

THÉORIE DE L'HYDROLYSE OXYDATYVE DE L'EVOLUTION DE L'INDICAN EN INDIGO DANS TOUTES LES PLANTES INDIGOTIQUES

¹ELÍAS-JAIME MATADAMAS-ORTIZ

¹ Laboratoire des Agroressources et Metabolites Secondaires: Université Autonome de Chapingo. Chapingo, Texcoco. MEXIQUE. emata993@hotmail.com.

Résumé

Les précurseurs de l'indigo dans les végétaux sont des hétérosides incolores que par hydrolyse libèrent de l'indoxyle. Deux molécules d'indoxyle peuvent se condenser pour produire de l'indigo. L'oxydation d'indoxyl conduit à la production de l'isatine, et cette dernière après s'être associée avec une molécule d'indoxyle forme de l'indirubine. L'indigo (bleu) et l'indirubine (rouge) sont des isomères structuraux. Beijerinck (1900) établit que le précurseur du pastel est chimiquement différent de l'indican, précurseur des plantes du genre *Indigofera*. Epstein *et coll.*, (1967) identifie le précurseur du pastel comme isatan B. Études ultérieures établissent que l'hydrolyse de l'indican c'est enzymatique, tandis que celle de l'isatan B se fait par des moyens chimiques et donc les méthodes d'extraction sont différentes. Nos observations sur l'extraction de l'indigo du pastel et ainsi que de l'añil (*Indigofera suffruticosa* Mill.), suggèrent que les deux espèces ont un même précurseur, et que son hydrolyse est distincte de la voie enzymatique ou chimique. Nous proposons une théorie qui explique la réactivité différente du précurseur du pastel par rapport à l'indican, qui a été observée par Beijerinck, il fait plus d'un siècle. Celle-ci aussi explique les défis pour extraire et caractériser les différents précurseurs du pastel qui, jusqu'à aujourd'hui, ont été rapportés dans la littérature (isatan A, isatan B, isatan C). Cette théorie établit que le précurseur de l'indigo il se fait attaquer par des espèces réactives de l'oxygène qui c'est sont le résultat d'un processus de stress qui est provoqué en immergeant les feuilles (ou autres organes de la plante) dans un milieu aqueux différent de l'atmosphère. L'indoxyle après la dite hydrolyse est attrapé par des protéines globulaires solubles dans l'eau avant de sortir des feuilles et en formant un complexe indoxilprotéinique. L'indoxyle reste fixé à une matrice qui l'immobilise. Un niveau de dénaturation de ces protéines permet la libération de l'indoxyle et son évolution en indigo. Cette dénaturation peut être atteinte par divers moyens : agitation mécanique, ajout de bases, des températures élevées ou l'ultrason.

Mots-clés: pastel, añil, *Indigofera suffruticosa*, indigo, indirubine, hydrolyse oxydative, indican, isatan B, complexe indoxilprotéinique.

Introduction

Après la littérature, les plantes qui produisent du pigment bleu appelé indigo ont, principalement dans ses feuilles, des précurseurs incolores caractérisés chimiquement comme glycosides hétérosides dont la structure se compose d'une

partie aglycone ou genine de nature indolique liée à une molécule de glucose. Ces précurseurs pouvant subir une hydrolyse lors de l'extraction, ils libèrent de l'indoxyle, qui réagit, à son tour, avec le milieu pour former deux matières colorantes importantes, à savoir, de l'indigotine ou de l'indigo (bleu) et de l'indirubine (rouge). Études publiées jusqu'à présent rapportent une quantité importante d'espèces végétales qui produisent de l'indigo, communément appelées plantes indigotiques. Cependant, les espèces les plus couramment utilisées au fil du temps ont été: *Isatis tinctoria* (Pastel ou Woad) en Europe; *Polygonum tinctorium* (Plante à indigo japonais); *Indigofera tinctoria* (Véritable indigotier) dans l'Inde et *Indigofera suffruticosa* (Añil) au Mexique et en Amérique centrale. Les méthodes traditionnelles d'extraction de l'indigo de ces plantes produisent des rendements variables, mais aussi un colorant de faible pureté et qualité, donc l'optimisation industrielle des procédés d'extraction est nécessaire. Cette optimisation peut être faite avec des connaissances de base des aspects chimiques et biochimiques tels que: la nature, la structure et de l'hydrolyse des précurseurs, l'évolution de ces précurseurs pour former les molécules colorantes et les conditions optimales d'extraction (température, pH, solvant d'extraction, concentration d'oxygène, etc.). Dans ce travail, nous proposons une nouvelle théorie générale sur l'évolution des précurseurs à indigo, générée à partir des essais expérimentaux d'extraction avec des feuilles d'*Isatis tinctoria* et d'*Indigofera suffruticosa*, qui peut aider à clarifier des aspects encore peu clairs de l'extraction et qui peut favoriser l'optimisation industrielle afin d'obtenir un rendement maximal et une haute qualité de ce colorant.

État de l'art

Les précurseurs à indigo

Les précurseurs à indigo sont chimiquement de nature glycosidique dont la structure comporte un noyau d'indole attaché à une molécule de glucose. Ces composés sont présents dans au moins 200 espèces dans des différents genres de familles telles que, *Brassicaceae*, *Acanthaceae*, *Orchidaceae*, *Polygonaceae* et *Leguminosae*. Les espèces les plus utilisées pour l'extraction de l'indigo sont, *Isatis tinctoria*, *Polygonum tinctorium* et plusieurs espèces du genre *Indigofera*, étant les plus connus, *Indigofera tinctoria* (plante à indigo de l'Inde), *Indigofera arrecta* (plante à indigo d'Afrique) et *Indigofera suffruticosa* (añil) (Cannon, *et coll.*, 1994; Cardon, 2007).

Le précurseur indican (*indoxyle- β -D-glucoside*)

Jusqu'avant la moitié du XIX siècle, on a cru qu'il n'existait qu'un seul précurseur incolore présent dans toutes les plantes à indigo, qui évoluait à indigo après une hydrolyse et oxydation.

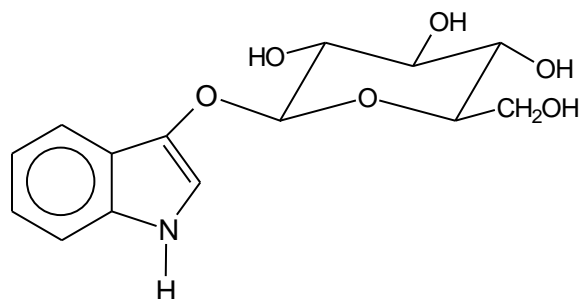


Figure 1. Indican ou indoxyle- β -D-glucoside

En 1855, Schunck a isolé et il a décrit un composé qui a été considéré comme le précurseur de l'indigo d'*Isatis tinctoria*, et il l'a nommé comme indican et il a proposé sa formule structurelle comme $C_{26} H_{31} N^{o}_{17}$ (Schunck, 1855; Hoogewerff et Meulen, 1900; Epstein, *et coll.*, 1967). Malgré ses efforts pour cultiver *Indigofera* en Angleterre, ses tentatives ont échoué, alors il n'a eu aucun point de comparaison de son précurseur vis-à-vis ces d'autres plantes (Farrar, 1977). Cependant, Schunck supposait que le précurseur qu'il avait isolé des feuilles du pastel il était différent des autres espèces du genre *Indigofera* et de *Polygonum tinctorium*, il a appuyé ses conclusions sur le fait que son précurseur était instable et facilement hydrolysable par des bases et des acides, tandis que l'indican était très stable en présence de bases les plus fortes (Schunck 1855; Perkin et Bloxan, 1907). De toute façon et malgré la différence en réactivité, les précurseurs dans différentes espèces ont reçu le nom d'indican.

Marchlewski, quant à lui, il a pris avec certaine réserve la formule proposée par Schunck, et en 1898, il a établi sa propre formule sur la base de l'hypothèse d'après laquelle il pourrait être de l'indoxyl-glycoside, avec une structure $C_{14} H_{17} NO_6$, en soulignant le lien entre l'indole et le glucose. Cependant, Marchlewski, apparemment, n'a eu aucun matériel végétatif disponible pour tester expérimentalement l'exactitude de sa formule hypothétique, même si par la suite on a prouvé qu'il avait eu raison (Hoogewerff et Meulen, 1900).

Hoogerwerff et Meulen (1900) ont travaillé avec feuilles de *Polygonum tinctorium* et d'*Indigofera leptostachya* et ils ont isolé un composé qu'ils ont identifié comme indoxyle- β -D-glucoside et ils lui ont conféré la formule empirique C₁₄ H₁₇ NO₆.

Ces auteurs ont également établi qu'ils n'ont observé aucune différence entre l'indican d'*Indigofera leptostachya* et de *Polygonum tinctorium*, et ils ont conclu qu'il s'agissait de la même molécule.

Plantes à indican et plantes à indoxyle

Beijerinck en 1900, a présenté les résultats de ses recherches concernant les précurseurs de l'indigo d'*Isatis tinctoria*, d'*Indigofera leptostachya* et de *Polygonum tinctorium* et il a essayé de démontrer pour la première fois la possibilité qu'il y aurait deux précurseurs différents. Pour cet auteur, *Indigofera leptostachya* et *Polygonum tinctorium* sont des plantes qui contiennent indican (indoxyle- β -D-glucoside), tandis qu'*Isatis tinctoria* est une « plante à indoxyle ». L'argument de Beijerinck était que les extraits d'*Isatis* ne produisent que d'indigo lorsqu'ils sont traités avec un alcali, tandis que l'indoxyle- β -D-glucoside est stable même en présence de bases fortes et il est hydrolysable par une enzyme glucosidase présente dans les feuilles de la plante. En revanche, en incubant un extrait brut de l'enzyme glucosidase qui a été prélevée de *Polygonum* ou d'*Indigofera* avec des extraits aqueux d'*Isatis* aucune substance colorante ne s'est produite. Finalement, l'auteur a conclu que l'indican n'est pas présent dans *Isatis tinctoria* et qu'il y avait une substance qui libère de l'indoxyle et il l'a donné le nom de « isatan ». La démonstration de Beijerinck a été tellement convaincante, que après la publication de ses résultats on a généralement accepté l'existence des deux précurseurs; l'indican pour *Indigofera* et pour *Polygonum tinctorium* et l'isatan pour *Isatis tinctoria*.

Le précurseur Isatán B.

Epstein *et coll.*, (1967), a publié avoir isolé le précurseur de l'indigo d'*Isatis tinctoria* que Beijerinck avait prédit et qu'il avait appelé isatan. Cette substance a été caractérisée comme indoxyle-5-cetogluconate et il lui a donné le nom d'isatan B. Ce que Beijerinck n'a pas pris en compte, c'est que le nom d'isatan était déjà attribué à une molécule isolée par Laurent en 1842, dont la structure a été proposée jusqu'à 1916 par Lefèvre et qu'elle a été synthétisée par Hansen huit ans plus tard comme 3-hydroxyle-3, 3'-bioxindol. C'est pourquoi l'équipe d'Epstein a décidé de nommer son précurseur comme isatan B, pour le différencier du composé d'Laurent.

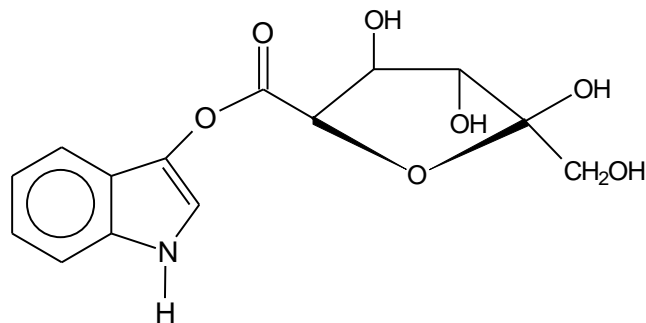


Figure 2. Isatan B ou indoxyle-5-cetogluconate

Dans le but de déterminer l'origine de l'isatan B, Schraudolf en 1968 a mis des jeunes plantes étiolées d'*Isatis tinctoria* dans un milieu riche en composés radioactifs de [2 -¹⁴C] indole et D, L-[2 -¹⁴C] - tryptophane et il a noté que l'isotope d'indole s'est joint à l'isatan B. Ce qu'il a conclu que l'indole donne lieu à l'isatan B. Ans plus tard, Zhi-Qiang et Meinhart (1992) ont confirmé ce fait.

Strobel et Gröger (1989) ont signalé que l'indican et l'isatan B sont présents dans les espèces d'*Isatis*. L'isatan B en majorité dans les feuilles et l'indican dans les racines, mais dans des quantités plus réduites.

Zhia-Qiang et Meinhart (1992) ont isolé de l'indican d'*Isatis tinctoria*, de *Polygonum tinctorium*, de *Baphicanthus cusia* et de *Calanthe veratrifolia*. Conformément à la connaissance jusqu'à présente on accepte qu'*Isatis tinctoria* contienne tous les deux précurseurs et toutes les autres plantes à indigo ne contiennent que de l'indican.

Kokubun *et coll.*, (1998) a quantifié de l'indican et de l'isatan B dans des feuilles d'*Isatis tinctoria* et il a conclu que les feuilles plus jeunes environ le 24 % du poids sec était représenté par les précurseurs dans un rapport approximatif de 3:1 (isatan B/indican). Cet auteur a aussi trouvé qu'en ajoutant une base aux extraits bruts d'isatan B jusqu'à atteindre une valeur de pH 10,7, il s'est produit une hydrolyse immédiate et l'indigo s'est formé. Il a souligné que cette instabilité en milieu alcalin de l'isatan B est conforme à sa nature ester. Alors que l'indican est resté résistant à l'hydrolyse à pH 13,1.

Maugard *et coll.*,(2001) a identifié un nouveau précurseur de l'indigo dans *Isatis tinctoria*, qui il a nommé isatan C. Ce précurseur a été identifié comme dioxindole ester avec un poids moléculaire de 395,0 et avec une possible formule moléculaire C₂₀H₁₃O₈N, ainsi que l'isatan B, l'isatan C s'est avéré instable en un

milieu alcalin et s'est hydrolysé très vite, ce qui a été attribuée à son lien du type ester.

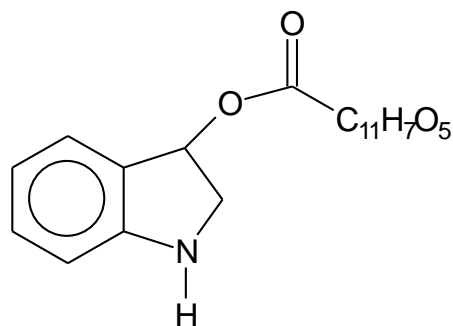


Figure 3. Isatan C ou dioxindole ester

Cet auteur a observé que les feuilles d'*Isatis tinctoria* récoltées en juin, elles ont produit une quantité importante d'isatan C, ce qui favorise la production de pigments rouges tels que l'indirubine et l'isoindirubine. C'est la première fois qui est publiée qu'il peut y avoir des précurseurs spécifiques pour la production d'une déterminée molécule colorante.

Oberthur *et coll.*, (2004) a fait des extractions et il a étudié des précurseurs avec une polarité plus élevée que celles de l'indican et de l'isatan B dans les feuilles d'*Isatis tinctoria* à l'Université de Jena, en Allemagne. Il a identifié un nouveau précurseur qu'il a appelé isatan A (1*H*- indole-3- 6' -O-(carboxyacétyle)- β -D-ribohex-3'ulopyranoside). D'ailleurs, il a rectifié la structure de l'isatan B; au lieu d'indoxyle-5-cetogluconate il s'est avéré être 1*H*- indole-3- β - D-ribohex-3-ulopyranoside.

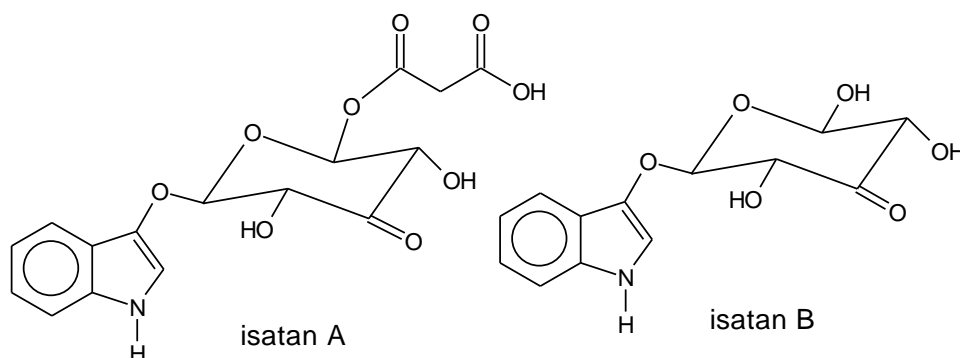


Figure 4. Isatan A et la nouvelle structure de l'isatan B d'Oberthür.

Dans ces travaux, l'isatan A s'est avéré être le précurseur majoritaire et aussi comme l'isatan B, il produit de l'indigo sous un traitement avec des acides ou des bases. On se pose également l'hypothèse que l'indican peut devenir isatan B grâce à l'intervention d'une enzyme oxydoréductase.

Modèle chimique de la biosynthèse de l'indigo dans les plantes

Avec les connaissances générées jusqu'à présent, un modèle a été conçu à l'intention d'expliquer l'évolution menant des précurseurs aux molécules colorées dérivées l'indigo. On part des connaissances acquises sur la formation des précurseurs à partir de l'indole. Pendant l'extraction, ces précurseurs subissent une hydrolyse et libèrent de l'indoxyl et du glucose. Cette hydrolyse est chimique – ou alcaline- pour les précurseurs du type ester (isatan A, isatan B et isatan C) qui se trouvent dans les feuilles d'*Isatis*, tandis que l'hydrolyse de l'indican (dans *Indigofera sp.*, *Polygonum tinctorium* et d'autres plantes à indigo) est réalisée par la voie enzymatique.

Ce modèle a été théoriquement renforcé lorsque Minami *et coll.*, (1996) a isolé une enzyme β -glucosidase des feuilles de *Polygonum tinctorium* qui hydrolyse l'indican, de même d'ailleurs que d'autres β - glycosides. Cette enzyme présente une activité élevée aux valeurs de pH comprises entre 5.5 et 7.5, et faible à pH 5.0. Ceci indique que ce catalyseur a des propriétés très particulières, car la plupart des glucosidases ont un intervalle de pH optimal compris entre 4.0 et 5.5. La stabilité thermique de cette enzyme a également été déterminée et on a trouvé qu'à une température de 37°C pendant un temps de 25 minutes ou à 0°C pendant une heure, son activité est réduite en 50%. À une température de 60 ° C pendant 5 minutes son activité a disparu complètement. En outre, certains cations divalents, tels que Cu^{2+} , Ag^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} et Cd^{2+} , inhibent l'activité de l'enzyme de *P. tinctorium* comme dans la plupart de la β -glucosidases.

Il est donc établi que les méthodes d'extraction sont déterminées par le type d'hydrolyse du précurseur majoritaire dans chacune des espèces productrices d'indigo. De fait, la méthode d'extraction pour le pastel est faite par la voie alcaline et pour d'autres espèces indigotiers on utilise la voie enzymatique. Cette différenciation est basée sur les propriétés chimiques des précurseurs, en particulier par le type de liaison de l'hétéroside: une liaison du type éther pour l'indican et une liaison ester pour le reste des précurseurs.

Par suite de l'hydrolyse des précurseurs, selon les espèces, l'indoxyle est libéré. Deux molécules d'indoxyle réagissent pour former de l'indigo ou de l'indigotine. L'indoxyle peut aussi s'oxyder pour produire de l'isatine qui à son tour réagit avec l'indoxyle pour former de l'indirubine. D'autre part, l'hydrolyse de l'isatan C donne du dioxindole et ensuite de l'isatine pour produire finalement de l'indirubin (Maugard *et coll.*, 2001).

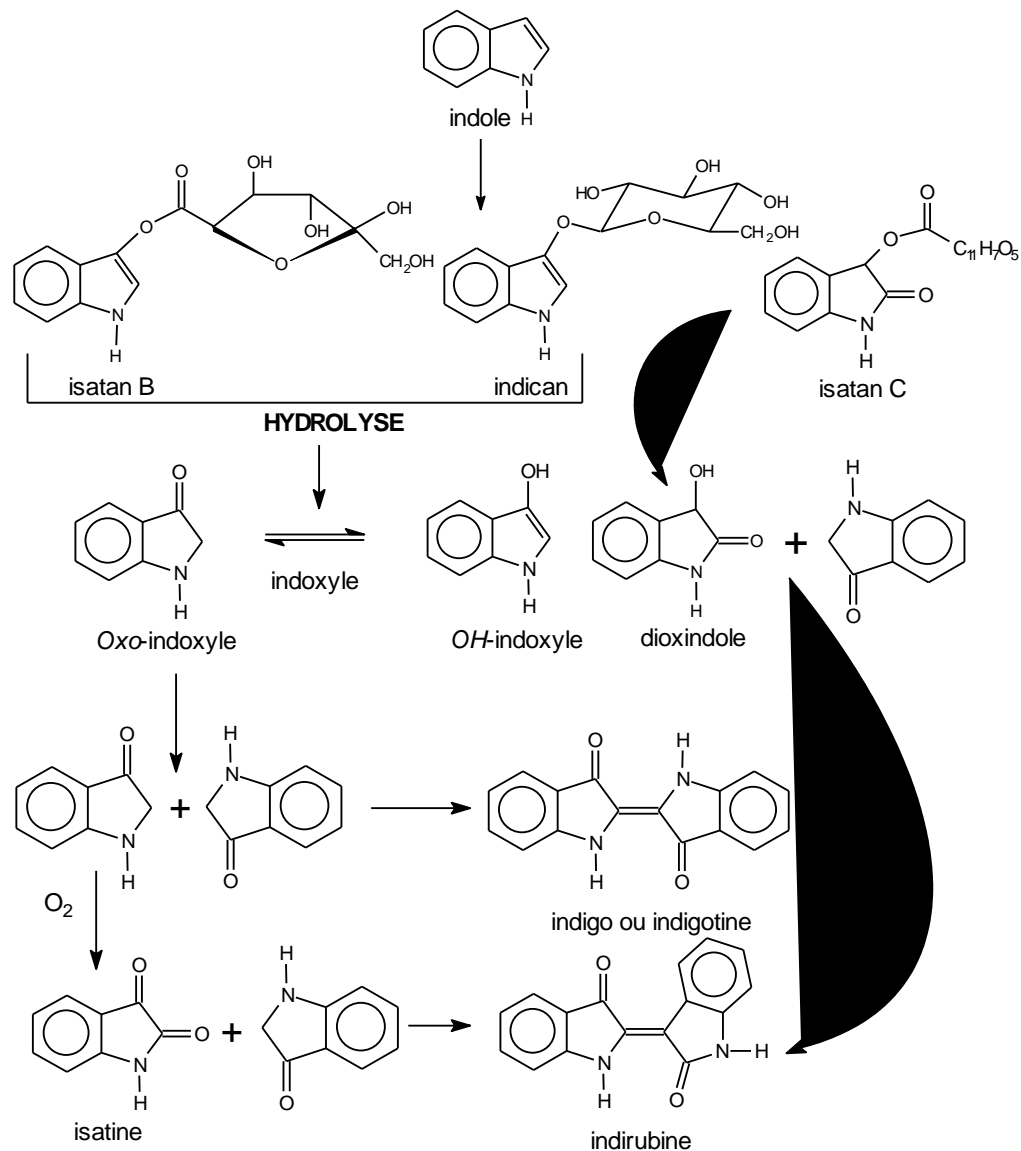


Figure 5. Modèle chimique de la formation de molécules colorantes indigoïdes (Kokubun *et coll.*, 1998; Stoker *et coll.*, 1998 a; Stoker *et coll.*, 1998 b; Maugard *et coll.*, 2001).

L'indigotine et l'indirubine sont des isomères structuraux et ont des propriétés physiques et chimiques différentes.

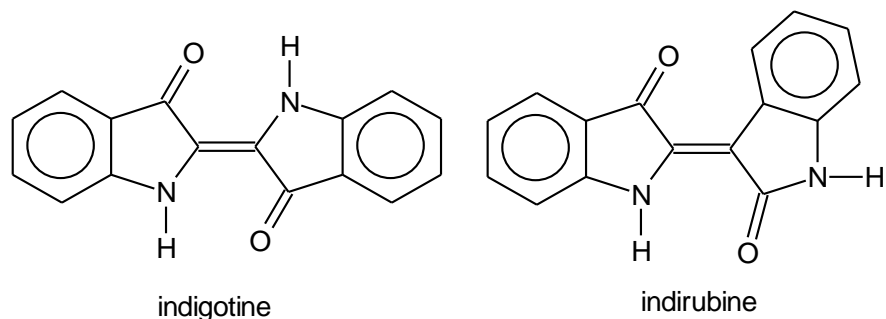


Figure 6. Les molécules dérivées de l'indigo

D'après les connaissances fondamentales qui on a jusqu'à ce moment, on accepte que le précurseur indican est résistant à l'hydrolyse chimique et la libération de l'indoxyle n'est possible que par l'action d'une enzyme β -glucosidase. Kokubun *et coll.*, (1998), a indiqué avoir tenté l'hydrolyse alcaline d'un extrait d'indican à un pH supérieur à 13,1 et il a échoué.

Dans ce travail, on fait un compte rendu des résultats d'extraction avec des feuilles d'*Isatis tinctoria* (pastel), ainsi que d'*Indigofera suffruticosa* (añil).

Matériaux et méthodes

Les essais expérimentaux ont été effectués à des moments différents, dans le Laboratoire de Chimie Agroindustrielle de l'École Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France, dans le cas du pastel, et dans le Laboratoire des Agroressources et Métabolites Secondaires de l'Université Autonome de Chapingo, Mexique, pour l'añil.

Matériel végétatif

Les feuilles de pastel ont été récoltées dans la ville de Castelnaudary, France dans un état de rosette et ceux d'añil provenaient de plantes cultivées dans l'Unité Expérimentale « San Ignacio » de l'Université de Chapingo, Mexique. Les plantes d'añil se sont taillées dans le mois de février pour provoquer l'émission de nouvelles branches et feuilles.

Extraction

Avec les feuilles des deux espèces on a essayé trois traitements d'extraction:

(1) Le premier a consisté en mettant le matériel végétal dans l'eau (1 litre pour 100 grammes de feuilles fraîches) et en chauffant jusqu'à atteindre une température de 70°C, puis on a séparé les feuilles et l'extrait est ajusté à une valeur de pH 9,0 avec une solution diluée de NaOH 1N.

(2) Dans la deuxième procédure, les feuilles ont été mis dans l'eau à un pH de 9,0 et, on a chauffé à une température de 70°C. L'extrait a été récupéré par filtration.

(3) Dans la troisième méthode d'extraction on met les feuilles dans l'eau, dans la proportion déjà indiquée, et on laisse pour macérer à température de laboratoire pendant la nuit. Le lendemain, on récupère l'extrait.

(4) De plus, seulement avec des feuilles d'añil, on a tenté une autre méthode qui a consisté en verser aux feuilles fraîches de l'eau bouillante et laisser bouillir pendant 5 minutes. Quand l'extrait s'est refroidi, les feuilles traitées ont été séparés et on a récupéré le liquide.

Quantification de l'indigo

Pour la quantification de l'indigo on a mis au point une courbe d'étalonnage avec de l'acétate d'éthyle et de plusieurs concentrations d'un standard d'indigo (Sigma-Aldrich). Des extraits aqueux ont été extraits avec une quantité égale d'acétate d'éthyle pour trois fois dans une extraction liquide-liquide. La phase organique a été scannée au spectrophotomètre dans une longueur d'onde de $\lambda = 614$ nm.

Résultats et discussion

L'apparition de l'indigo dans les extraits a été perçue par une couleur bleue avec une surface cuivreuse et a été différente selon le procédé d'extraction, comme l'indiqué le Tableau 1.

Tableau 1. Révélation de l'indigo dans les extraits

Méthode	Espèces	Moment de l'apparition de l'Indigo	Procédure de révélation de l'indigo
1	pastel/añil	Après l'ajout de la base et légère agitation	Élévation du pH de l'extrait
2	pastel/añil	Après avoir dépassé 70°C	Réchauffement
3	pastel/añil	Après d'une heure d'agitation	Agitation mécanique
4	añil	Après 7 jours de repos à température du laboratoire	Aucun

Les rendements en indigo sont présentés au Tableau 2:

Tableau 2. Rendements en indigo des méthodes d'extraction

Méthode	Rendement en indigo (mg/g de poids sec)	
	<i>Isatis tinctoria</i>	<i>Indigofera suffruticosa</i>
1	2,71 ± 0,99	16,83 ± 2,47
2	2,28 ± 0,8	4,23 ± 0,37
3	6,45 ± 1,07	2,13 ± 0,52
4	-----	21,82 ± 2,15

L'argument de Beijerinck (1899), qui est acceptée jusqu'à l'actualité, qui stipule que les extraits d'*Isatis tinctoria* produisent de l'indigo lorsqu'ils sont traités avec une base faible, tandis que ceux d'*Indigofera* ne produisent pas d'indigo bien qu'une base forte est ajoutée, et qui a été le fondement théorique pour établir que le précurseur majoritaire du pastel et celui d'*Indigofera* sont différentes chimiquement c'est absolument inconsistant. Selon nos résultats, il est possible d'extraire indigo des feuilles des deux espèces avec la même méthode d'extraction et par l'utilisation de NaOH pour ajuster le pH à la même valeur. L'explication de cette divergence, c'est qu'il s'agit du même précurseur pour les deux espèces ainsi que pour l'effet du procédé d'extraction utilisé pour Beijerinck.

La littérature affirme également que l'indican présente chez les espèces du genre *Indigofera* et dans *Polygonum tinctorium*, n'est hydrolysable que par une β -D-

glucosidase. En fait, comme on a déjà mentionné, Minami *et coll.* (1996) a isolé cette enzyme. Nos résultats indiquent qu'à l'aide d'un milieu réactionnel à pH 9,0 et chauffage à 70°C, il est possible d'obtenir de l'indigo des feuilles de pastel et ainsi que celles de l'añil. Ceci est en contradiction avec l'action d'une enzyme, car comme le signale Minami *et coll.*, (1996) l'activité de la glucosidase qu'il a isolé a complètement disparu à une température de 60°C dans un temps de 5 minutes. En outre, ces enzymes nécessitent un pH acide, et notre procédure utilisée un pH basique. À une température de 70°C et à pH 9,0, la dénaturation de toute glucosidase est imminente. Les rendements les plus élevés de l'indigo dans l'añil ont été obtenus lorsque l'on utilise une température d'ébullition durant une période de 5 minutes. Ce qui précède laisse entendre que l'hydrolyse du précurseur n'est pas de nature enzymatique, ni dans le cas du pastel, ni celui-là de l'añil.

Dans les deux premières méthodes d'extraction, pour atteindre une température de 70°C il faut un temps de 12 à 14 minutes. C'est une réaction d'hydrolyse très vite, qui ne peut être réalisée s'il s'agissait d'une hydrolyse enzymatique nécessitant des conditions spécifiques d'incubation et un temps que souvent peut prendre des heures.

Dans la troisième procédure d'extraction, la température a été en moyenne de 19-20°C et en laissant macérer les feuilles des deux espèces par un temps d'environ 15 heures, après avoir séparé les feuilles, un extrait de couleur vert clair a été obtenu, mais en la soumettant à agitation mécanique de l'indigo a été formé. Cela appuie l'idée que le précurseur des deux espèces a le même comportement dans les mêmes conditions d'extraction et par conséquent peut être le même, et que n'est pas non plus une hydrolyse chimique, parce que seulement une agitation mécanique est nécessaire pour produire de l'indigo.

Nos observations nous amènent à penser que le modèle chimique accepté jusqu'à présent sur la base de la littérature ne peut pas expliquer les anomalies du comportement du précurseur durant son évolution à matières colorantes, et qu'il faut repenser les fondements théoriques de l'extraction de l'indigo. Pour ce faire, on propose une nouvelle théorie sur ce sujet qui pourrait être utile pour résoudre des aspects peu claires de cette question si passionnant de la science.

Théorie de l'hydrolyse oxydative de l'évolution de l'indican en indigo dans toutes les plantes indigotiques

En tenant compte du fait que le matériel végétal soumis à l'extraction est vivante et fonctionnelle, il est possible d'envisager qu'au niveau cellulaire il y a des réactions d'oxydation. Les feuilles coupées, stockées et immergées dans l'eau et chauffées à certaines températures sont soumis au stress dû à plusieurs facteurs tels que:

- Réduction de la fixation de CO₂
- Faible concentration d'O₂

- Fermeture des stomates
- Immersion de matières végétales en milieu aqueux
- Perturbation de la photosynthèse
- Incidence élevée de la lumière
- Stress thermique (températures extrêmes)
- Action de solvants organiques

À cause du stress la chaîne de transport d'électrons cesse en libérant électrons de haute énergie qui attaquent l'oxygène produisant des *espèces réactives de l'oxygène* (ERO's), tels que : $^1\text{O}_2$, O_2^- , H_2O_2 et $\cdot\text{OH}$. Ces espèces provoquent la peroxydation lipidique, l'estérification des acides gras et, surtout, l'hydrolyse oxydative de l'indican en libérant de l'indoxyle au milieu cellulaire.

Toutefois, l'indoxyle est chimiquement immobilisé à cause d'une association avec des protéines globulaires solubles dans l'eau qui sortent également des cellules en raison de la destruction oxydative de la membrane, en formant un complexe indoxyleprotéique. Cette matrice protéique isole aux molécules d'indoxyle et les empêche de réagir aux colorants pour produire des molécules colorantes.

Les extraits en étant soumis à l'action des alcalis, des températures élevées ou agitation mécanique (ou une combinaison de ces traitements), les protéines qui fixent chimiquement à l'indoxyle sont dénaturées dans une certaine mesure et en le libérant. L'indoxyle libre se condense pour former de l'indigo ou son dérivé l'indirubine. Dans d'autres études avec des extraits de feuilles d'añil, on a réussi la production d'indigo avec de l'électricité et de l'ultrason.

On a également ajouté isatine à l'extrait d'añil et on se produit de l'indirubine, en indiquant que ce qui est libéré des protéines c'est l'indoxyle.

Conclusions

Selon cette théorie, il est possible de faire les propositions suivantes :

- 1) Toutes les plantes à indigo ne contiennent que le précurseur indicán ou l'indoxyle $-\beta$ -d-glucoside, y compris les espèces d'*Isatis*.
- 2) L'hydrolyse de l'indican qui libère l'indoxyle est causée par du stress oxydatif, comme un mécanisme supplémentaire de certaines plantes pour résister aux conditions extrêmes.
- 3) Pour la libération de l'indoxyle immobilisé il faut un traitement de dénaturation des protéines.

- 4) À partir de l'indican peut se produire de l'indigotine comme de l'indirubine, c'est-à-dire, il n'y a aucun précurseur exclusif pour chaque molécule colorante.

Références Bibliographiques

- Beijerinck, M. K. 1899. The production of indigo from woad (*Isatis tinctoria*). *Nature* 61(1568):71.
- Beijerinck, M. K. 1900. On the formation of indigo from the Woad (*Isatis tinctoria*). In: KNAW, Proceedings, 2,1899-1900, Amsterdam, 1900, pp.120-129.
- Cannon, M., Cannon, J. and Dalby-Quenet, G. Dye plants. London. Ed. The Herbet Press Ltd. The Royal Botanic Gardens, Kew. U.K.
- Cardon, D. 2007. Natural Dyes- Sources, Tradition, Technology and Science. London : Archetype Publication. 430 pp.
- Caster, G. 1998. Les routes de Cocagne. Le siècle d'or du pastel 1450-1561. Ed. Privat. Toulouse, France. 223 pp.
- Chanayath, N., Lhieochaiphant, S. and Phutrakul, S. 2002. Pigment Extraction Techniques from the Leaves of *Indigofera tinctoria* Linn. and *Baphicacanthus cusia* Brem. and Chemical Structure Analysis of Their Major Components. *CMU. Journal*. 1(2):149-160.
- Epstein, E., Nabors, M.W. and Stowe, B.B. 1967. Origin of indigo of woad. *Nature* 216(11):547-549.
- Farrar, W.V. 1977. Edward Schunck, F.R.S. A Pionner Product Chemistry. *Notes and Records of the Royal Society of London*. 31:271-296.
- García-Macías, P. and John, P. 2004. Formation of Natural Indigo Derived from Woad (*Isatis tinctoria* L.) in Relation to Product Purity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:7891-7896.
- Gilbert, G.K., Maule, G.H., Rudolph, B., Lewis, M., Vandenburg, H., Sales, E., Tozzi, S. and Cooke, D. 2004. Quantitative Analysis of Indigo and Indigo Precursors in Leaves of *Isatis* spp. and *Polygonum tinctorium*. *Biotechnol. Prog.* 20:1289-1292.
- Hoogewerff, S. and Meulen, H. 1900. Contribution to the knowledge of indican. *Proc. Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences* 2, 1899-1900:520-525.
- Hurry, J.B. 1930. The Woad plant and its dye. London, Oxford Univ. Press. U.K., 315 p.
- Kokubun, T., Edmonds, J. and Jhon, P. 1998. Indoxyl derivatives in Woad in relation to medieval indigo production. *Phytochemistry* 49(1):79-87.
- Maier, W., Schumann, B. and Gröger, D. 1990. Biosynthesis of indoxyl derivatives in *Isatis tinctoria* and *Olygonum tinctorium*. *Phytochemistry* 29(3):817-819.
- Maugard, T., Enaud, E., Choisy, P. and Legoy, D. 2001. Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad). *Phytochemistry* 58:897-904.
- Minami, Y., Kanafuji, T. and Miura, K. 1996. Purification and characterization of a β -Glucosidasa from *Polygonum tinctorium*, Which catalyses preferentially the hydrolysis of indican. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(1):147-149.

- Oberthür, C., Schneider, B., Graf, H., and Hamburger, M. 2004. The Elusive Indigo Precursors in Woad (*Isatis tinctoria* L.)- Identification of the Major Indigo Precursor, Isatan A, and a Structure Revision of Isatan B. *Chemistry & Biodiversity* 1:174-182.
- Oberthür, C., Graf, H. and Hamburguer, M. 2004. The content of indigo precursors in *Isatis tinctoria* leaves- a comparative study of selected accessions and post-harvest treatments. *Phytochemistry*. 65:3261-3268.
- Perkin, A.G. and Bloxan, P.W. 1907. Indican. Part I. *Journal of the Chemical Society Transactions*. 91:1715-1728.
- Schraudolf, H. 1968. Untersuchung zur biogenese von Isatan B der indigovorstufe aus dem fäberwaid (*Isatis tinctoria* L.). *Z. Naturforsch.* 23b:572-573.
- Strobel, J. und Groger, D. 1989. Über das Vorkommen von Indigovorstufen in *Isatis*-Species. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 184:321-327.
- Stoker, K.G., D.T. Cooke and D. J. Hill. 1998a. Influence of light on natural indigo production from woad (*Isatis tinctoria*). *Plant Growth Regulation* 25:181-185.
- Stoker, K.G., D.T. Cooke and D. J. Hill. 1998b. An Improved Method for the Large-Scale Processing of Woad (*Isatis tinctoria*) for Possible Commercial Production of Woad Indigo. *J. Agric. Engng. Res* 71:315-320.
- Shunck, E. 1855. X. On the formation of indigo-blue. Part I. *Philosophical Magazine Serie* 4 15(97):73-95.
- Vilarem, G. 1999. La chimie du Pastel. *Espaces pour Demain* 61:16-17.
- Vilarem, 2005. *Isatis tinctoria*. In : *Les Travaux de l'Académie des Arts & des Sciences du Pastel*. No. 1 Juin 2005. France. pp 6-7.
- Zhia-Quiang, X. and Meinhart, H.Z. 1992. Biosynthesis of indigo precursors in higher plants. *Phytochemistry* 31(8):2695-2697.