Hüter L, Schäfer J, Röder K, Purgahn U, Krautscheid H. Selective crystallization of indigo B by a modified sublimation method and its redetermined structure. Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online 2011;67:o2867. https://doi.org/10.1107/S1600536811040220.

[30] Konarev DV, Khasanov SS, Kuzmin AV, Shestakov AF, Otsuka A, Yamochi H, et al. cis-Conformation of indigo in the coordination complex (indigo-O, O)(Cp* Cr II Cl). Dalton Trans 2016;45:17095–9. https://doi.org/10.1039/C6DT03545K.

[31] Munshi MU, Martens J, Berden G, Oomens J. Protoisomerization of indigo and isoindigo dyes confirmed by gas-phase infrared ion spectroscopy. J Phys Chem A 2019;123:8226–33. https://doi.org/10.1021/acs.jpca.9b06858.

[32] Dutta S, Roychoudhary S, Sarangi BK. Effect of different physico-chemical parameters for natural indigo production during fermentation of Indigofera plant biomass. 3 Biotech 2017;7:322. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0923-2.

[33] Stoker KG, Cooke DT, Hill DJ. An Improved Method for the Large-Scale Processing of Woad (*Isatis tinctoria*) for Possible Commercial Production of Woad Indigo. J Agric Eng Res 1998;71:315–20. https://doi.org/10.1006/jaer.1998.0329.

[34] Hartl A, Proaño Gaibor AN, van Bommel MR, Hofmann-de Keijzer R. Searching for blue: Experiments with woad fermentation vats and an explanation of the colours through dye analysis. J Archaeol Sci Rep 2015;2:9–39. https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2014.12.001.

[35] Johnson-Buck A, Kim G, Wang S, Hah HJ, Kopelman R. Fabrication, Characterization, and Spectral Properties of Indigo Blue Nanocrystals. Mol Cryst Liq Cryst 2009;501:138–44. https://doi.org/10.1080/15421400802697756.

[36] Bond AM, Marken F, Hill E, Compton RG, Hügel H. The electrochemical reduction of indigo dissolved in organic solvents and as a solid mechanically attached to a basal plane pyrolytic graphite electrode immersed in aqueous electrolyte solution. J Chem Soc Perkin Trans 2 1997:1735–42. https://doi.org/10.1039/A701003F.

[37] Novotna P, Boon JJ, Horst J, Pacakova V. Photoegradation of indigo in dichloromethane solution. Color Technol 2003;119:121–7. https://doi.org/10.1111/j.1478-4408.2003.tb00161.x.

[38] Green L, Daniels V. The use of N-methyl-2-pyrrolidone (NM2P) as a solvent for the analysis of indigoid dyes. British Museum; 1995.

[39] Garcia-Macias P, John P. Formation of Natural Indigo Derived from Woad (*Isatis tinctoria* L.) in Relation to Product Purity. J Agric Food Chem 2004;52:7891–6. https://doi.org/10.1021/jf0486803.

[40] Nicholson SK, John P. Bacterial Indigo Reduction. Biocatal Biotransformation 2004;22:397–400. https://doi.org/10.1080/10242420400024490.

[41] Gerometta E, Grondin I, Smadja J, Frederich M, Gauvin-Bialecki A. A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology of the genus Indigofera. J Ethnopharmacol 2020;253:112608. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112608.

[42] Chen Q, Lan H-Y, Peng W, Rahman K, Liu Q-C, Luan X, et al. *Isatis indigotica*: a review of phytochemistry, pharmacological activities and clinical applications. J Pharm Pharmacol 2021;73:1137–50. https://doi.org/10.1093/jpp/rgab014.

[43] Spataro G, Negri V. Adaptability and variation in *Isatis tinctoria* L.: a new crop for Europe. Euphytica 2008;163:89–102. https://doi.org/10.1007/s10681-007-9604-2.

[44] Chevreul ME. De la loi du contraste simultané des couleurs, et de ses applications. vol. 1. Pitois-Levrault; 1839.

[45] Schunck E. On the formation of indigo blue (part I). Philos Mag J Sci 1855;10:74–95. https://doi.org/10.1080/14786445508641936.

[46] Macbeth AK, Pryde J. CXCVIII.—Studies of the glucosides. Part I. The constitution of indican. J Chem Soc Trans 1922;121:1660–8. https://doi.org/10.1039/CT9222101660.

[47] Hoogewerff S, Meulen HT. Contribution to the knowledge of indican. K Ned Akad Van Wet Proc Ser B Phys Sci 1899;2:520–5.

[48] Hazewinkel J. Indican-its hydrolysis and enzyme causing the same. K Ned Akad Van Wet Proc Ser B Phys Sci 1899;2:512–20.

[49] Oberthur C, Graf H, Hamburger M. The content of indigo precursors in leaves ? a comparative study of selected accessions and post-harvest treatments. Phytochemistry 2004;65:3261–8. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.10.014.

[50] Schmidt H. Indigo-100 years of industrial synthesis. Chem Unserer Zeit 1997;31:121–8.

[51] Ludewig W. Highlights in the history of BASF'. Trans Inst Chem Eng Chem Eng 1966;44:T237.

[52] Gray P. The formation of indigotin from indol by soil bacteria. Proc R Soc Lond Ser B Contain Pap Biol Character 1928;102:263–80. https://doi.org/10.1098/rspb.1928.0003.

[53] Han X, Wang W, Xiao X. Microbial biosynthesis and biotransformation of indigo and indigo-like pigments. Chin J Biotechnol 2008;24:921–6. https://doi.org/10.1016/S1872-2075(08)60043-6.

[54] Park H, Park G, Jeon W, Ahn J-O, Yang Y-H, Choi K-Y. Whole-cell biocatalysis using cytochrome P450 monooxygenases for biotransformation of sustainable bioresources (fatty acids, fatty alkanes, and aromatic amino acids). Biotechnol Adv 2020;40:107504. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107504.

[55] Fabara AN, Fraaije MW. An overview of microbial indigo-forming enzymes. Appl Microbiol Biotechnol 2020;104:925–33. https://doi.org/10.1007/s00253-019-10292-5.

[56] Zhang X, Qu Y, Ma Q, Zhou H, Li X, Kong C, et al. Cloning and expression of naphthalene dioxygenase genes from *Comamonas* sp. MQ for indigoids production. Process Biochem 2013;48:581–7. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.008.

[57] Royo JL, Moreno-Ruiz E, Cebolla A, Santero E. Stable long-term indigo production by overexpression of dioxygenase genes using a chromosomal integrated cascade expression circuit. J Biotechnol 2005;116:113–24. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.10.006.

[58] Qu Y, Xu B, Zhang X, Ma Q, Zhou H, Kong C, et al. Biotransformation of indole by whole cells of recombinant biphenyl dioxygenase and biphenyl-2,3-dihydrodiol-2,3-dehydrogenase. Biochem Eng J 2013;72:54–60. https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.12.021.

[59] Murdock D, Ensley BD, Serdar C, Thalen M. Construction of metabolic operons catalyzing the de novo biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*. Bio/Technology 1993;11:381–6. https://doi.org/10.1038/nbt0393-381.

[60] Ameria SPL, Jung HS, Kim HS, Han SS, Kim HS, Lee JH. Characterization of a flavin-containing monooxygenase from *Corynebacterium glutamicum* and its application to production of indigo and indirubin. Biotechnol Lett 2015;37:1637–44. https://doi.org/10.1007/s10529-015-1824-2.

[61] Shi S, Ma F, Sun T, Li A, Zhou J, Qu Y. Biotransformation of indole to indigo by the whole cells of phenol hydroxylase engineered strain in biphasic systems. Appl Biochem Biotechnol 2013;169:1088–97. https://doi.org/10.1007/s12010-012-0069-y.

[62] Mermod N, Harayama S, Timmis KN. New Route to Bacterial Production of Indigo. Nat Biotechnol 1986;4:321–4. https://doi.org/10.1038/nbt0486-321.

[63] Dai C, Ma Q, Li Y, Zhou D, Yang B, Qu Y. Application of an efficient indole oxygenase system from *Cupriavidus* sp. SHE for indigo production. Bioprocess Biosyst Eng 2019;42:1963–71. https://doi.org/10.1007/s00449-019-02189-4.

[64] Kim H-J. Biosynthesis of indigo in *Escherichia coli* expressing self-sufficient CYP102A from *Streptomyces cattleya*. Dyes Pigments 2017;140:29–35. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.01.029.

[65] Cheng L, Yin S, Chen M, Sun B, Hao S, Wang C. Enhancing indigo production by over-expression of the styrene monooxygenase in Pseudomonas putida. Curr Microbiol 2016;73:248–54. https://doi.org/10.1007/s00284-016-1055-3.

[66] Hsu TM, Welner DH, Russ ZN, Cervantes B, Prathuri RL, Adams PD, et al. Employing a biochemical protecting group for a sustainable indigo dyeing strategy. Nat Chem Biol 2018;14:256–61. https://doi.org/10.1038/nchembio.2552.

[67] Han J, Jiang X, Zhang L. Optimisation of extraction conditions for polysaccharides from the roots of *Isatis tinctoria* L. by response surface methodology and their in vitro free radicals scavenging activities and effects on IL-4 and IFN-γ mRNA expression in chicken lymphocytes. Carbohydr Polym 2011;86:1320–6. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.036.

[68] Lu Y, Mei L. Co-expression of P450 BM3 and glucose dehydrogenase by recombinant *Escherichia coli* and its application in an NADPH-dependent indigo production system. J Ind Microbiol Biotechnol 2007;34:247–53. https://doi.org/10.1007/s10295-006-0193-1.

[69] Kim J, Park W. Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration? J Microbiol 2015;53:421–8. https://doi.org/10.1007/s12275-015-5273-3.

[70] Lundemo MT, Woodley JM. Guidelines for development and implementation of biocatalytic P450 processes. Appl Microbiol Biotechnol 2015;99:2465–83. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6403-x.

[71] Martin-Leake H. An historical memoir of the indigo industry of Bihar. Econ Bot 1975;29:361–71. https://doi.org/10.1007/BF02862183.

[72] Al-Shehbaz IA, Beilstein MA, Kellogg EA. Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. Plant Syst Evol 2006;259:89–120. https://doi.org/10.1007/s00606-006-0415-z.

[73] Comlekcioglu N, Efe L, Karaman S. Extraction of Indigo from Some *Isatis* species and Dyeing Standardization Using Low-technology Methods. Braz Arch Biol Technol 2015;58:96–102. https://doi.org/10.1590/S1516-8913201502658.

[74] Guarino C, Casoria P, Menale B. Cultivation and use of *Isatis tinctoria* L. (Brassicaceae) in Southern Italy. Econ Bot 2000;54:395–400. https://doi.org/10.1007/BF02864789.

[75] Monaco T, Johnson D, Creech J. Morphological and physiological responses of the invasive weed *Isatis tinctoria* to contrasting light, soil-nitrogen and water. Weed Res 2005;45:460–6. https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2005.00480.x.

[76] Campeol E, Angelini LG, Tozzi S, Bertolacci M. Seasonal variation of indigo precursors in *Isatis tinctoria* L. and *Polygonum tinctorium* Ait. as affected by water deficit. Environ Exp Bot 2006;58:223–33. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.09.006.

[77] Schunck E. New Investigations About Indican. Chem News J Ind Sci 1900;82:176.

[78] Beijerinck M. Further researches on the Formation of Indigo from the Woad (*Isatis tinctoria*). K Ned Akad Van Wet Proc Ser B Phys Sci 1900;3:101–16.

[79] Epstein E, Nabors MW, Stowe BB. Origin of Indigo in woad. Nature 1967;216:547–9. https://doi.org/10.1038/216547a0.

[80] Strobel J, Gröger D. ßber das Vorkommen von Indigovorstufen in *Isatis*-Species. Biochem Physiol Pflanz 1989;184:321–7. https://doi.org/10.1016/S0015-3796(89)80019-8.

[81] Gilbert KG, Cooke DT. Qualitative analysis of indigo precursors from woad by HPLC and HPLC-MS. Phytochem Anal 2000;11:18–20. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(200001/02)11:1<18::AID-PCA483>3.0.CO;2-X.

[82] Maugard T, Enaud E, Choisy P, Legoy MD. Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad). Phytochemistry 2001;58:897–904. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00335-1.

[83] Gilbert KG, Maule HG, Rudolph B, Lewis M, Vandenburg H, Sales E, et al. Quantitative analysis of indigo and indigo precursors in leaves of *Isatis* spp. and *Polygonum tinctorium*. Biotechnol Prog 2004;20:1289–92. https://doi.org/10.1021/bp0300624.

[84] Oberthür C, Schneider B, Graf H, Hamburger M. The Elusive Indigo Precursors in Woad (*Isatis tinctoria* L.)– Identification of the Major Indigo Precursor, Isatan A, and a Structure Revision of Isatan B. Chem Biodivers 2004;1:174–82. https://doi.org/10.1002/cbdv.200490009.

[85] Xia Z-Q, Zenk MH. Biosynthesis of indigo precursors in higher plants. Phytochemistry 1992;31:2695–7. https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83613-4.

[86] Jin Z, Kim J-H, Park SU, Kim S-U. Cloning and characterization of indole synthase (INS) and a putative tryptophan synthase α-subunit (TSA) genes from *Polygonum tinctorium*. Plant Cell Rep 2016;35:2449–59. https://doi.org/10.1007/s00299-016-2046-3.

[87] Salvini M, Boccardi TM, Sani E, Bernardi R, Tozzi S, Pugliesi C, et al. Alpha-tryptophan synthase of *Isatis tinctoria*: gene cloning and expression. Plant Physiol Biochem 2008;46:715–23. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.04.002.

[88] Milcent R, Chau F. Chimie organique hétérocyclique (Structures fondamentales). EDP Sciences; 2012.

[89] Warzecha H, Frank A, Peer M, Gillam EMJ, Guengerich FP, Unger M. Formation of the indigo precursor indican in genetically engineered tobacco plants and cell cultures. Plant Biotechnol J 2007;5:185–91. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00231.x.

[90] Gillam EMJ, Notley LM, Cai H, De Voss JJ, Guengerich FP. Oxidation of Indole by Cytochrome P450 Enzymes †$. Biochemistry 2000;39:13817–24. https://doi.org/10.1021/bi001229u.

[91] Marcinek H, Weyler W, Deus-Neumann B, Zenk MH. Indoxyl-UDPG-glucosyltransferase from *Baphicacanthus cusia*. Phytochemistry 2000;53:201–7. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00430-6.

[92] Minami Y, Nishimura O, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Matsubara H. Tissue and Intracellular Localization of Indican and the Purification and Characterization of

Indican Synthase from Indigo Plants. Plant Cell Physiol 2000;41:218–25. https://doi.org/10.1093/pcp/41.2.218.

[93] Zhang W, Wang S, Yang J, Kang C, Huang L, Guo L. Glycosylation of plant secondary metabolites: Regulating from chaos to harmony. Environ Exp Bot 2022;194:104703. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104703.

[94] Peterbauer CK. Pyranose dehydrogenases: Rare enzymes for electrochemistry and biocatalysis. Bioelectrochemistry 2020;132:107399. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.107399.

[95] D'Auria JC. Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. Curr Opin Plant Biol 2006;9:331–40. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.016.

[96] Inoue S, Morita R, Kuwata K, Kunieda T, Ueda H, Hara-Nishimura I, et al. Tissue-specific and intracellular localization of indican synthase from Polygonum tinctorium. Plant Physiol Biochem 2018;132:138–44. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.08.034.

[97] Minami Y, Kanafuji T, Miura K. Purification and characterization of a β-glucosidase from *Polygonum tinctorium*, which catalyzes preferentially the hydrolysis of indican. Biosci Biotechnol Biochem 1996;60:147–9. https://doi.org/10.1271/bbb.60.147.

[98] Minami Y, Takao H, Kanafuji T, Miura K, Kondo M, Hara-Nishimura I, et al. β-Glucosidase in the Indigo Plant: Intracellular Localization and Tissue Specific Expression in Leaves. Plant Cell Physiol 1997;38:1069–74. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029273.

[99] Russell GA, Kaupp G. Reactions of resonance stabilized carbanions. XXXI. Oxidation of carbanions. 4. Oxidation of indoxyl to indigo in basic solution. J Am Chem Soc 1969;91:3851–9. https://doi.org/10.1021/ja01042a028.

[100] Zelentskii A, Fomin G, Kutafina N, Berlin A. The mechanism of oxidation of indoxyl and its analogs to indigo and indigoides. Bull Acad Sci USSR Div Chem Sci 1970;19:1105–7. https://doi.org/10.1007/BF01084331.

[101] Maugard T, Enaud E, de la Sayette A, Choisy P, Legoy MD. β-Glucosidase-Catalyzed Hydrolysis of Indican from Leaves of *Polygonum tinctorium*. Biotechnol Prog 2002;18:5. https://doi.org/10.1021/bp025540.

[102] Kokubun T, Edmonds J, John P. Indoxyl Derivatives In Woad In Relation To Medieval Indigo Production. Phytochemistry 1998;49:79–87. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01069-8.

[103] Oberthür C, Hamburger M. Tryptanthrin content in *Isatis tinctoria* leaves-a comparative study of selected strains and post-harvest treatments. Planta Med 2004;70:642–5. https://doi.org/10.1055/s-2004-827188.

[104] Angelini LG, Tozzi S, Nassi o Di Nasso N. Differences in leaf yield and indigo precursors production in woad (*Isatis tinctoria* L.) and Chinese woad (*Isatis indigotica* Fort.) genotypes. Field Crops Res 2007;101:285–95. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2006.12.004.

[105] Yang L, Wen K-S, Ruan X, Zhao Y-X, Wei F, Wang Q. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. Molecules 2018;23:762. https://doi.org/10.3390/molecules23040762.

[106] Sales E, Kanhonou R, Baixauli C, Giner A, Cooke D, Gilbert K, et al. Sowing date, transplanting, plant density and nitrogen fertilization affect indigo production from *Isatis* species in a Mediterranean region of Spain. Ind Crops Prod 2006;23:29–39. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2005.03.002.

[107] Orsini R, Aquilanti L, Osimani A, Serrani L, Baldini G, Seddaiu G, et al. *Isatis tinctoria* L.: biomass production and indigo dye yield as influenced by mineral or organic nitrogen fertilization. Agrochimica 2012;56:292–308.

[108] Stoker KG, Cooke DT, Hill DJ. Influence of light on natural indigo production from woad (*Isatis tinctoria*). Plant Growth Regul 1998;25:181–5. https://doi.org/10.1023/A:1006042331385.

[109] Cardon D. Le Monde des teintures naturelles. Belin; 2014.

[110] Buhler A. Indigo dyeing among primitive races. Ciba Rev 1951:3088–91.

[111] de Lasteyrie C-P. Du pastel, de l'indigotier et des autres végétaux dont on peut extraire une couleur bleue. Deterville; 1811.

[112] Chaptal J-A. Chimie appliquée à l'agriculture. vol. 2. Madame Huzard; 1823.

[113] Ewerdwalbesloh I, Meyer O. Bacteriology and enzymology of the woad fermentation. 2ème Congrès Int. "Pastel Indigo Autres Teint. Nat. Passé Présent Futur. Int. Symp. "Woad Indigo Nat. Dyes Past Present Futur. Vol, vol. 7, 1998, p. 84–6.

[114] de Marcas Puymaurin JPC. Mémoires Sur Différens Sujets Relatifs Aux Sciences Et Aux Arts. HACHETTE LIVRE; 2021.

[115] Yvon T. La production d'indigo en Guadeloupe et Martinique (XVIIe-XIXesiècles), Histoire et archéologie. Éditions Karthala; 2015.

[116] Plowright CB. On woad as a prehistoric pigment. vol. 26. 1901.

[117] Goodwin J. Dyer's manual 1982.

[118] Hill D. Preparation of indigo from woad. Beitrage Zur Waıdtagung 1992;4:14. https://doi.org/10.1006/jaer.1998.0329.

[119] Recio M-C, Cerdá-Nicolás M, Potterat O, Hamburger M, Ríos J-L. Anti-inflammatory and antiallergic activity in vivo of lipophilic *Isatis tinctoria* extracts and tryptanthrin. Planta Med 2006;72:539–46. https://doi.org/10.1055/s-2006-931562.

[120] Danz H, Baumann D, Hamburger M. Quantitative Determination of the Dual COX-2/5-LOX Inhibitor Tryptanthrin in *Isatis tinctoria* by ESI-LC-MS. Planta Med 2002;68:152–7. https://doi.org/10.1055/s-2002-20252.

[121] Baas J, Bieringer S, Frias C, Frias J, Soehnchen C, Urmann C, et al. Dihydroxyquingdainone Induces Apoptosis in Leukaemia and Lymphoma Cells via the Mitochondrial Pathway in a Bcl-2- and Caspase-3-Dependent Manner and Overcomes Resistance to Cytostatic Drugs In Vitro. Molecules 2022;27. https://doi.org/10.3390/molecules27155038.

[122] Ahmad A, Wei Y, Syed F, Khan S, Khan GM, Tahir K, et al. *Isatis tinctoria* mediated synthesis of amphotericin B-bound silver nanoparticles with enhanced photoinduced antileishmanial activity: a novel green approach. J Photochem Photobiol B 2016;161:17–24. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.05.003.

[123] Miceli N, Filocamo A, Ragusa S, Cacciola F, Dugo P, Mondello L, et al. Chemical characterization and biological activities of phenolic-rich fraction from cauline leaves of Isatis tinctoria L.(Brassicaceae) growing in Sicily, Italy. Chem Biodivers 2017;14:e1700073. https://doi.org/10.1002/cbdv.201700073.

[124] Mohn T, Plitzko I, Hamburger M. A comprehensive metabolite profiling of *Isatis tinctoria* leaf extracts. Phytochemistry 2009;70:924–34. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.04.019.

[125] Mohn T, Potterat O, Hamburger M. Quantification of active principles and pigments in leaf extracts of *Isatis tinctoria* by HPLC/UV/MS. Planta Med 2007;73:151–6. https://doi.org/10.1055/s-2007-967105.

[126] Xu J, Lan Z, Wang S, Guo Y, Ning J, Song Y, et al. The pharmaceutical applications of total flavonoids extract from *Isatis tinctoria* L. leaves. Pharmacol Res-Mod Chin Med 2022:100122.

[127] Hamburger M, Rüster G-U, Melzig MF. HPLC based activity profiling for inhibitors of human neutrophil elastase in *Isatis tinctoria* leaf extracts. Nat Prod Commun 2006;1:1934578X0600101207. https://doi.org/10.1177/1934578X0600101207.

[128] Nguyen T-K-O, Marcelo P, Gontier E, Dauwe R. Metabolic markers for the yield of lipophilic indole alkaloids in dried woad leaves (*Isatis tinctoria* L.). Phytochemistry 2019;163:89–98. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.04.006.

[129] Shirakawa M, Tanida M, Ito T. The cell differentiation of idioblast myrosin cells: Similarities with vascular and guard cells. Front Plant Sci 2022;12:3287. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.829541.

[130] Hubert J, Nuzillard J-M, Renault J-H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? Phytochem Rev 2017;16:55–95. https://doi.org/10.1007/s11101-015-9448-7.

[131] Hannedouche S, Jacquemond-Collet I, Fabre N, Stanislas E, Moulis C. Iridoid keto-glycosides from Caryopteris$\times$ Clandonensis. Phytochemistry 1999;51:767–9. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00086-2.

[132] Nguyen, Jamali A, Grand E, Morreel K, Marcelo P, Gontier E, et al. Phenylpropanoid profiling reveals a class of hydroxycinnamoyl glucaric acid conjugates in *Isatis tinctoria* leaves. Phytochemistry 2017;144:127–40. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.09.007.

[133] Guldbrandsen N, Kostidis S, Schäfer H, De Mieri M, Spraul M, Skaltsounis A-L, et al. NMR-Based Metabolomic Study on *Isatis tinctoria* : Comparison of Different Accessions, Harvesting Dates, and the Effect of Repeated Harvesting. J Nat Prod 2015;78:977–86. https://doi.org/10.1021/np5008763.

[134] Taviano M, Filocamo A, Ragusa S, Cacciola F, Dugo P, Mondello L, et al. Phenolic profile, antioxidant and cytotoxic properties of polar extracts from leaves and flowers of *Isatis tinctoria* L.(Brassicaceae) growing in Sicily. Plant Biosyst- Int J Deal Asp Plant Biol 2018;152:795–803. https://doi.org/10.1080/11263504.2017.1338629.

[135] Schmatz R, Schütze K, Ormerod C, Biertümpfel A. Versuche mit Herbiziden in Waid *Isatis tinctoria* L. in Thüringen. Gesunde Pflanz 2008;60:55–62. https://doi.org/DOI:10.1007/s10343-008-0181-7.

[136] Gershenzon J, Ullah C. Plants protect themselves from herbivores by optimizing the distribution of chemical defenses. Proc Natl Acad Sci 2022;119:e2120277119. https://doi.org/10.1073/pnas.2120277119.

[137] Hunziker P, Lambertz SK, Weber K, Crocoll C, Halkier BA, Schulz A. Herbivore feeding preference corroborates optimal defense theory for specialized metabolites within plants. Proc Natl Acad Sci 2021;118:e2111977118. https://doi.org/10.1073/pnas.2111977118.

[138] Piasecka A, Jedrzejczak-Rey N, Bednarek P. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. New Phytol 2015;206:948–64. https://doi.org/10.1111/nph.13325.

[139] Blažević I, Montaut S, Burčul F, Olsen CE, Burow M, Rollin P, et al. Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. Phytochemistry 2020;169:112100. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112100.

[140] Perkin AG. The natural organic colouring matters. Longmans, Green and Company; 1918.

[141] Blackburn RS, Bechtold T, John P. The development of indigo reduction methods and pre-reduced indigo products. Color Technol 2009;125:193–207. https://doi.org/10.1111/j.1478-4408.2009.00197.x.

[142] Cotson S, Holt S. IV. Kinetics of aerial oxidation of indoxyl and some of its halogen derivatives. Proc R Soc Lond Ser B-Biol Sci 1958;148:506–19. https://doi.org/10.1098/rspb.1958.0042.

[143] Durante M, Manzo M, Bernardi R, Cecconi F, Salvini M, Angelini LG. Studies of genes involved in the metabolic steps of indigo production in Isatis tinctoria. XLVII Ital. Soc. Agric. Genet.-SIGA Annu. Congr., 2003, p. Abstract-3.

[144] John P, Seymour K, Macias PG. Production of natural indigo with a high purity. Final Rep SPINDIGO Proj 2005.

[145] Sorng S, Balayssac S, Danoun S, Assemat G, Mirre A, Cristofoli V, et al. Quality assessment of Curcuma dietary supplements: Complementary data from LC-MS and 1H NMR. J Pharm Biomed Anal 2022;212:114631. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114631.

[146] Otte DA, Borchmann DE, Lin C, Weck M, Woerpel K. 13C NMR spectroscopy for the quantitative determination of compound ratios and polymer end groups. Org Lett 2014;16:1566–9. https://doi.org/10.1021/ol403776k.

[147] Alkorta I, Elguero J, Dardonville C, Reviriego F, Santa María D, Claramunt RM, et al. A theoretical and spectroscopic (NMR and IR) study of indirubin in solution and in the solid state. J Phys Org Chem 2020;33:e4043. https://doi.org/10.1002/poc.4043.

[148] Sun Q, Leng J, Tang L, Wang L, Fu C. A comprehensive review of the chemistry, pharmacokinetics, pharmacology, clinical applications, adverse events, and quality control of Indigo Naturalis. Front Pharmacol 2021;12:664022. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.664022.

[149] Otzen D. Protein–surfactant interactions: a tale of many states. Biochim Biophys Acta BBA-Proteins Proteomics 2011;1814:562–91. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.03.003.

[150] Wenner N. The Production of Indigo Dye from Plants 2017.

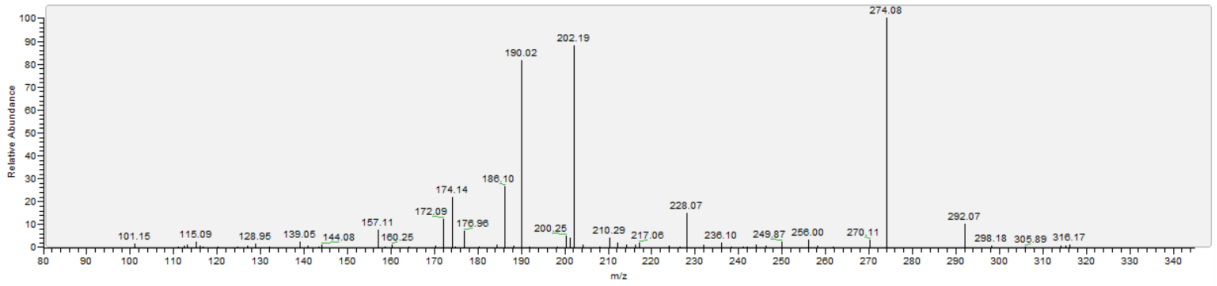
[151] Sadh PK, Duhan S, Duhan JS. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. Bioresour Bioprocess 2018;5:1–15. https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z.

[152] Mapari SA, Meyer AS, Thrane U. Colorimetric characterization for comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants. J Agric Food Chem 2006;54:7027–35. https://doi.org/10.1021/jf062094n.

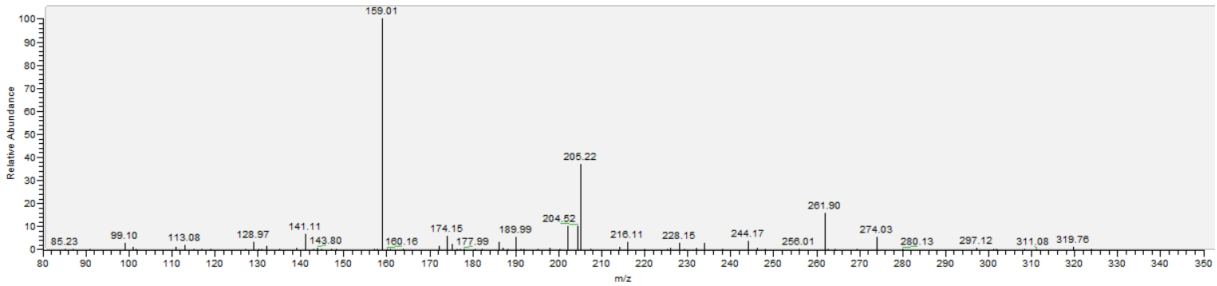
[153] Rashmi M, Kushveer J, Sarma V, others. A worldwide list of endophytic fungi with notes on ecology and diversity. Mycosphere 2019;10:798–1079. https://doi.org/10.5943/mycosphere/10/1/19.

[154] Bode HB, Bethe B, Höfs R, Zeeck A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. ChemBioChem 2002;3:619–27. https://doi.org/ttps://doi.org/10.1002/1439-7633(20020703)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9.

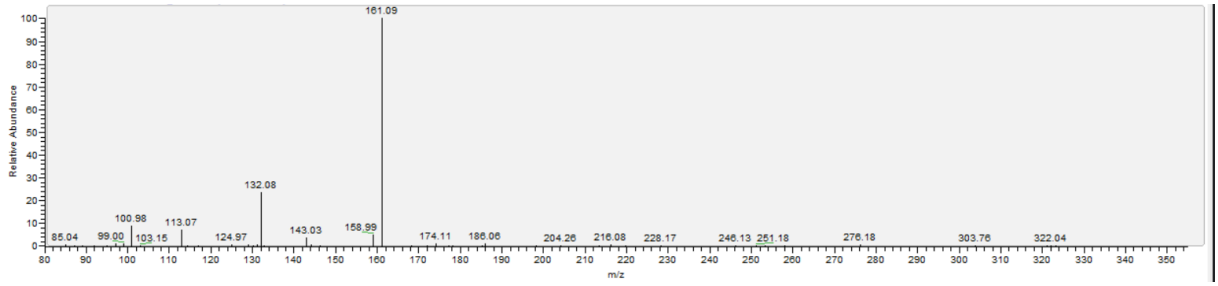
Annexes



Annexe 1 - Spectre MS/MS de l'ion décarboxylé [M-CO2-H]- de l'isatan A (*m/z* = 334,09) en UHPLC-ESI(-)-HRMS à tR = 4,68 min



Annexe 2 - Spectre MS/MS de l'adduit acide formique [M+FA-H]- de l'isatan B (*m/z* = 338,09) en UHPLC-ESI(-)-HRMS à tR = 4,12 min



Annexe 3 - Spectre MS/MS de l'adduit acide formique [M+FA-H]- de l'indican (*m/z* = 340,10) en UHPLC-ESI(-)-HRMS à tR = 3,64 min

Annotations	Type d'adduit	Temps de rétention (min)	*m/z* (ESI -)	Fragmentation MS/MS (abondance relative)	Référence
Sulfoglucobrassicine	[M-H]-	1,68	527,0096	447 (97), 320 (1)	Finnegan et al., 2016
4-OH-glucobrassicine	$[M-H]^-$	1,83	463,0478	285 (38), 267 (28), 240 (5), 160 (5), 259 (4)	Fabre et al., 2007

Annotations	Type d'adduit	Temps de rétention (min)	*m/z* (ESI -)	Fragmentation MS/MS (abondance relative)	Référence
Protocatechoyl glucose	$[M-H]^-$	2,11	315,0717	153 (85), 109 (7), 108 (1), 246 (1), 154 (1)	Moreel et al., 2014
Protocatechuic acid hexoside	$[M-H]^-$	2,72	315,0716	153 (89), 109(7), 108 (1), 151 (1), 195 (1)	Nguyen et al., 2017
Feruloyl dihexose	$[M+HCOOH-H]^-$	2,77	563,1602	355 (63), 193 (11), 295 (5), 456 (3), 265 (3)	Nguyen et al., 2017
p-coumaroyl dihexose	$[M+HCOOH-H]^-$	2,93	533,1502	325 (87), 371 (4), 163 (2), 415 (1), 411 (1)	Nguyen et al., 2017
Gluconapoleiferine	$[M-H]^-$	2,96	402,0493	322 (50), 196 (24), 340 (12), 268 (5), 194 (2)	Nguyen et al., 2017
Glucobrassicine	$[M]^-$	3,19	447,0529	259 (33), 275 (16), 291 (10), 367 (7), 205 (7)	Nguyen et al., 2017
Coniferine	$[M+HCOOH-H]^-$	3,30	387,1289	179 (81), 207 (4), 161 (3), 193 (2), 191 (2)	Nguyen et al., 2017
Sinapoyl gentiobiose	$[M-H]^-$	3,44	547,1654	223 (60), 247 (6), 208 (6), 323 (4), 487 (2)	Nguyen et al., 2017
Vicenin-2	$[M-H]^-$	3,46	593,1482	473 (66), 503 (16), 311 (5), 575 (3), 474 (2)	Nguyen et al., 2017
Isovitexin-3''-*O*-glucoside-7-*O*-glucoside	$[M-H]^-$	3,50	755,2031	665 (35), 503 (13), 485 (9), 737 (7), 575 (6)	Mohn et al., 2009
Isoscoparin-3''-*O*-glucoside-7-*O*-glucoside	$[M-H]^-$	3,58	785,2138	695 (37), 533 (13), 515 (9), 767 (6), 605 (5)	Mohn et al., 2009
p-coumaroyl glucaric acid	$[M-H]^-$	3,62	355,0665	191 (58), 209 (31), 337 (5), 147 (2), 173 (1)	Nguyen et al., 2017
Indican	$[M-H]^-$	3,64	294,0975	161 (69), 132 (12), 101 (5), 115 (3), 159 (2)	Nguyen et al., 2017
Indican	$[M+FA-H]^-$	3,64	340,1034	161 (69), 132 (12), 101 (5), 115 (3), 159 (2)	Nguyen et al., 2017
p-coumaric acid hex (FA)	$[M+HCOOH-H]^-$	3,65	371,0977	163 (23), 145 (21), 209 (17), 187 (11), 191 (6)	Nguyen et al., 2017
Feruloyl glucaric acid	$[M-H]^-$	3,67	385,0770	191 (69), 247 (9), 367 (6), 209 (5), 223 (3)	Nguyen et al., 2017
p-coumaroyl hexose	$[M-H]^-$	3,68	325,0922	145 (33), 163 (31), 187 (16), 265 (6), 119 (3)	Nguyen et al., 2017

Annotations	Type d'adduit	Temps de rétention (min)	*m/z* (ESI -)	Fragmentation MS/MS (abondance relative)	Référence
Sinapoyl glucaric acid	$[M-H]^-$	3,71	415,0873	191 (78), 209 (10), 397 (6), 147 (2), 173(1)	Nguyen et al., 2017
Apocarotenoid	$[M+HCOOH-H]^-$	3,94	433,2071	161 (32), 179 (7), 374 (6), 225 (5), 143 (5)	Nguyen et al., 2017
Isoorientin-3''-*O*-glucoside / luteolin-6-*C*-glucoside-7-*O*-glucoside	$[M-H]^-$	3,98	609,1448	519 (66), 591 (11), 339 (8), 429 (6), 520 (1)	Mohn et al., 2009
Isatan B	$[M+FA-H]^-$	4,15	338,0875	159 (39), 205 (23), 262 (5), 202 (4), 140 (4)	Oberthur et al., 2004
Feruloyl *p*-coumaroyl glucaric acid (FA)	$[M+HCOOH-H]^-$	4,27	577,1183	415 (57), 191 (11), 397 (6), 353 (5), 371 (4)	Nguyen et al., 2017
Malonylindican	$[2M+H_2O-H]^-$	4,33	777,1980	759 (57), 758 (10), 336 (9), 334 (6), 377 (5)	Nguyen et al., 2017
Isoscoparin-3''-*O*-glucoside	$[M-H]^-$	4,36	623,1573	533 (44), 353 (20), 443 (12), 605 (6), 395 (2)	Mohn et al., 2009
Malonylindican	$[M-CO_2-H]^-$	4,36	336,1085	13 (50), 202 (12), 161 (12), 174 (8), 276 (5)	Nguyen et al., 2019
Malonylindican	$[M-H]^-$	4,39	380,0985	132 (23), 294 (9), 224 (8), 318 (8), 223 (6)	Nguyen et al., 2019
Isoscoparin-3''-*O*-glucoside	$[2M-H]^-$	4,40	1247,3280	623 (88), 533 (5), 425 (2), 443 (1), 722 (1)	Mohn et al., 2009
Isoscoparine	$[M-H]^-$	4,44	461,1080	341 (76), 371 (15), 443 (2), 383 (1), 353 (1)	Mohn et al., 2009
Di-*p*-coumaroyl glucaric acid	$[M-H]^-$	4,53	501,1029	337 (48), 355 (23), 191 (7), 293 (5), 163 (3)	Nguyen et al., 2017
Disinapoyl glucaric acid	$[M-H]^-$	4,55	621,1448	397 (70), 223 (8), 353 (6), 415 (5), 291 (3)	Nguyen et al., 2017
Isatan A	$[M+H_2O-H]^-$	4,67	396,0925	334 (37), 378 (10), 202 (10), 369 (6), 218 (6)	Oberthur et al., 2004
Isatan A	$[M-H]^-$	4,69	378,0825	274 (19), 190 (17), 174 (13), 186 (9)	Oberthur et al., 2004
Isatan A	$[M-CO_2-H]^-$	4,69	334,0926	274 (24), 190 (21), 202 (19), 174 (5), 186 (5)	Oberthur et al., 2004
Isatan A	$[2M-H]^-$	4,70	757,1723	334 (44), 378 (17), 274 (10), 377 (6), 228 (4)	Oberthur et al., 2004

Annotations	Type d'adduit	Temps de rétention (min)	*m/z* (ESI -)	Fragmentation MS/MS (abondance relative)	Référence
Feruloyl sinapoyl glucaric acid	$[M-H]^-$	4,80	591,1344	367 (41), 397 (32), 223 (3), 385 (3), 193 (3)	Nguyen et al., 2017
Disinapoyl gentiobiose	$[M-H]^-$	4,85	753,2236	529 (75), 427 (4), 289 (3), 385 (2), 265 (2)	Nguyen et al., 2017
p-coumaroyl sinapoyl glucaric acid	$[M-H]^-$	4,87	561,1236	397 (39), 337 (24), 415 (8), 191 (8), 355 (4)	Nguyen et al., 2017
Feruloyl p-coumaroyl glucaric acid	$[M-H]^-$	4,94	531,1119	367 (34), 337 (19), 385 (14), 191 (5), 355 (4)	Nguyen et al., 2017
Isoscoparin-3''-*O*-p-coumaroylglucoside	$[M-H]^-$	5,33	769,1958	679 (28), 533 (20), 623 (10), 443 (7), 353 (6)	Mohn et al., 2009
Isoscoparin-3''-*O*-feruloylglucoside	$[M-H]^-$	5,71	799,2078	533 (28), 623 (14), 353 (13), 605 (9), 619 (8)	Mohn et al., 2009
Isoscoparin-3''-*O*-sinapoylglucoside	$[M-H]^-$	5,71	829,2183	533 (29), 623 (18), 353 (14), 605 (10), 649 (8)	Mohn et al., 2009

Annexe 4 - Tableau déréplicatif des composés analysés en UHPLC-HRMS dans un extrait MeOH de feuilles fraiches de Pastel

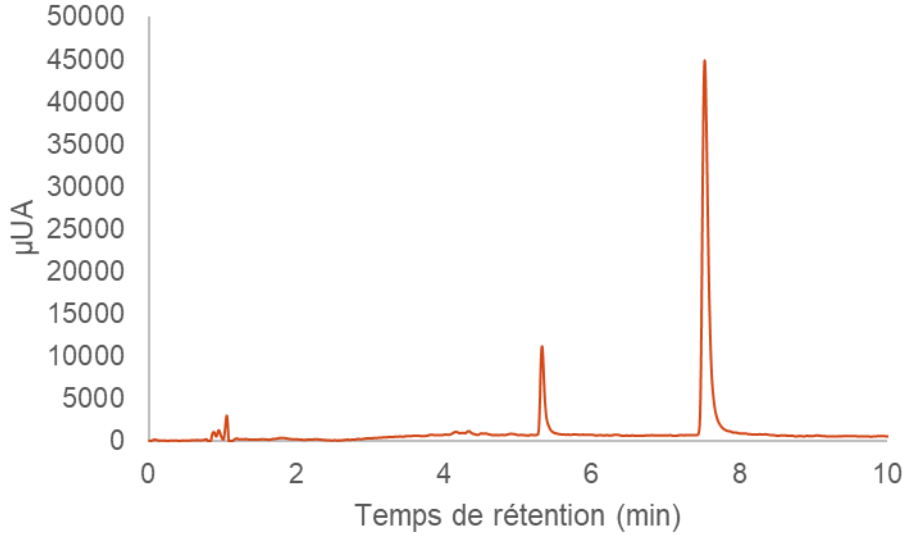
DATE RECOLTE	EXTRAIT	ASC PRECURSEURS			
	Masse d'extrait (g)	Isatan A	Isatan B	Indican	Malonylindican
25/02/2020	3,89	4,71E+07	2,03E+07	1,57E+06	4,71E+06
29/06/2020	0,70	2,80E+07	1,75E+07	3,10E+06	2,75E+07
08/07/2020	0,91	3,87E+08	2,66E+08	3,48E+07	2,29E+08
16/07/2020	0,96	1,50E+09	6,73E+07	4,66E+07	1,52E+09
02/09/2020	1,37	3,10E+08	2,72E+07	9,52E+07	2,20E+09
02/10/2020	0,85	4,08E+07	1,15E+07	5,14E+06	1,54E+08
02/12/2020	1,00	1,55E+09	4,66E+07	1,86E+07	1,69E+08
04/12/2020	0,97	2,51E+09	5,34E+07	2,19E+07	5,85E+08
11/12/2020	2,03	1,92E+09	2,41E+07	7,22E+06	2,93E+08
06/05/2021	1,47	1,25E+09	1,58E+08	8,30E+07	5,68E+06
01/06/2021	0,465	4,75E+08	2,43E+07	2,39E+06	6,56E+07

16/06/2021	1,84	2,17E+09	2,86E+07	1,08E+07	7,60E+08
	0,90	1,62E+09	1,94E+08	1,57E+07	5,56E+08
31/08/2021	0,806	1,71E+09	2,43E+08	1,61E+07	4,93E+08
	0,876	1,70E+09	2,27E+08	1,36E+07	5,05E+08
28/09/2021	0,685	2,28E+09	2,08E+08	1,13E+07	2,11E+08
	0,684	1,99E+09	2,32E+08	1,23E+07	1,71E+08
	0,788	1,00E+09	1,87E+08	9,39E+06	2,38E+08
	0,765	1,22E+09	1,38E+08	1,46E+07	2,95E+08
04/10/2021	0,828	1,30E+09	2,16E+08	1,73E+07	3,39E+08
	0,788	9,71E+08	2,79E+08	1,80E+07	2,16E+08
	0,765	1,17E+09	1,67E+08	1,80E+07	2,85E+08
	0,828	1,44E+09	3,22E+08	1,99E+07	3,41E+08
	0,735	1,79E+09	1,75E+08	6,89E+06	2,93E+08
11/10/2021	0,792	1,96E+09	1,92E+08	6,29E+06	4,25E+08
	0,764	4,02E+09	4,95E+07	9,36E+06	5,92E+08
18/10/2021	0,825	1,00E+09	1,13E+08	1,48E+07	1,58E+08
	0,858	7,32E+08	9,52E+07	1,31E+07	1,30E+08
02/11/2021	1,344	9,98E+08	1,53E+08	0,00E+00	1,82E+08
	1,269	6,76E+08	3,47E+08	1,87E+06	1,06E+08
08/11/2021	0,655	1,31E+09	8,10E+07	4,06E+06	1,88E+08
16/11/2021	1,311	1,21E+09	2,13E+08	9,94E+06	1,64E+08
	1,256	8,32E+08	8,69E+07	2,86E+06	4,80E+07
10/01/2022	1,408	9,01E+08	1,47E+08	3,96E+06	6,94E+07
	1,379	6,93E+08	1,07E+08	6,14E+06	1,08E+08
	1,232	1,30E+09	1,14E+08	5,99E+06	1,03E+08
25/01/2022	1,123	1,48E+09	1,31E+08	9,13E+06	1,36E+08
	1,195	1,37E+09	1,20E+08	6,76E+06	1,10E+08
	1,676	9,57E+08	1,22E+08	5,54E+06	8,48E+07
02/03/2022	1,651	1,61E+09	1,64E+08	9,40E+06	1,40E+08
	1,741	1,36E+09	1,22E+08	6,54E+06	1,22E+08

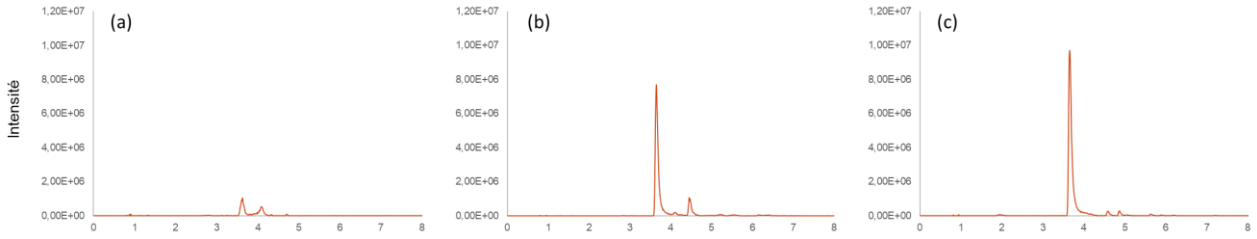
Annexe 5 - Tableau récapitulatif des récoltes de feuilles de feuilles de Pastel, avec le rendement et les analyses UHPLC-ESI-HRMS des extraits MeOH



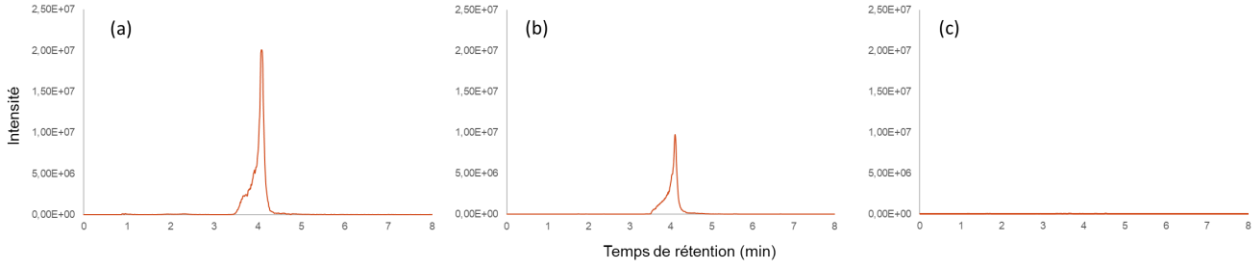
Annexe 6 - Chromatogramme à λ = 600 nm de l'indigo (tR = 7,8 min) dans un extrait aqueux acide de feuilles de Pastel



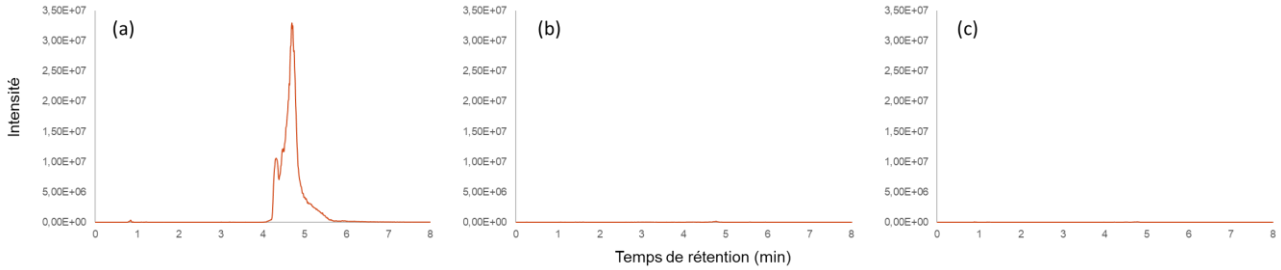
Annexe 7 – Chromatogramme à λ = 600 nm de l'indigo (tR = 7,8 min) dans un extrait aqueux acide de feuilles de Pastel



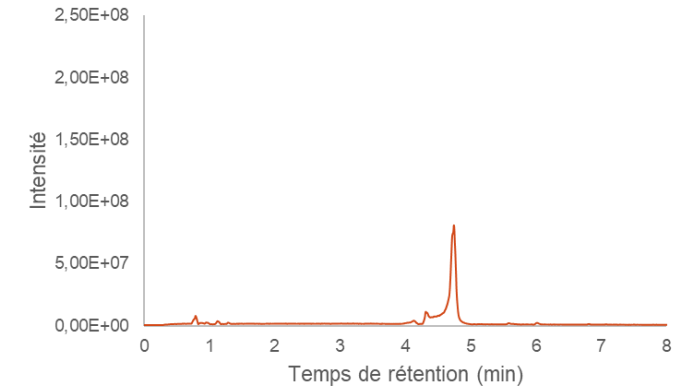
Annexe 8 - Chromatogrammes XIC de l'indican (*m/z* = 340,10) dans un extrait MeOH (a), dans un extrait aqueux acide (b) et dans un extrait aqueux basique (c) de feuilles fraiches intactes



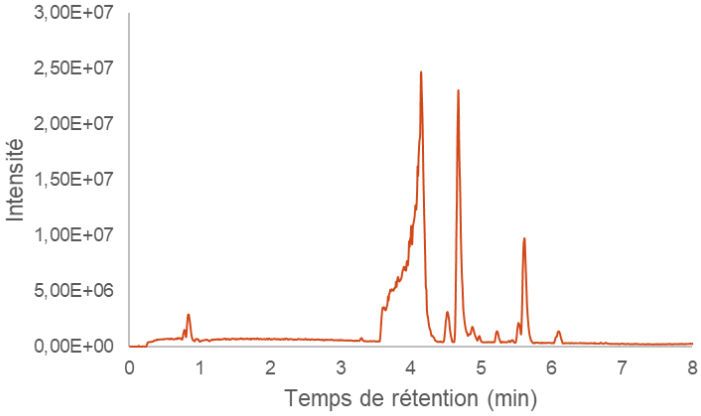
Annexe 9 - Chromatogrammes XIC de l'isatan B (*m/z* = 338,08) dans un extrait MeOH (a), dans un extrait aqueux acide (b) et dans un extrait aqueux basique (c) de feuilles fraiches intactes



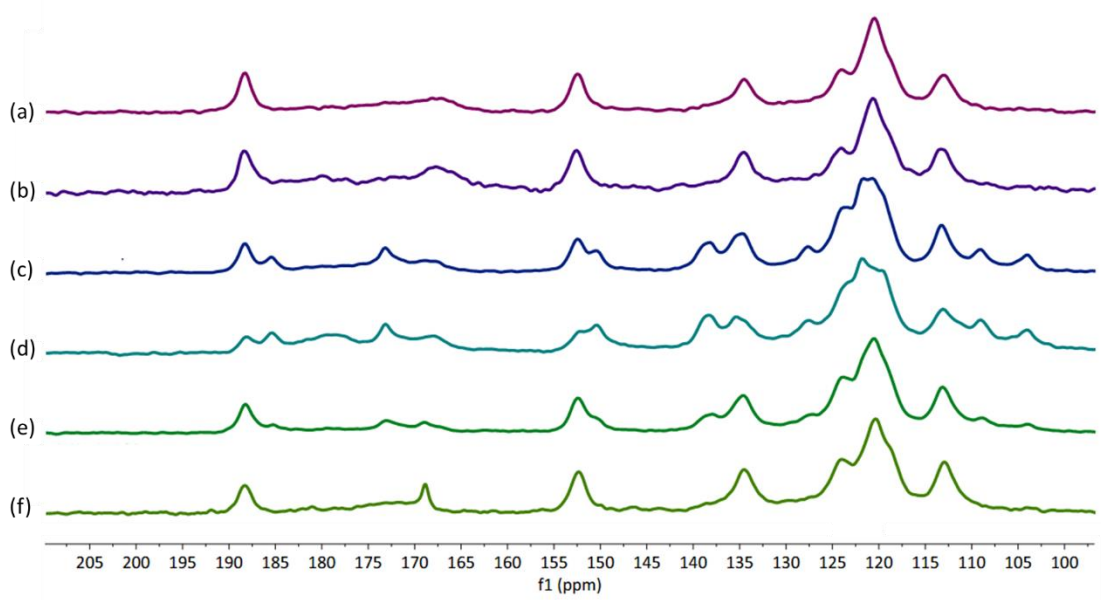
Annexe 10 - Chromatogrammes XIC de l'isatan A (*m/z* = 757,17) dans un extrait MeOH (a), dans un extrait aqueux acide (b) et dans un extrait aqueux basique (c) de feuilles fraiches intactes



Annexe 11 - Chromatogramme UHPLC-ESI-HRMS d'une solution aqueuse d'isatan A à pH 2, chauffée à 50° pendant deux heures



Annexe 12 - Chromatogramme UHPLC-ESI-HRMS d'une solution aqueuse d'isatan B avec une β-glucosidase à pH neutre, chauffée à 60° pendant une heure



Annexe 13 - Spectre de RMN ^{13}C solide de pigment de janvier 2021 (a), de novembre 2022 (b), de septembre 2021 à 0,8 $g_{indigo}/kg_{feuilles\ sèches}$ (c), de septembre 2021 à 0,7 $g_{indigo}/kg_{feuilles\ sèches}$ (d), de septembre 2021 à 1,9 $g_{indigo}/kg_{feuilles\ sèches}$ (e) et de la production à échelle pilote de novembre 2021 (f).

Biotransformation :

L'objectif était d'étudier leur éventuelle implication à la fois dans l'hydrolyse des précurseurs, mais également dans la biogenèse des isatans, via l'oxydation du C-3' du glucose de l'indican. Des travaux d'isolement et de culture de champignons endophytes ont donc été entrepris de mai 2019 à juin 2022 sous la supervision de Marieke Vansteelandt, avec la participation de plusieurs étudiants et ingénieurs et en collaboration avec Patricia Jargeat (MCU, Université Paul Sabatier, Toulouse 3) pour l'identification des souches. Au total, 114 souches, appartenant essentiellement aux Ascomycota, ont été isolées et identifiées à partir de 12 campagnes d'isolement. 23 genres ont été identifiés avec près de la moitié des souches isolées appartenant au genre Alternaria. Les autres genres les plus souvent identifiés (*Septoria*, *Cladosporium*, et *Stemphylium*) correspondent également à des genres fréquemment rencontrés parmi les champignons endophytes [153]. Seule une vingtaine d'espèces a pu être identifiée, et toutes sont décrites pour la première fois chez *Isatis tinctoria*. Quatre espèces appartenant aux quatre genres d'endophytes fongiques les plus souvent isolés des feuilles de Pastel ont été sélectionnées pour réaliser des essais de biotransformation. L'objectif était de mettre en culture ces endophytes dans un milieu nutritif en présence d'indican. Après une semaine de culture, l'indican a été converti en gluco-indican par les quatre souches, probablement via une glucosyltransférase. Seule une souche a conduit à la formation

d’indigo, suggérant donc une activité de type β-glucosidase. Il sera intéressant de poursuivre cette étude, en cultivant d’autres espères d’endophytes, ou en modifiant le milieu culture [154]. Enfin, afin de déterminer si des souches peuvent métaboliser l’isatan A et l’isatan B, des essais de biotransformation en présence de ces précurseurs et en adaptant le milieu de culture afin de limiter leur dégradation s’imposeront.

Annexe 14 – Essais de biotransformation sur les endophytes fongiques des feuilles de Pastel