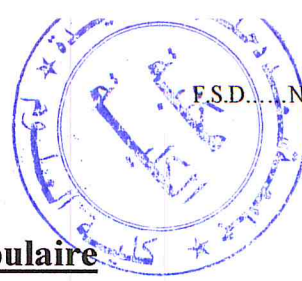


MA-540-50 (1)



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

CHERFI Hamida

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine Science de la matière
Filière Chimie
Option Chimie des Substances Naturelles

Titre

**Dosage des méroditerpènes à noyau hydroquinonique
de l'algue brune *cystoseira stricta* par spectrométrie
infrarouge à transformée de Fourier IRTF**

Dirigé par : Prof. DAGHBOUCHE Y.

Année : 2012-2013

MA-540-50-1



Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier vivement ma promotrice Madame **DAGHBOUCHE Y.**, professeur à l'Université Saad Dahlab de Blida, de m'avoir encadrée dans ce travail ainsi que sa patience, sa disponibilité, ces encouragements et je suis très reconnaissante de tout ce qu'elle m'a apporté tant du point de vue scientifique que du point de vue personnel. Merci profondément pour le temps consacré...

Un immense Merci à Madame **Dr. BOUZIDI N.**, pour sa gentillesse et son aide lors de la période de travail au laboratoire, à qui j'exprime ici mon profond respect.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **EL HATTAB M.** professeur à l'Université Saad Dahlab de Blida, qui m'a honoré en acceptant de présider ce jury.

Je tiens à remercier les membres de jury de mon mémoire **Dr. BOUZIDI N.** et **Dr. CHEMAT Z.**, maitres de conférences à l'Université Saad Dahlab de Blida, qui me fait un réel honneur de juger ce travail.

Mes remerciements vont aussi à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.

Merci à tous.

Dédicaces

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents

Mes frères et mes sœurs

Mes chères amies

Toute ma famille

Résumé

L'intérêt que nous portons au dosage de métabolites secondaires dans les algues par spectrométrie IRTF nous a amené à cibler, à travers cette étude les méroditerpènes à noyau hydroquinonique qui représente la fraction majoritaire dans la composition des méroditerpènes de l'algue brune *cystoseira stricta*.

Le présent travail porte sur la détermination spécifique des méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaires et polaires de l'algue brune *cystoseira stricta* par spectrométrie IRTF, après traitement préalable de l'extrait lipidique selon le protocole de Bligh et Dyer et en utilisant l'hydroquinone comme étalon.

L'évaluation de contenu des méroditerpènes à noyau hydroquinonique dans l'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta* a été effectuée en utilisant les valeurs d'absorbance de l'aire de la bande à 1512cm^{-1} corrigée avec une ligne de base stabilisée entre 1500 et 1530cm^{-1} . Le taux déterminé par calibration externe est de 2.8 eg/g pour les méroditerpènes à noyau hydroquinonique polaires et de 4.0 eg/g pour les méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaires.

Mots clés : Algue brune, *cystoseira stricta*, méroditerpènes à noyau hydroquinonique, hydroquinone, spectrométrie IRTF.

ملخص

أدى اهتمامنا بمعايرة المركبات الثانوية في الطحالب عن طريق المطيافية ما تحت الحمراء بتحويل فوريي إلى اختيار من خلال هذه الدراسة الميروديتريبيانات ذات نواة الهيدروكينون التي تمثل الجزء الكبير في تركيبة الميروديتريبيانات في الطحلب البني سيستوزيرا ستريكتا .

يركز هذا العمل على التحديد الخاص للميروديتريبيانات ذات نواة الهيدروكينون معتدلة القطبية و القطبية للطحلب البني سيستوزيرا ستريكتا باستعمال المطيافية ما تحت الحمراء بتحويل فوريي بعد اخضاع المستخلص الدهني لمعالجة أولية وفقا لطريقة Blich و Dyer واستخدام الهيدروكينون كمعيار.

تم إجراء تقييم محتوى الميروديتريبيانات ذات نواة الهيدروكينون معتدلة القطبية و القطبية في المستخلص الدهني للطحلب البني سيستوزيرا ستريكتا باستخدام مساحة الموجة الخاصة عند 1512 سم⁻¹ مع قاعدة مصححة بين 1500 و1530 سم⁻¹. النسبة المحددة باستعمال المعايرة الخارجية هي 2.8 معادل للغ / غ بالنسبة للميروديتريبيانات ذات نواة الهيدروكينون القطبية و 4.0 معادل للغ / غ بالنسبة للميروديتريبيانات ذات نواة الهيدروكينون معتدلة القطبية.

الكلمات المفتاحية: طحلب بني، سيستوزيرا ستريكتا، الميروديتريبيانات ذات نواة الهيدروكينون، الهيدروكينون، المطيافية ما تحت الحمراء بتحويل فوريي.

Abstract

Our interest of the determination of secondary metabolites in algae by FTIR spectrometry led us to identify, through this study the meroditerpenes with hydroquinone nucleus witch is the major fraction in the composition of meroditerpenes in the brown algae *cystoseira stricta*.

This work focuses on the specific determination of meroditerpenes with hydroquinone nucleus witch as moderately polar and polar in the brown seaweed *cystoseira stricta* by FTIR spectrometry, after pretreatment of the lipid extract according to the protocol of Bligh and Dyer and using hydroquinone as standard.

The evaluation of the content of meroditerpenes with hydroquinone nucleus in the lipid extract of the brown algae *cystoseira stricta* was performed using the absorbance values of the area of the band at 1512cm^{-1} corrected with a baseline established between 1500 and 1530 cm^{-1} . The rate determined by external calibration is 2.8 eg/g for meroditerpenes with hydroquinone nucleus witch as polar and 4.0 eg/g for meroditerpenes with hydroquinone nucleus witch as moderately polar.

Key words: Brown algae, *cystoseira stricta*, meroditerpenes with hydroquinone nucleus, hydroquinone, FTIR spectrometry.

Liste des abréviations

CLHP: Chromatographie Liquide à Haute Performance

IRTF: Infrarouge à Transformée de Fourier

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CH₂Cl₂: Dichloromethane

EtOH: Ethanol

MeOH: Methanol

CHCl₃: Chloroform

H₂O: Eau

B et D: Bligh et Dyer

R_F : Rapport frontal

LD : Limite de Détection

DSR: Déviation Standard Relative

DC: Domaine de Concentration

Liste des figures

Figure I.1	Structure de phloroglucinol et les phlorotanins	7
Figure I.2	Exemples des différents types de squelettes de méroditerpènes isolés à partir d'algues du genre <i>Cystoseira</i>	9
Figure I.3	Biogenèse des méroditerpènes	9
Figure I.4	Taxonomie et position systématique de la famille de <i>Cystoseiracea</i>	11
Figure I.5	Comparaison des diterpènes et des méroditerpènes	12
Figure I.6	<i>Cystoseira stricta</i>	13
Figure I.7	Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier	16
Figure II.1	Montage de flux utilisé pour la détermination par IRTF	20
Figure II.2	Spectre IRTF de l'extrait brut de <i>cystoseira stricta</i> préparé dans CH ₂ Cl ₂ -EtOH 80 :20 (v/v) sans traitement préalable (noir) et l'hydroquinone 1mg.ml ⁻¹ (marron)	21
Figure II.3	Protocole de Bligh et Dyer utilisé pour l'extraction des méroditerpènes à noyau hydroquinonique	23
Figure II.4	Plaque CCM de l'extrait brut et l'hydroquinone	25
Figure II.5	Structure d'hydroquinone et de deux méroditerpènes à noyau hydroquinonique	26
Figure II.6	Spectre IRTF de l'hydroquinone (5mg.ml ⁻¹) préparée dans CH ₂ Cl ₂ -EtOH 95 :5 (v/v)	28
Figure II.7	Spectre IRTF de l'hydroquinone (4mg.ml ⁻¹) préparée dans CH ₂ Cl ₂ -EtOH 80 :20 (v/v)	28
Figure II.8	Spectre IRTF de l'hydroquinone (4mg ml ⁻¹) préparée directement dans CH ₂ Cl ₂ -EtOH 80:20 (v/v)	29

Figure II.9	Spectres IRTF d'absorbance d'une série d'étalon d'hydroquinone préparée directement dans CH ₂ Cl ₂ -EtOH 80:20 (v/v), pour un domaine de concentration compris entre 0.5-4mg.ml ⁻¹	30
Figure II.10	Comparaison de la hauteur et l'aire de pic à 1512cm ⁻¹ d'une concentration de 4mg.ml ⁻¹ d'hydroquinone préparée directement dans CH ₂ Cl ₂ -EtOH 80:20 (v/v)	31
Figure II.11	Spectres IRTF d'absorbance de la série des solutions d'hydroquinone récupérée à partir de la phase moyennement polaire (CHCl ₃ /MeOH) pour un domaine de concentration compris entre 0.5-4mg.ml ⁻¹	32
Figure II.12	Spectres IRTF d'absorbance de la série des solutions d'hydroquinone récupérée à partir de la phase polaire (H ₂ O/MeOH) pour un domaine de concentration compris entre 0.5-4mg.ml ⁻¹	34
Figure II.13	Spectres IRTF comparatifs de l'hydroquinone (C=0.5mg.ml ⁻¹) récupérée de la phase moyennement polaire (CHCl ₃ /MeOH) (jaune), de l'extrait brut (noir) et de la phase moyennement polaire (CHCl ₃ /MeOH) obtenus après traitement de l'extrait (rouge)	36
Figure II.14	Spectres IRTF de l'extrait traité de la phase moyennement polaire (CHCl ₃ /MeOH) (A), extrait traité avec ajout de 1mg.ml ⁻¹ d'hydroquinone (B), et extrait traité avec ajout de 3mg.ml ⁻¹ d'hydroquinone (C)	39
Figure II.15	Spectres IRTF comparatifs de l'extrait brut (rouge) et de la phase polaire (H ₂ O/MeOH) obtenus après traitement de l'extrait (noir).	40
Figure II.16	Spectres IRTF comparatifs de l'extrait traité de la phase polaire (H ₂ O/MeOH) (D), extrait traité avec ajout de 1mg.ml ⁻¹ d'hydroquinone (E), et extrait traité avec ajout de 3mg.ml ⁻¹ d'hydroquinone (F)	42

Liste des tableaux

Tableau I.1	Méroditerpènes isolés et caractérisés de quelques algues brunes de genre <i>cystoseira</i>	10
Tableau I.2	Quelques Méroditerpènes isolés de l'algue brune <i>Cystoseira stricta</i>	14
Tableau II.1	Solubilité de l'hydroquinone	29
Tableau II.2	Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone préparée directement dans CH ₂ Cl ₂ -EtOH 80:20 (v/v)	31
Tableau II.3	Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone récupérée à partir de la phase moyennement polaire (CHCl ₃ /MeOH)	33
Tableau II.4	Caractéristiques analytiques du l'hydroquinone récupérée à partir de la phase polaire (H ₂ O/MeOH)	35
Tableau II.5	Taux de méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaires de l'extrait de l'algue brune <i>cystoseira stricta</i> déterminé par calibration externe	37
Tableau II.6	Taux de méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaires dans l'extrait de l'algue brune <i>cystoseira stricta</i> déterminé par ajout standard	38
Tableau II.7	Taux de méroditerpènes à noyau hydroquinonique polaires dans l'extrait de l'algue brune <i>cystoseira stricta</i> déterminé par calibration externe	41
Tableau II.8	Détermination des méroditerpènes à noyau hydroquinonique dans l'extrait lipidique de l'algue brune <i>cystoseira stricta</i> après traitement	43

Table des matières

REMERCIEMENTS

DEDICACES

RESUME

LISTE DES ABRIVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE

1

Chapitre I Synthèse bibliographique

I.1	Généralités sur les algues	4
I.1.1	Définition	4
I.1.2	Les grands groupes d'algues	4
I.1.3	Utilisation des algues	4
I.1.4	Caractéristique des algues brunes	5
I.2	Métabolites secondaires des algues brunes	5
I.2.1	Les sterols	5
I.2.2	Les phénols	6
I.2.3	Les terpènes	7
I.2.3.1	Les meroditerpènes	8
I.3	Présentation de la famille des Cystoseiraceae	10
I.4	Le genre <i>cystoseira</i>	12
I.4.1	L'algue brune <i>cystoseira stricta</i>	13
I.4.1.1	Position systématique de L'algue brune <i>cystoseira stricta</i>	13
I.4.1.2	Description	13
I.4.1.3	Meroditerpènes isolés de l'algue brune <i>cystoseira stricta</i>	14

I.5	Procédés généraux d'extraction des extraits d'algues	15
I.6	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	15
I.6.1	Principe	15
I.6.2	Analyse qualitative	16
I.6.3	Analyse quantitative	17

Chapitre II Partie expérimentale

II.1	Introduction	19
II.2	Instrumentation et réactifs	19
II.2.1	Spectrophotomètre Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	19
II.3	Procédure générale	21
II.3.1	Spectre IRTF de l'extrait lipidique de l'algue brune <i>cystoseira stricta</i>	21
II.3.2	Extraction des méroditerpènes à noyau hydroquinonique à partir de l'extrait lipidique de l'algue brune <i>cystoseira stricta</i>	22
II.3.3	Identification des méroditerpènes à noyau hydroquinonique par chromatographie sur couche mince (CCM)	24
II.3.4	Choix de l'étalon pour le dosage des méroditerpènes à noyau hydroquinonique par la spectrométrie IRTF	25
II.3.5	La méthode des ajouts standards	26
II.4	Résultats et discussions	27
II.4.1	Testes de solubilité de l'hydroquinone dans le solvant de l'IRTF	27

II.4.2	Spectre IRTF de l'hydroquinone	29
II.4.3	Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone préparée directement dans CH ₂ Cl ₂ -EtOH 80:20 (v/v)	30
II.4.4	Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone récupérée après traitement	32
II.4.4.1	Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone récupérée à partir de la phase moyennement polaire (CHCl ₃ /MeOH)	32
II.4.4.2	Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone récupérée à partir de la phase polaire (H ₂ O/MeOH)	33
II.4.5	Détermination des méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaires de l'algue brune <i>cystoseira stricta</i>	36
II.4.5.1	Par la méthode de calibration externe	36
II.4.5.2	Par la méthode des ajouts standards	37
II.4.6	Détermination des méroditerpènes à noyau hydroquinonique polaires de l'algue brune <i>cystoseira stricta</i>	40
II.4.6.1	Par la méthode de calibration externe	40
II.4.6.2	Par la méthode des ajouts standards	41
	Conclusion générale	45
	Références bibliographique	48



Introduction Générale

Introduction

L'intérêt grandissant de la recherche dans le domaine de la chimie des substances naturelles trouve son explication dans les trois objectifs visés: l'investigation de composés à haute valeur ajoutée; la découverte de nouveaux modèles chimiques; et la recherche de composés biologiquement actifs [1].

Sur près de 220 000 substances naturelles répertoriées, seules 10 % sont d'origine marine. Ceci peut s'expliquer par le fait que les organismes marins ont été beaucoup moins étudiés que leurs analogues terrestres, et ce principalement à cause du manque de connaissance du milieu marin et des difficultés liées à la récolte des échantillons. Ainsi, les premières recherches sur les produits naturels marins datent seulement de la fin des années 60 alors que les substances d'origine terrestre sont étudiées intensivement depuis déjà plus d'un siècle [2].

Près de 80% des produits naturels marins ont été décrits à partir d'éponges (Porifera), d'algues (Chlorophycota, Rhodophycota, Chromophycota et Cyanophycota) et de cnidaires (coraux, gorgones, méduses, etc.) [3].

Les algues présente un intérêt particulier parce qu'ils renferment des métabolites secondaires qui possèdent des activités biologiques et qui jouent un rôle important en chimiotaxonomie et en médiateurs chimiques. De ce fait, le dosage de cette classe de produits chimiques présente une grande importance afin de pouvoir valoriser les végétaux marins ou même de savoir s'il existait des possibilités de différenciation entre les espèces, et par conséquent, le développement de nouvelles méthodes d'analyse est indispensable et toujours nécessaire pour les chercheurs travaillant dans ce large domaine de recherche.

Comme continuité aux travaux de recherche réalisés au sein de notre équipe de recherche sur le développement de nouvelles méthodes de dosage des métabolites secondaires (à savoir les stéroïdes) dans les algues par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), nous examinons à travers cette étude la possibilité du dosage spécifique des deux fractions de mérodiaterpènes à noyau hydroquinonique (mérodiaterpènes à noyau hydroquinonique moyennement

polaires et méroditerpènes à noyau hydroquinonique polaires) de l'algue brune *cystoseira stricta* par la dite technique.


Les méroditerpènes des algues brunes présentent deux séries ; les méroditerpènes à noyau hydroquinonique et les méroditerpènes à noyau chromanol [2], dans ce travail l'intérêt a été porté particulièrement sur la première série du fait qu'elle est majoritaire dans la composition des méroditerpènes de l'algue brune *cystoseira stricta*.

La technique habituelle utilisée pour le dosage des méroditerpènes dans les algues brunes est la chromatographie liquide à haute performance (CLHP), l'objectif de ce mémoire est la contribution dans le développement d'une nouvelle méthode d'analyse fiable et rapide et ce, en employant la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) pour la détermination spécifique des méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaires et polaires dans l'algue brune *cystoseira stricta*.

Le contenu de ce mémoire est subdivisé en deux chapitres :

- I. Le premier chapitre consacré à la synthèse des données bibliographiques concernant :
 - Les généralités sur les algues et les principaux métabolites secondaires dans les algues brunes.
 - Présentation de l'espèce *cystoseira stricta* (espèce sélectionnée).
 - Les travaux antérieurs réalisés sur les principaux méroditerpènes des algues brunes de genre *cystoseira* et de l'algue brune *cystoseira stricta* particulièrement.

- II. Le deuxième chapitre comporte la partie expérimentale relative au dosage des méroditerpènes à noyau hydroquinonique dans l'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta* par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF); en employant une procédure d'extraction liquide-liquide selon le protocole de Bligh et Dyer.



Chapitre I

Synthèse
bibliographique

I.1. Généralités sur les algues

I.1.1. Définition

On définit en tant qu'«algue» un végétal chlorophyllien dont l'appareil végétatif, appelé thalle, ne possède aucun organe spécifique (racine, tige, feuille), contrairement aux végétaux supérieurs. Ce terme (algue) rassemble des organismes provenant d'origines évolutives très différentes : les algues forment un groupe polyphylétique, c'est à dire que les espèces qui le composent n'ont pas d'ancêtre commun [3,4].

I.1.2. Classes d'algues

Les algues peuvent être divisées en trois classes principales : les chlorophycées (algues vertes), les rhodophycées (algues rouges) et les chromophycées (comprenant entre autres les algues brunes), auxquelles s'ajoute une classe d'organismes procaryotes unicellulaires (à laquelle appartiennent les cyanobactéries) [3,5]. D'un point de vue chimique, ces trois mondes diffèrent par leurs compositions en pigments (chlorophylles et caroténoïdes) et en polysaccharides de réserve ou pariétaux. De ce point de vue, une algue verte présente plus de similitudes avec un végétal supérieur terrestre [3].

- Algues vertes (Chlorophylle A seule) [6].
- Algues rouges (Chlorophylle A + biliprotéines phycoérythrones) [7].
- Algues bleues (Chlorophylle A + biliprotéines phycocyanines) [2].
- Algues brunes (Chlorophylle A + xanthophylle) [8].

I.1.3. Utilisation des algues

A cause des propriétés de plusieurs de leurs éléments, les algues ont été utilisées à de nombreuses fins :

- Un polysaccharide a été isolé, le laminaran, composé principalement de glucose-1,3. Son sel de sodium a des propriétés possibles d'anticoagulant pour le sang. On cite d'ailleurs depuis longtemps son action comme hypocholestérolémiant (diminue le taux de cholestérol dans le sang) [9].

- En Médecine : en thalassothérapie on utilise les bains d'algues (algotérapie) pour traiter les rhumatismes ou certaines affections de l'appareil locomoteur [2].
- En Agro-alimentaire : Gélose et alginates utilisées comme agents émulsifiants, épaississants, stabilisants, gélifiants (additifs de E400 à E408), et excipients [2].
- La variété des structures chimiques et l'étendue des activités biologiques de sources marines sont absolument remarquables. En ce qui concerne les algues brunes, on peut dire qu'elles englobent une grande partie de ces activités, puisqu'on y trouve des substances bioactives comme des antibiotiques, des antiviraux, des anticancéreux, et des antihypertenseurs [9].

I.1.4. Caractéristique des algues brunes

Les algues brunes sont classées en 265 genres avec plus de 1500 espèces, caractérisés par la présence des pigments (caroténoïde et fucoxanthin) contenue dans leurs chloroplastes qui leurs donnent la couleur brune [10], ils sont riches en polysaccharides, les dérivés alcooliques, leurs paroi est composé de la cellulose et de l'acide alginique [6].

I.2. Métabolites secondaires des algues brunes

I.2.1. Les stérols

Les stérols représentent un groupe de substances dérivé d'un polycyclique isopentenoïde hydroxylé possédant la structure d'un cyclopentano-1,2 phénanthrène. Ces composés contiennent un nombre total d'atomes de carbone allant de 27 à 30 et une chaîne latérale est attachée au carbone 17 (C17). Leurs structures sont intimement liées et varient selon le degré de modification du cycle et de la variation de la chaîne latérale [11].

La composition en stérols dans les algues brunes se résume en général au fucostérol qui est toujours majoritaire, qui a été isolé des algues brunes en 1934

par Heilbron. Lorsqu'il y a d'autres stérols, il s'agit notamment du cholestérol, du 22-déshydrocholestérol, 24-méthylènecholestérol, ergostérol, brassécastérol, poriferastérol et desmostérol [12 ,13].

Nous citons à titre d'exemples ; le Fucostérol isolé de l'algue brune *cystoseira barbata* [14], le Stigmastérol isolé de deux algues brunes *dictyosphaeria cavernosa* et *sargassum denticulatum* et Ergostérol et cholestérol isolés de l'algue brune *cystoseira trinodes* [12].

I.2.2. Les phénols

Les phénols et les substances phénoliques sont des composés aromatiques hydroxylés dits monohydriques, dihydriques ou polyhydriques (présentant trois groupes hydroxyles ou plus), selon le nombre de groupes hydroxyles attachés au noyau benzénique aromatique. La formule chimique du phénol (la structure d'origine) est C_6H_5OH , on trouve les phénols simples, coumarines, flavonoïdes, stilbénes, lignanes, les tannins condensés, et les phlorotannins [15].

Les phénols des algues brunes sont principalement les phlorotanins qui sont des polymères de phloroglucinol (1, 3,5-trihydroxybenzene) (i) [16]. Il sont classés selon leurs arrangements de l'unité monomérique en fucols(ii), Phlorethols(iii), Endofucophlorethols(iv), Fuhalols(v), isofuhalols(vi) , et eckols(vii) (voire figure I.1) [17].

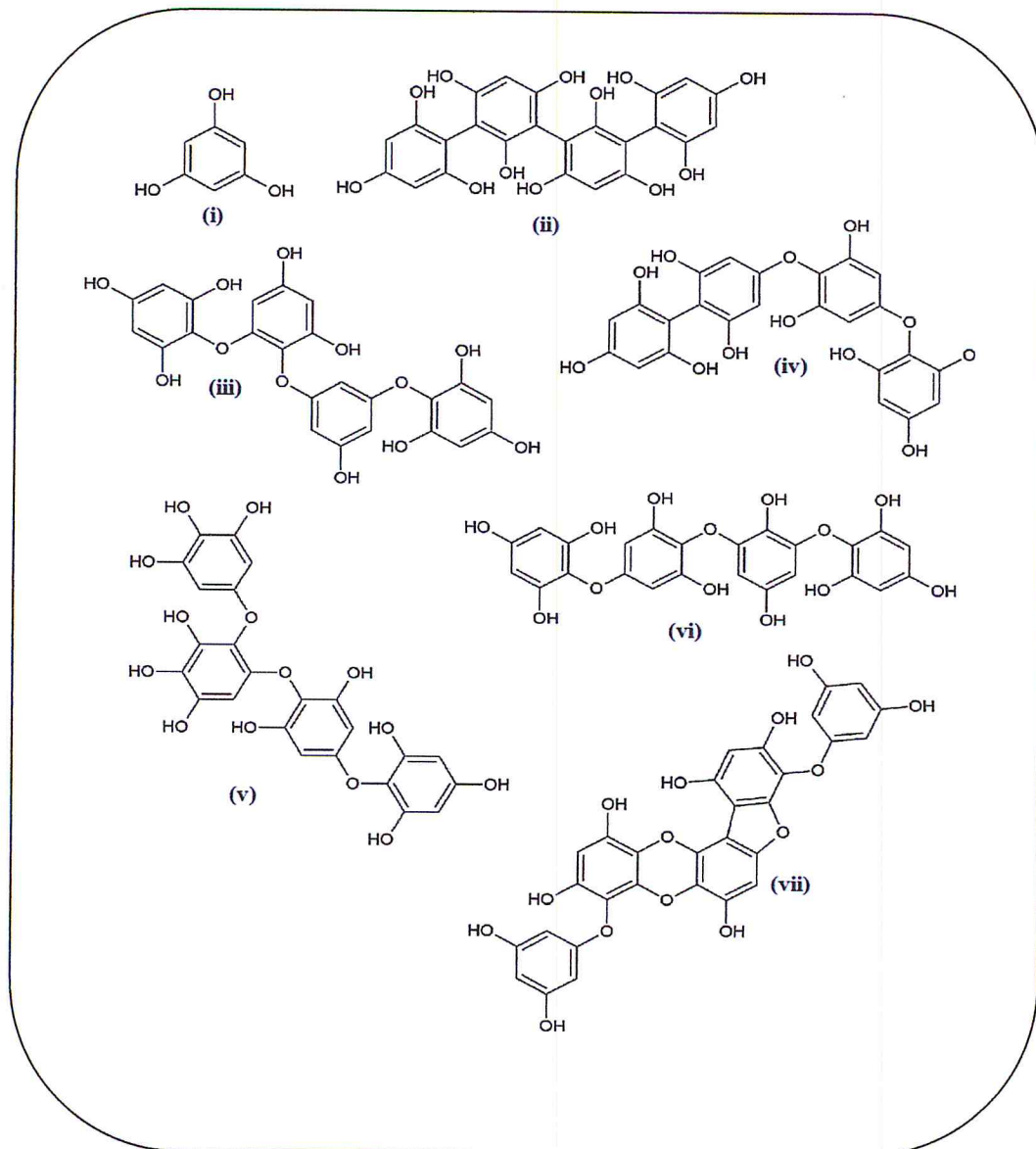


Figure I.1 : Structure de phloroglucinol et les phlorotannins [17].

On cite :

- Fucophlorethol isolé de l'algue brune *focus vesicolusus* [18].
- Phlorofucofuroeckol A isolé de l'algue brune *Ecklonia cava* [19].

I.2.3. Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte ; leur formule brute est $(C_5H_8)_n$ dont le n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). La

molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 , le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.) [20].

Les algues brunes produisent une myriade de métabolites secondaires de cette classe principalement on trouve les diterpènes acycliques et les méroditerpènes (qui sont des diterpènes cycliques) [21].

- **Les diterpènes**

On cite l'eleganediol et l'epoxyeleganolone isolés de *bifurcaria bifurcata* et crinitol isolé de *cystoseira crinita* [22].

I.2.3.1. Les méroditerpènes

Ces composés ont une biogenèse mixte caractérisée par une substitution d'un noyau hydroquinone liée à une chaîne diterpénique, le précurseur de la chaîne diterpénique est le geranylgeraniol et le noyau hydroquinone son précurseur est l'acide shikimique, le simple méroditerpène c'est le geranylgernyltoluquinol isolé de *stypopodium zonale* de la famille de dictyotaceae mais existe aussi chez les cystoseireaceae [23].

Les méroditerpènes peuvent être classés en quatre groupes en fonction de la nature de la chaîne diterpénique latérale : ainsi, ils peuvent être linéaires, monocycliques, bicycliques ou réarrangés [24].

- Les méroditerpènes linéaires pour lesquels la chaîne latérale est linéaire comme leur nom l'indique linéaire (plus de 30 molécules identifiées).
- Les méroditerpènes monocycliques avec une chaîne latérale qui contient un seul cycle carboné (plus de 10 molécules identifiées).
- Les méroditerpènes bicycliques avec deux cycles carbonés dans la chaîne latérale (Plus de 10 molécules identifiées).
- Les méroditerpènes réarrangés et pour lesquels on ne trouve pas les 4 unités isopréniques (Plus de 10 molécules identifiées).

La figure I.2 présente les différents groupes de méroditerpènes.

Le tableau I.1 regroupe quelques travaux sur les méroditerpènes isolés et caractérisés de quelques algues brunes de genre *cystoseira*.

Tableau I.1 : Méroditerpènes isolés et caractérisés de quelques algues brunes de genre *cystoseira*.

Références	Algues brunes étudiées	Méroditerpènes identifiés	Série de méroditerpènes
[25]	<i>Cystoseira mediterranea</i> , <i>Cystoseira stricta</i> (Mont) sauvageau	Isostrictaketol, balearone, Isocystoketal	à noyau hydroquinonique
[26]	<i>Cystoseira Amantacea</i> Var <i>stricta</i>	-4'-methoxy-(2E)- Bifurcarenone -2,12- Diepineobalearone	
[27]	<i>Cystoseira tamarisifolia</i>	methoxybifurcarenone	à noyau hydroquinonique
[28]	<i>Cystoseira zosteroides</i>	Zosterdiol	à noyau chromanol

I.3. Présentation de la famille des *Cystoseiraceae*

Les Cystoseiracées sont des algues brunes de l'embranchement de Chromophytes, de la division des Phéophycées et de l'ordre des Fucales. Possédant les particularités qui permettent de les distinguer sans ambiguïté. D'autre part, cette famille constitue plusieurs genres [2]. Le major genre de cette famille est *cystoseira* avec 66 espèces (34 dans la méditerranée) [29]. La figure I.4 résume la taxonomie de cette famille.

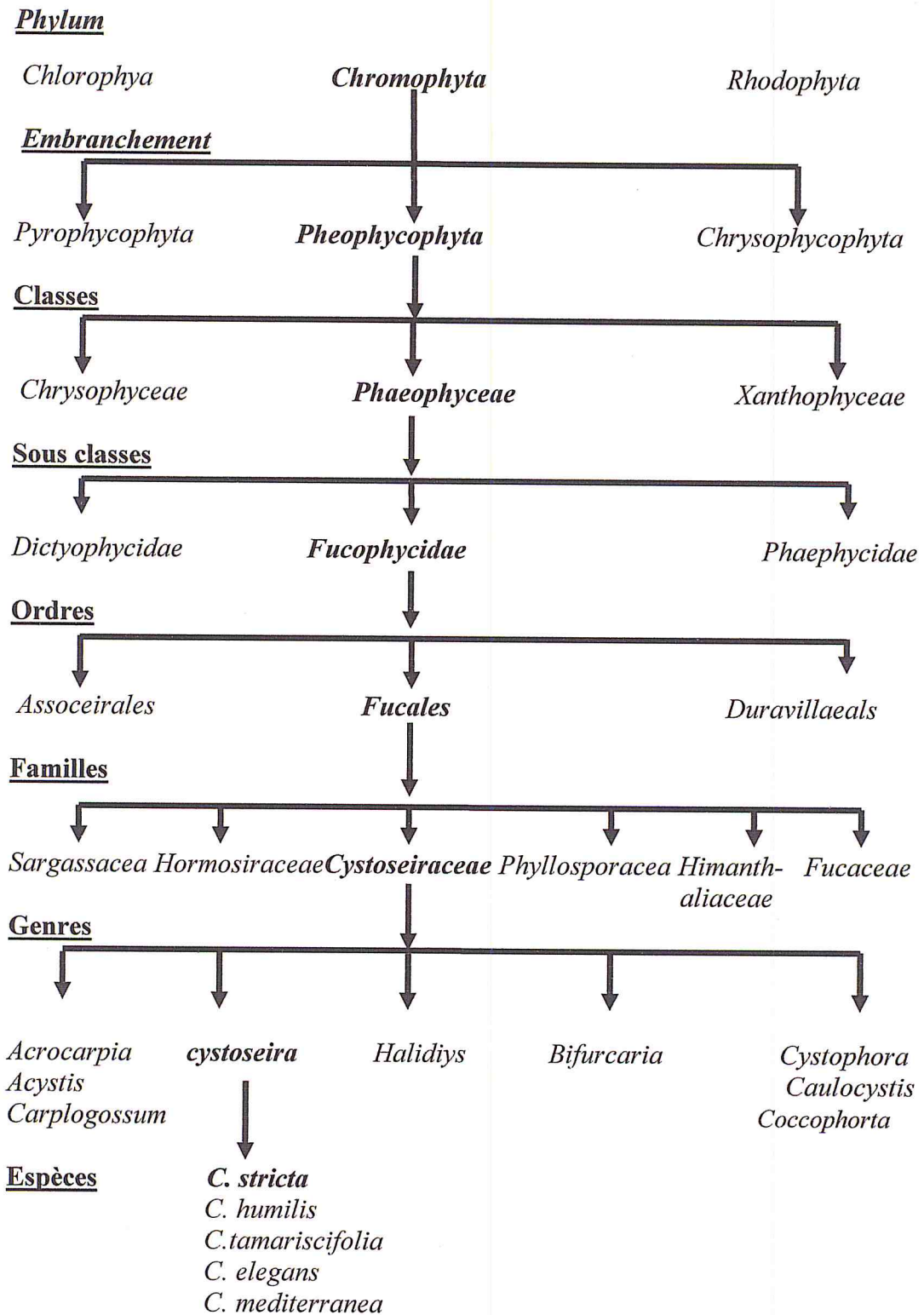


Figure I.4: Taxonomie et position systématique de la famille des *Cystoseiraceae* [2].

I.4. Le genre *cystoseira*

Le genre *cystoseira* a été créé en 1820 par C. Agradh qui reconnaissait 37 espèces [6]. Les algues de ce genre sont des algues brunes constituées par un axe principal qui est attaché au rocher par un disque basal et duquel ils portent des nombreux rameaux primaires et secondaires qui donnent à l'algue un aspect d'arbrisseaux de petite taille (10-60 cm dans les espèces méditerranéennes) [30].

Ce genre, est essentiellement représenté dans les eaux froides et tempérées de l'hémisphère nord, la mer Méditerranée en constituant la zone centrale de spéciation [3].

Les espèces de genre *cystoseira* ont été classés en trois groupes chimiques: Sans diterpènes ; avec diterpènes linéaires ; et avec méroditerpènes. Le premier groupe correspond aux espèces les plus primitives tandis que le troisième, qui peut être divisés en trois groupes en fonction de la complexité structurale des diterpénoides isolés (linéaire, cyclique ou réorganisés) [31].

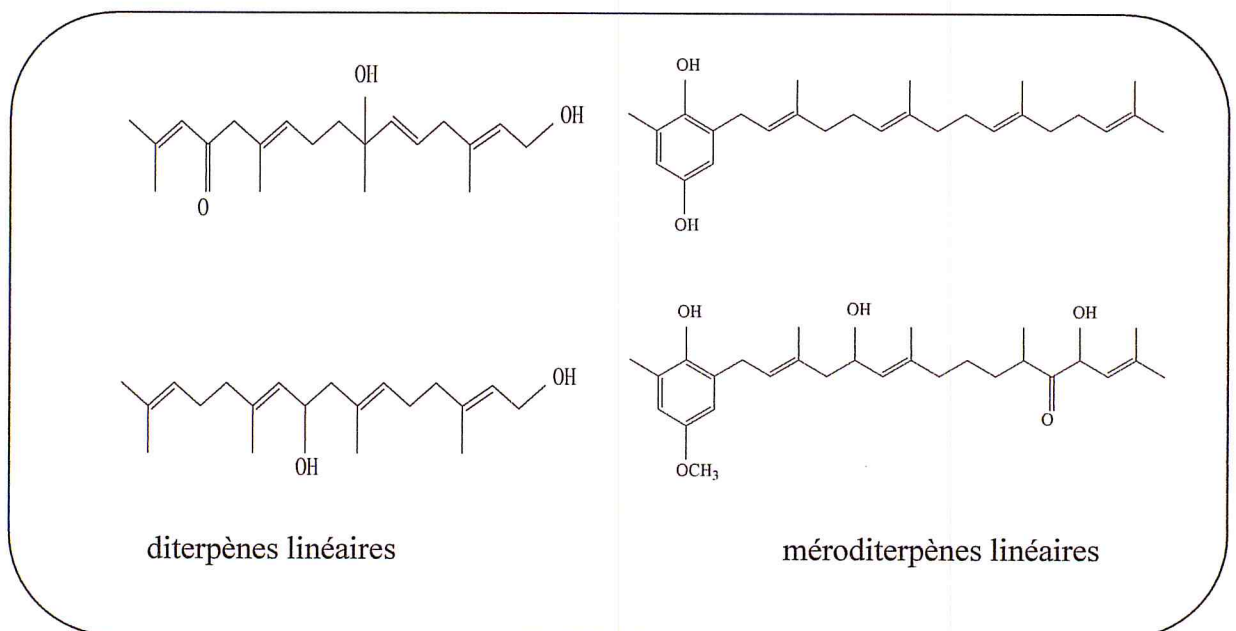


Figure I.5 : Comparaison des diterpènes et des méroditerpènes

I.4.1. L'algue brune *cystoseira stricta*

I.4.1.1. Position systématique de l'algue brune *cystoseira stricta*

Embranchement	→	Chromophytes [2].
Classe	→	Phéophycées [23].
Ordre	→	Fucales [32].
Famille	→	Cystoceiracées [33].
Genre	→	<i>Cystoseira</i> [33].
Espèce	→	<i>Stricta Montagne Sauvageau</i> [33].

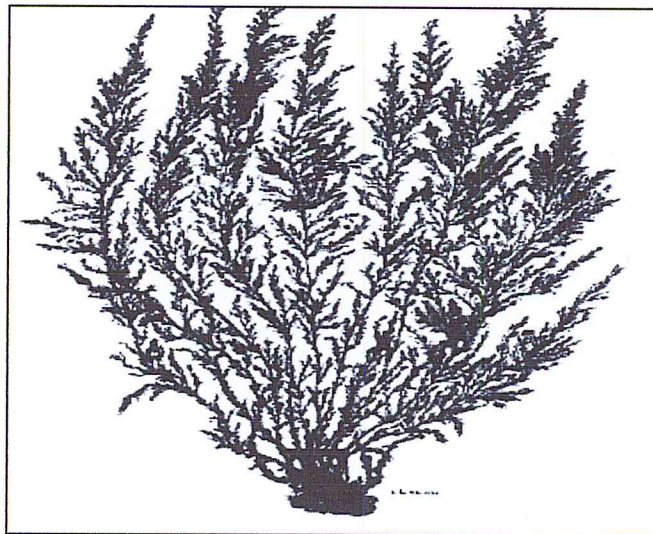


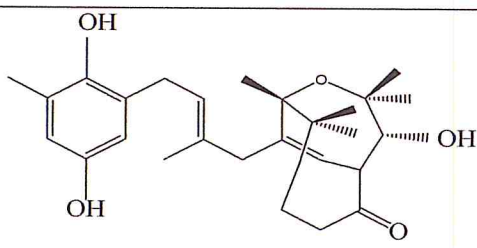
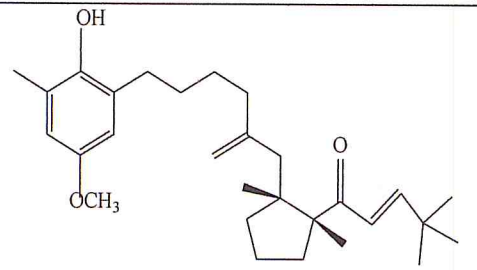
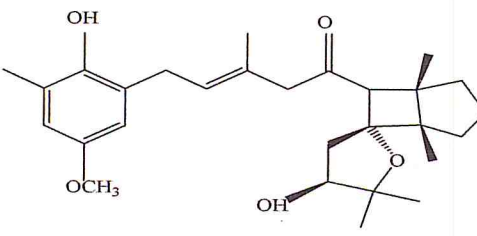
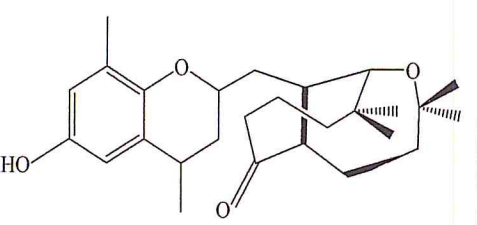
Figure I.6 : *Cystoseira stricta* [34]

I.4.1.2. Description

Cystoseira stricta (Fig. I.6), à une base discoïde, avec plusieurs tiges par base (espèce cespiteuse), à des rameaux d'ordres supérieurs, pouvant eux porter des différenciations particulières (aérocystes, épines plus ou moins grandes classiquement appelées "feuilles"), les parties distales sont caduques alors que les axes constituent la portion vivace. Cette espèce se localise principalement en ceinture sur les côtes rocheuses et exposées de l'étage infralittoral supérieur [34].

I.4.1.3. Méroditerpènes isolés de l'algue brune *cystoseira stricta*

Tableau I.2 : Quelques Méroditerpènes isolés de l'algue brune *Cystoseira stricta*

Réf	Structure	Nom de méroditerpène	Type de méroditerpène
[33]		Cystoseirol D	à noyau hydroquinonique
[35]		Methoxy-bifurcarenone	à noyau hydroquinonique
[36]		Balearone	à noyau hydroquinonique
[36]		Cystoseirol A	à noyau chromanol

I.5. Procédés généraux d'extraction des extraits d'algues

En général l'extraction se fait par les solvants chlorés (le dichlorométhane et le chloroforme) à partir d'algues sèches à une température fixe, utilisant aussi l'éther diéthylique, les produits qui ont une affinité à ces solvants seront passé dans les solvants, ces dernier sont évaporés après avoir un résidu qui sera peut être traité pour faire des analyses [22, 25, 37]

Pour des algues brunes, différents travaux ont révélés que la composition chimique de l'extrait brut obtenue est constitué essentiellement de polysaccharides, composés phénoliques, acides gras, pigments, vitamines terpènes, et stérols, et que cette composition peut varier pour la même espèce selon la variation géographique et saisonnière [8].

I.6. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

I.6.1. Principe

La spectrométrie IRTF est une technique d'analyse physico-chimique, utilisant un faisceau infrarouge qui provoque une vibration spécifique de chacune des molécules qui lui est exposée. Au moyen d'un traitement algorithmique (transformée de Fourier), ces vibrations se traduisent par la construction d'un spectre dont le profil correspond à la présence spécifique d'une ou de plusieurs molécules. Ainsi, la spectrométrie IRTF a été utilisée pour analyser qualitativement, quantitativement, et surtout de façon globale, plusieurs composés biologiques à la fois. Cette technique s'est avérée utilisable pour plusieurs types d'échantillons [38]. Un intérêt majeur de cette technique est la sauvegarde des données spectrales brutes, ce qui permet d'analyser ou de vérifier des résultats d'analyse à tout moment [39].

Grâce à un système optique appelé interféromètre de Michelson, une grande partie du spectre proche et moyen infrarouge est acquis en 30 secondes environ. Il est essentiel de savoir que l'analyse infrarouge peut être sensible [40].

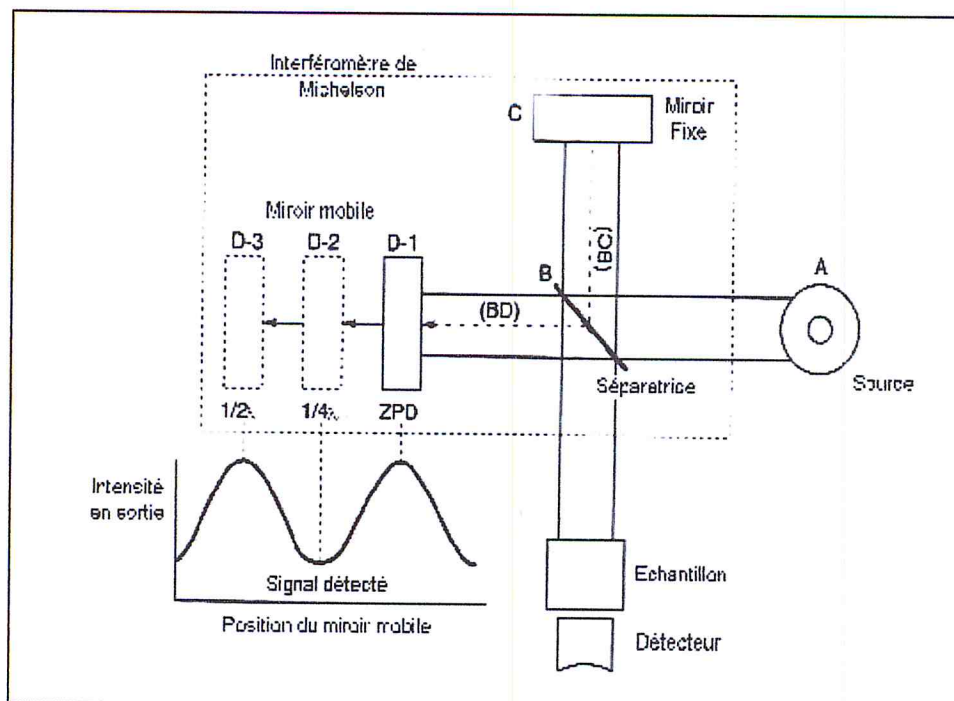


Figure I.7 : Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier

I.6.2. Analyse qualitative

L'analyse qualitative par infrarouge est la méthode la plus universelle. Le spectre infrarouge d'une molécule est une fonction des atomes constituant cette molécule et des forces de liaison qui les lient. Une molécule non linéaire constituée de N atomes présente un spectre pouvant comporter jusqu'à $(3N-6)$ bandes d'absorption. En général, ce nombre est inférieur pour des raisons de symétrie.

On conçoit bien que ce spectre sera très sensible aux modifications de structure, donc très spécifique de la molécule; on considère d'ailleurs le spectre infrarouge comme l'empreinte digitale de la molécule. En particulier, les isomères cis et trans des alcènes, les isomères ortho, méta, para des hydrocarbures aromatiques se différencient aisément. Il existe toutefois une limitation dans une série homologue, les termes de haut poids moléculaire ont des spectres pratiquement identiques [41].

I.6.3. Analyse quantitative

L'analyse quantitative par infrarouge est basée sur l'utilisation de la loi de Beer – Lambert qui établit une relation entre les mesures d'absorbances et la concentration des espèces à déterminer. Des analyses quantitatives à 10% sont relativement aisées à obtenir, pour des analyses plus précises (moins de 1% en solution) il est nécessaire d'établir une courbe d'étalonnage et de s'assurer que les spectres sont enregistrés dans les conditions optimales [11].

Très employée en analyse quantitative il y a une vingtaine d'années, la spectrométrie infrarouge a été vite concurrencée par la chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie liquide à haute performance (CLHP), et a perdu un peu de son intérêt dans ce domaine [41].



Chapitre II

Partie
expérimentale

II.1. Introduction

Ce chapitre est consacré à la partie expérimentale relative au dosage des mérodiaterpènes à noyau hydroquinonique contenus dans la fraction lipidique extraite par solvant à partir de l'algue brune sèche *cystoseira stricta* par la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), en utilisant la préconcentration basée sur l'extraction liquide-liquide selon le protocole de Bligh et Dyer [43]. Ce travail, constitue une continuité des travaux de recherche réalisés au sein de notre équipe de recherche sur le développement de nouvelles méthodes pour la détermination des métabolites secondaires (à savoir les stérols) dans les algues par spectrométrie IRTF [44, 45].

Les algues brunes du genre *Cystoseira* sont connues par leurs composition majoritaire en terpènes (principalement les mérodiaterpènes et les diterpènes) [3, 25]. Sachant que les mérodiaterpènes issus d'algues brunes de la famille de cystoseiracée présentent deux séries; les mérodiaterpènes à noyau hydroquinonique et les mérodiaterpènes à noyau chromanol. L'algue brune *cystoseira stricta* est caractérisée par l'isolement de nombreuses molécules de mérodiaterpènes à noyau hydroquinonique [2, 33].

II.2. Instrumentation et réactifs

II.2.1. Spectrophotomètre Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Le spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier de marque (Jasco) modèle IRTF -4100 à été utilisé pour effectuer des mesures dans l'intervalle de nombre d'onde $4000-400\text{ cm}^{-1}$ équipé d'un détecteur sulfate triglicine deutère (DSTG) à température stabilisée, d'une fente type globar, d'une séparatrice de radiation en KBr. et d'un processus digital (DSP), l'acquisition des spectres a été effectué avec une résolution nominale de 4 cm^{-1} et en accumulant 10 balayages par spectre.

La figure II.1 illustre le montage utilisé pour effectuer les mesures dans l'infrarouge moyen en employant des fenêtres en fluorure de calcium (CaF_2), et

une entretoise en téflon de 0.5mm d'épaisseur. Les tubes de connections sont en téflon de diamètre intérieur de 0.8 mm et le chargement est réalisé en utilisant des tubes de chlorure de polyvinyle de diamètre intérieur de 2.79 mm.

Le travail a été réalisé avec un système à écoulement bloqué avec une cellule de flux, l'avantage d'une telle cellule est d'éviter les inconvénients relatifs au remplissage et de nettoyage des cellules conventionnelles, et de minimiser la consommation des solvants organiques et de temps d'analyse (15-60s). Dans ce système le remplissage de la cellule est effectué avec une pompe péristaltique, on stop momentanément le flux, on obtient le spectre et on rétablit le flux pour laver la cellule avec le solvant ou la remplir avec une autre solution.

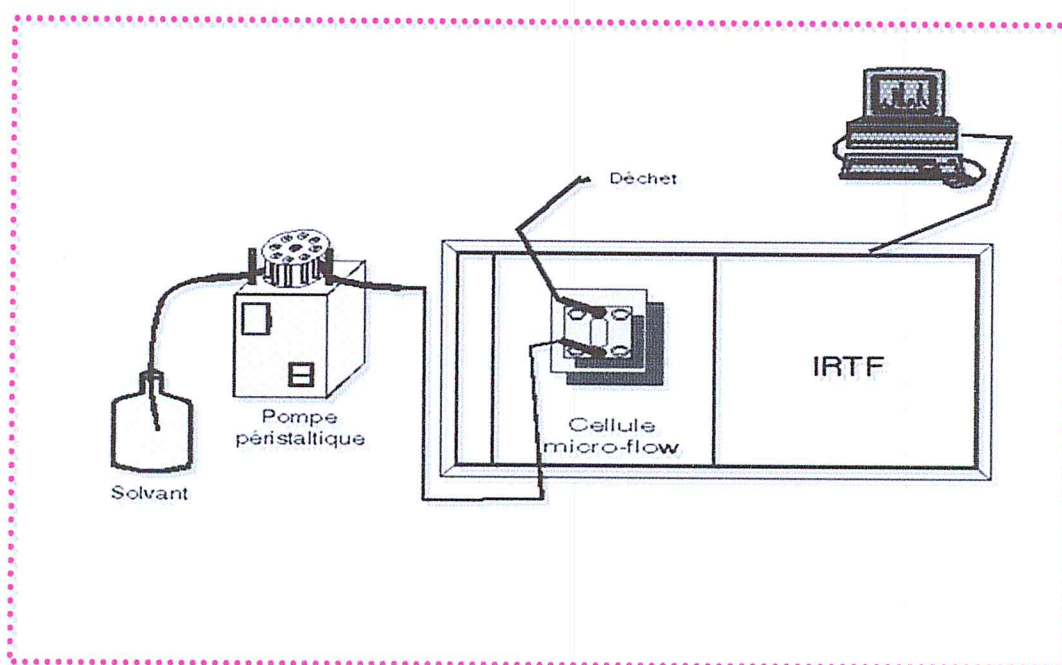


Figure II.1 : Montage de flux utilisé pour la détermination par IRTF

Pour le traitement des spectres, on a utilisé un macro qui a été construit à partir de l'option « *ApPro* » développé par *Winfirst*.

Tous les réactifs utilisés dans ce travail ; l'hydroquinone, le dichlorométhane stabilisé avec l'éthanol, l'hexane, l'éthanol et le chloroforme sont de grade analytique.

II.3. procédure générale

II.3.1. Spectre IRTF de l'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta*

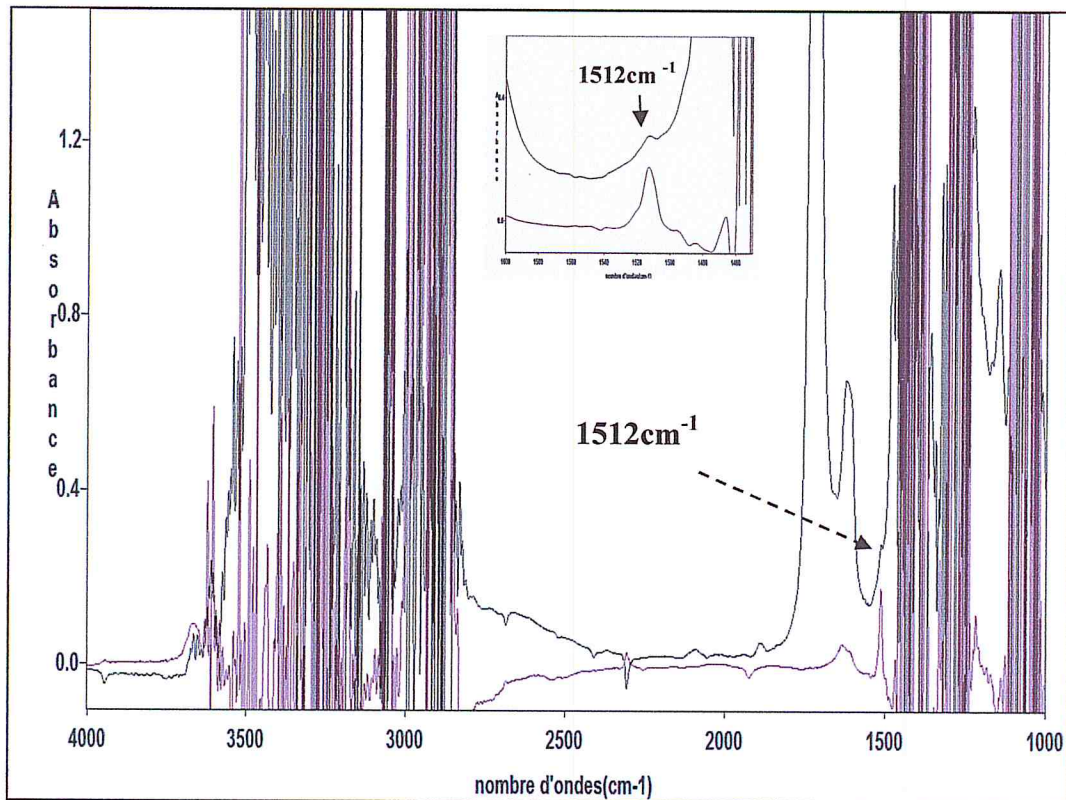


Figure II.2: Spectres IRTF de l'extrait brut de *cystoseira stricta* préparé dans CH_2Cl_2 -EtOH 80 :20 (v/v) sans traitement préalable (noir) et d'hydroquinone 1mg.ml^{-1} (marron).

L'analyse du spectre de la figure II.2 montre que la détermination directe des mérodiépènes à noyau hydroquinonique à partir de l'extrait brut de l'algue brune *cystoseira stricta* est impossible. L'extrait brut renferme plusieurs produits de nature différente qui peuvent masquer la bande spécifique de l'hydroquinone à 1512cm^{-1} . Donc un traitement préalable de l'extrait lipidique est indispensable pour permettre leur détermination.

II.3.2. Extraction des méroditerpènes à noyau hydroquinonique à partir de l'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta*

Sachant que les méroditerpènes à noyau hydroquinonique sont constitués d'une fraction polaire et d'une fraction moyennement polaire [26, 32,33], le protocole de Bligh et Dyer utilise trois solvants de polarité différente (chloroforme, méthanol et eau), en combinant deux à deux de façon à obtenir une phase moyennement polaire (CHCl₃/MeOH) et une autre polaire (H₂O/ MeOH), afin d'obtenir des fractions moyennement polaire et polaire respectivement. Dans ce procédé l'hexane est utilisé pour éliminer les composés totalement apolaires ainsi que les pigments colorés (Chlorophylle, xanthophylle ...etc.).

Dans ce travail on a utilisé le protocole de Bligh et Dyer pour obtenir la fraction des méroditerpènes à noyau hydroquinonique polaire et la fraction de méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaire en considérant 100 mg d'extrait brut de l'algue brune *cystoseira stricta*. La figure II.3 illustre les différentes étapes de traitement de l'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta*.

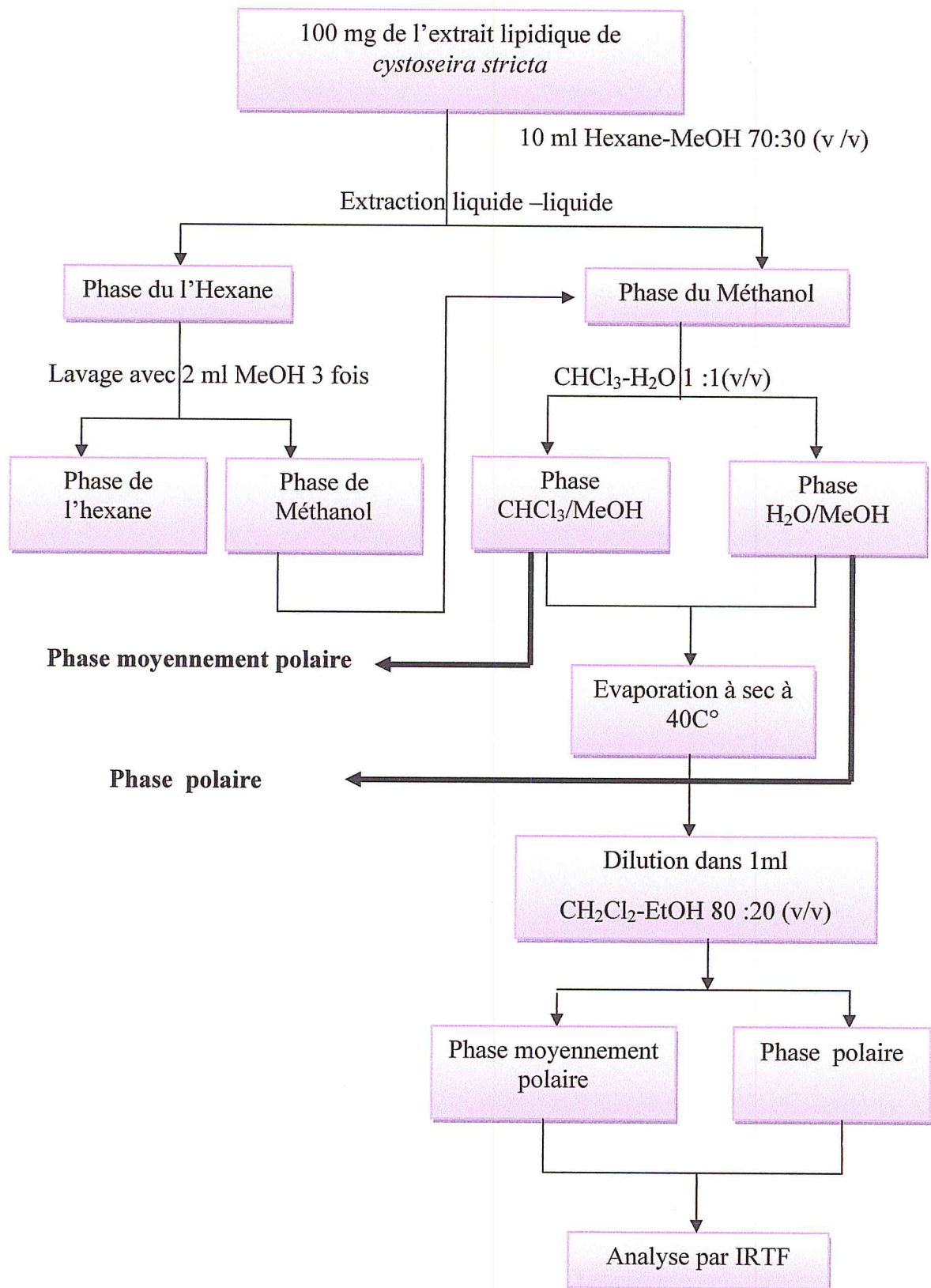


Figure II.3 : Protocole de Bligh et Dyer utilisé pour l'extraction des méroditerpènes à noyau hydroquinonique.

II.3.3. Identification des méroditerpènes à noyau hydroquinonique par chromatographie sur couche mince (CCM)

Le principe de la chromatographie repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile à travers une phase stationnaire. La chromatographie sur couche mince basée sur le phénomène d'adsorption, la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvant qui se progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant chaque composé de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front de solvant. On visualise les taches dans le cas des substances colorées, pour les substances non colorées il faut les rendre visibles pour cela on utilisant la lampe UV, la vapeur d'iode pour colorer les taches ou utiliser les révélateurs chimiques.

Chaque substance a un rapport frontal R_F , $R_F = \text{hauteur de la tache} / \text{hauteur du front du solvant}$ [13,42].

L'identification se fait par la comparaison avec le rapport frontale d'un témoin.

Avant d'entamer l'étude par la spectrométrie IRTF, on a procédé à l'identification préliminaire qualitative des méroditerpènes à noyau hydroquinonique dans l'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta* par CCM, en exploitant la présence du groupement phénolique dans la structure des méroditerpènes à noyau hydroquinonique. La chromatographie sur couche mince est effectuée sur les feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice Si 60, et en utilisant le mélange binaire acétate d'éthyle - isooctane 2 :3 (v/v) comme solvant d'élution [35]. La révélation est faite par la pulvérisation des plaques CCM avec le réactif de Gibbs (révélateurs des phénols et leurs dérivés) puis l'exposition de plaque CCM au vapeur d'ammoniaque.

Nous avons observés l'apparition de tache bleue pour l'extrait à un niveau presque que celui de l'hydroquinone (figure II.4), les rapports frontales sont respectivement $R_{f\text{EXTRAIT}} = 0.29$ et $R_{f\text{HYDROQUINONE}} = 0.33$, Les taches bleus sont

caractéristiques des phénols et leurs dérivés, ce différence de rapport frontal peut se relier au dépôt des échantillons ainsi par le fait que l'hydroquinone est moins polaire que les méroditerpènes qui sont oxygénés (plus polaires).

Cette analyse nous a permis de montrer la présence des méroditerpènes à noyau hydroquinonique dans l'extrait brut de l'algue brune *cystoseira stricta*.

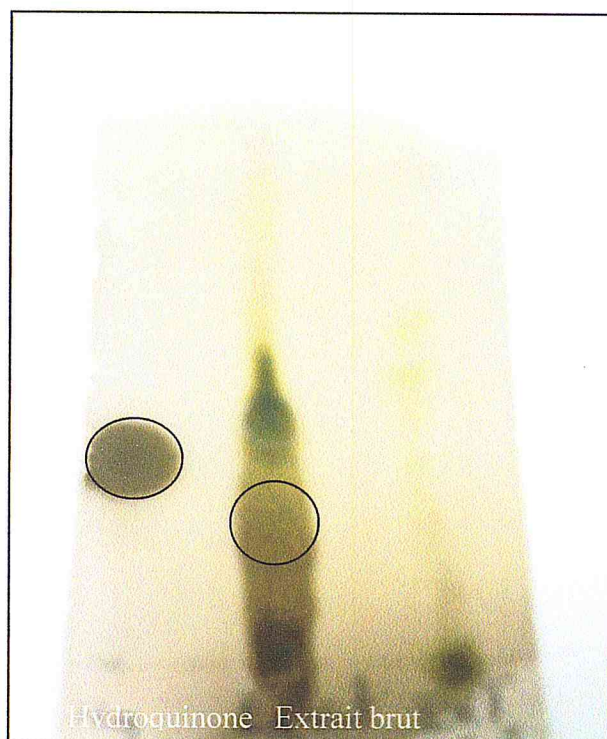


Figure II.4 : Plaque CCM de l'extrait brut et l'hydroquinone

II.3.4. Choix de l'étalon pour le dosage des méroditerpènes à noyau hydroquinonique par la spectrométrie IRTF

Il est important de rappeler que dans ce travail, nous nous intéressons au dosage d'une classe de molécules appelées méroditerpènes à noyau hydroquinonique, qui sont caractérisés par la liaison d'un noyau hydroquinone et une chaîne diterpénique, l'hydroquinone a été choisie comme standard représentant de cette classe de produit du fait que toutes les molécules possèdent le même environnement chimique au niveau du groupement phénolique (voire figure II.5) et c'est ce dernier qui va être exploiter pour les analyses par spectrométrie IRTF.

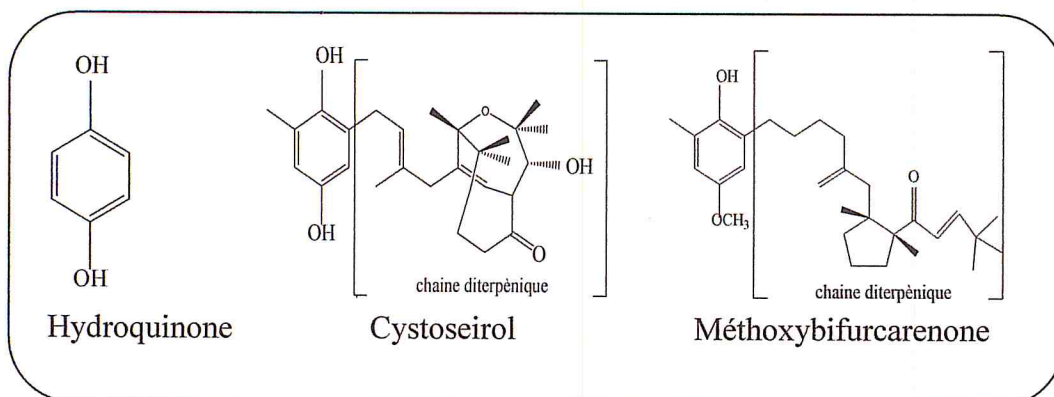


Figure II.5: Structure d'hydroquinone et de deux méroditerpènes à noyau hydroquinonique.

II.3.5. La méthode des ajouts standards

La méthode des ajouts standards souvent appelé « dopage de l'échantillon » est couramment utilisé pour la détermination de la concentration d'un analyte dans un échantillon, pour éliminer l'effet matrice liée à la présence d'autre composant qui interfèrent avec l'analyte ce qui provoque une imprécision dans la concentration déterminée, le principe consiste à ajouter l'analyte (hydroquinone) à l'échantillon et suivre l'évolution de réponse analytique entre l'échantillon et l'échantillon dopé. Cette étape permet une validation partielle du protocole de détermination des méroditerpènes à noyau hydroquinonique dans l'extrait de l'algue brune *cystoseira stricta*.

Le principe de détermination de contenu des méroditerpènes à noyau hydroquinonique dans l'extrait de l'algue brune *cystoseira stricta* par cette méthode est comme suit :

1. Faire une droite de calibration de l'hydroquinone ajouté avec l'extrait traité en considérant trois points

{	A (0, A ₀) extrait traité sans ajout de l'hydroquinone
	B (C ₁ , A ₁) C ₁ d'hydroquinone ajouté à l'extrait traité
	C (C ₂ , A ₂) C ₂ d'hydroquinone ajouté à l'extrait traité
2. *Obtenir la droite $Y = \text{pente} \cdot [\text{analyte}] + \text{ordonnée à l'origine}$, $A = aC + b$.
 **résoudre pour $A=0$.
3. Utiliser la valeur positive du $[\text{analyte}]$ dans l'étape 2**

II.4. Résultats et discussions

II.4.1. Tests de solubilité de l'hydroquinone dans le solvant de l'IRTF

La première difficulté rencontrée lors de la réalisation de ce travail était la solubilité de l'étalon (hydroquinone) dans le solvant adéquat pour les analyses par la spectrométrie IRTF à savoir les solvants chlorés. Pour résoudre ce problème une série de tests de solubilité a été effectuée dans le sens à modifier la polarité du solvant d'analyse (CH_2Cl_2) en ajoutant des proportions différentes d'EtOH (l'hydroquinone est très soluble dans l'éthanol).

On a vérifié que pour une concentration de l'ordre de 5 mg.ml^{-1} la solubilisation de l'hydroquinone dans un mélange CH_2Cl_2 -EtOH 95 :5 (v/v) est complète mais pour éviter les problèmes de précipitations avec les extraits on a testé la solubilité pour la concentration de 15 mg.ml^{-1} . Dans ce cas il a fallu d'atteindre une proportion de 20% d'EtOH pour solubiliser complètement l'hydroquinone.

Il y a lieu de noter que l'ajout de l'éthanol à CH_2Cl_2 a un effet néfaste sur la qualité des spectres infrarouge (voir figure II.6 et figure II.7), cependant l'amélioration et la correction de ces spectres peut se faire en établissant un background avec le blanc analytique (solution sans analyte qui a subi tout le traitement utilisé).

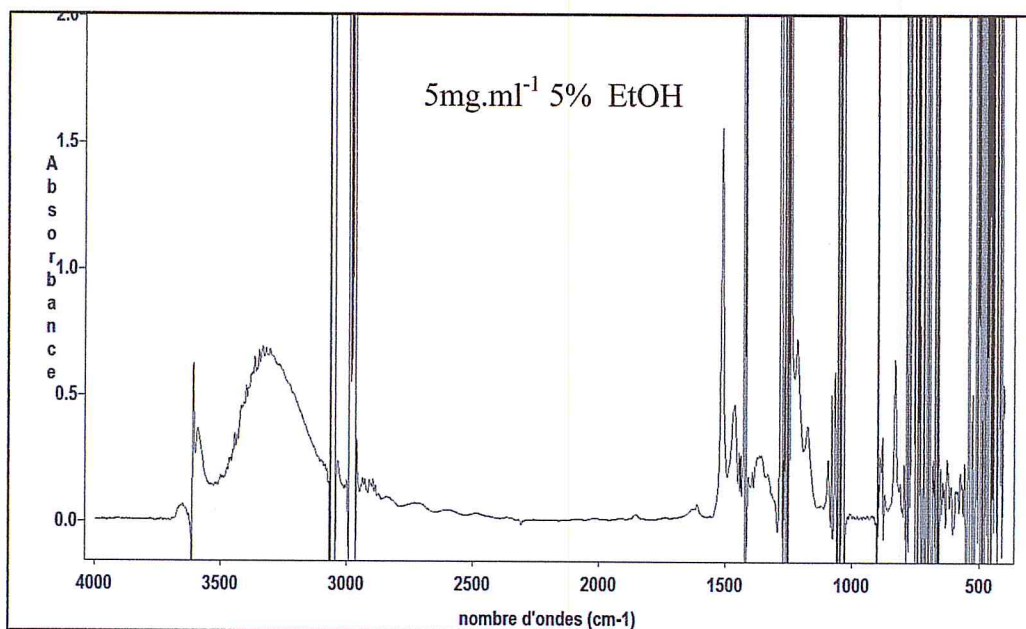


Figure II.6 : Spectre IRTF de l'hydroquinone (5mg.ml^{-1}) préparée dans CH_2Cl_2 -EtOH 95 :5 (v/v).

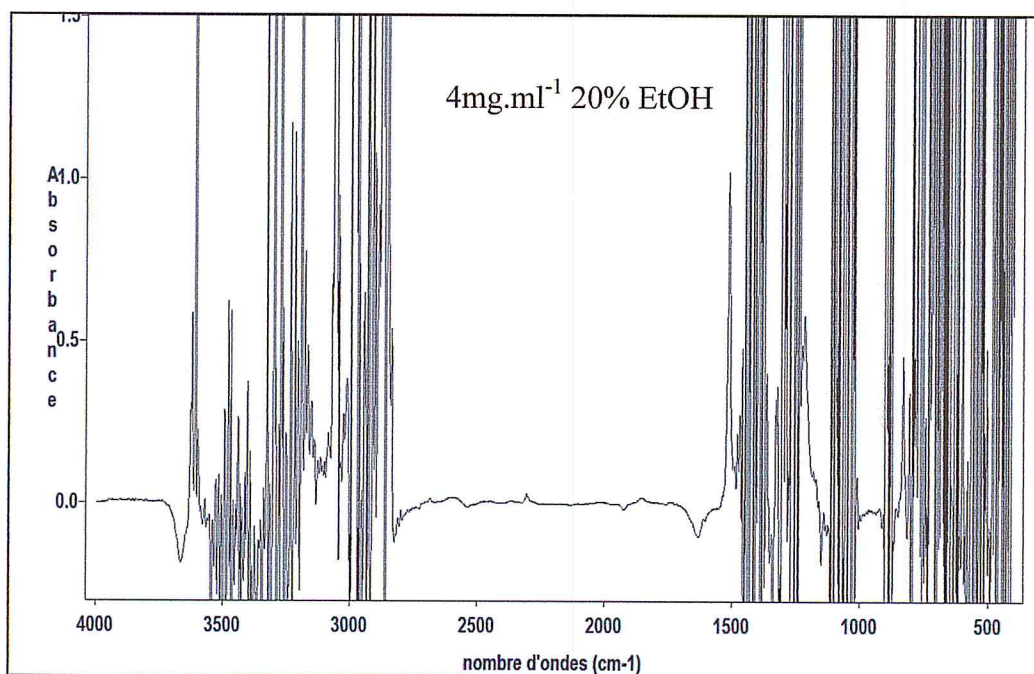


Figure II.7 : Spectre IRTF de l'hydroquinone (4mg.ml^{-1}) préparée dans CH_2Cl_2 -EtOH 80 :20 (v/v).

Le tableau II.1 résume le mélange CH_2Cl_2 - EtOH dans différentes proportions et en considérant deux concentrations différentes.

Le spectre infrarouge de l'hydroquinone obtenue directement dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-EtOH}$ 80 :20 (v/v) montre des bandes d'absorptions à 3663 cm^{-1} bande moyenne d'élongation de la liaison O-H d'un phénol, 1633 cm^{-1} bande moyenne d'élongation de la liaison C=C, 1512 cm^{-1} bande forte d'élongation de la liaison C=C d'un cycle aromatique, et une bande à 830 cm^{-1} bande forte de déformation de la liaison C-H d'un aromatique p- disubstitué.

Comme l'illustre la figure II.8 les bandes qui apparaissent à 830 cm^{-1} et 3663 cm^{-1} sont interférées par les bandes d'absorbance de l'éthanol qui apparaissent à 820 cm^{-1} (C-O de déformation), et 3600 cm^{-1} (O-H d'élongation) respectivement. De ce fait nous utilisons la bande à 1512 cm^{-1} pour la détermination de mérodiertères à noyau hydroquinonique de l'algue brune *cystoseira stricta*.

II.4.3. Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone préparée directement dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-EtOH}$ 80:20 (v/v)

Les caractéristiques analytiques de l'hydroquinone préparée directement dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-EtOH}$ 80:20 (v/v) sont obtenus pour une série de solutions étalons dans un domaine de concentration allant de 0.5 à 4 mg.ml^{-1} (voire figure II.9) Les caractéristiques analytiques sont résumés dans le tableau II.2.

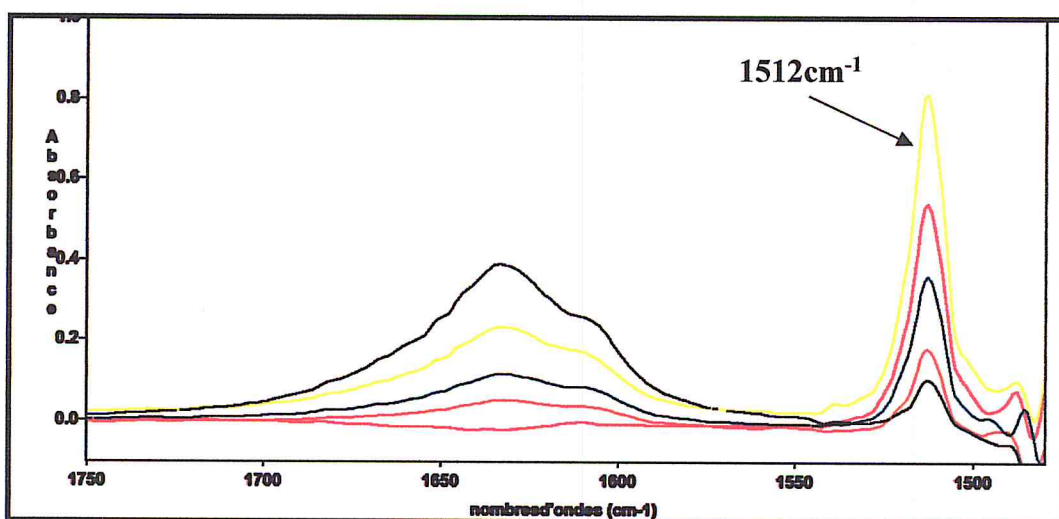


Figure II.9: Spectres IRTF d'absorbance d'une série d'étalon d'hydroquinone préparée directement dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-EtOH}$ 80:20 (v/v), pour un domaine de concentration compris entre $0.5\text{-}4\text{mg.ml}^{-1}$.

Tableau II.1 : Solubilité de l'hydroquinone

Solvant	Solubilité de l'hydroquinone	
	5mg.ml ⁻¹	15mg.ml ⁻¹
CH ₂ Cl ₂	Partiellement soluble	Partiellement soluble
CH ₂ Cl ₂ -EtOH 96 :4 (v/v)	Partiellement soluble	Partiellement soluble
CH ₂ Cl ₂ -EtOH 95 :5 (v/v)	Soluble	Partiellement soluble
CH ₂ Cl ₂ -EtOH 90 :10 (v/v)	Soluble	Partiellement soluble
CH ₂ Cl ₂ -EtOH 80 :20 (v/v)	Soluble	Soluble

II.4.2. Spectre IRTF de l'hydroquinone

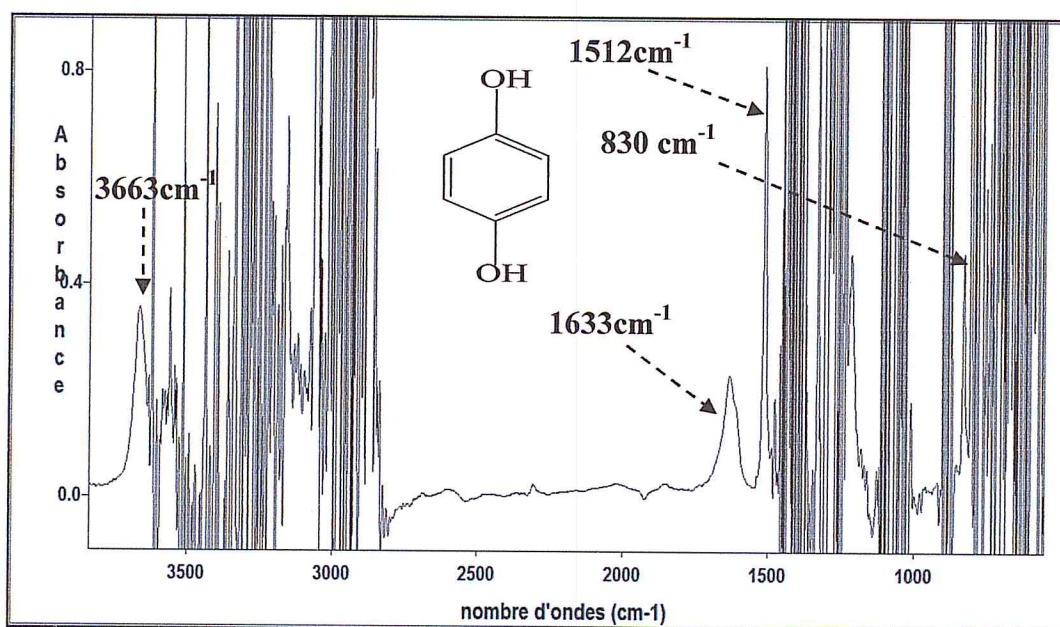


Figure II.8: Spectre IRTF de l'hydroquinone (4mg ml⁻¹) préparée directement dans CH₂Cl₂-EtOH 80:20 (v/v).

Les résultats obtenus montrent que les caractéristiques analytiques d'hydroquinone préparée directement dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-EtOH}$ 80:20 (v/v) sont optimums en considérant l'aire du pic au lieu que la hauteur du pic à 1512 cm^{-1} (Figure II.10).

II.4.4. Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone récupérée après traitement

Pour déterminer le pourcentage de récupération de l'hydroquinone dans les deux phases de polarité différente à savoir la phase moyennement polaire ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) et la phase polaire ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$), l'hydroquinone a subit le traitement décrit dans la section II.3.2.

II.4.4.1. Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone récupérée à partir de la phase moyennement polaire ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$)

La figure II.11 présente les spectres de la série des solutions d'hydroquinone récupérée à partir de la phase moyennement polaire ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) de concentration allant de 0.5 à 4 mg.ml^{-1} . Et les caractéristiques analytiques sont établies et résumés dans le tableau II.3.

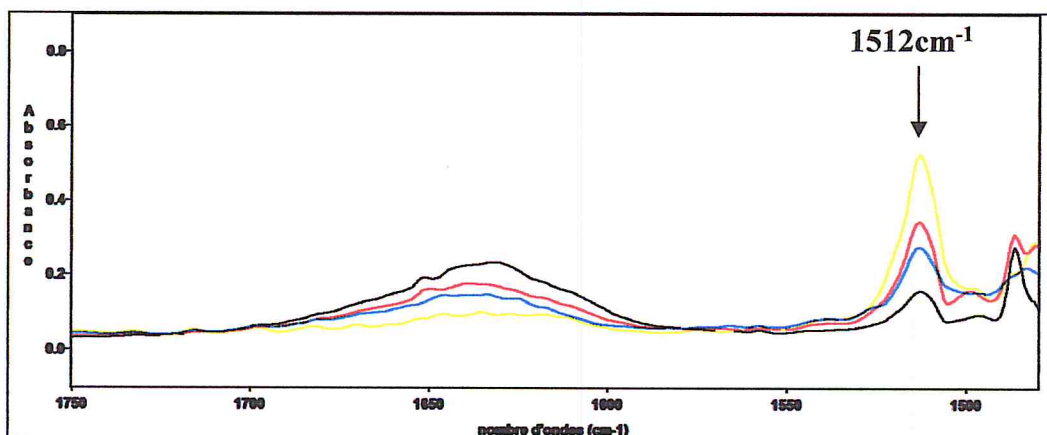


Figure II.11 : Spectres IRTF d'absorbance de la série des solutions d'hydroquinone récupérée à partir de la phase moyennement polaire ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) pour un domaine de concentration compris entre $0.5\text{-}4\text{mg.ml}^{-1}$.

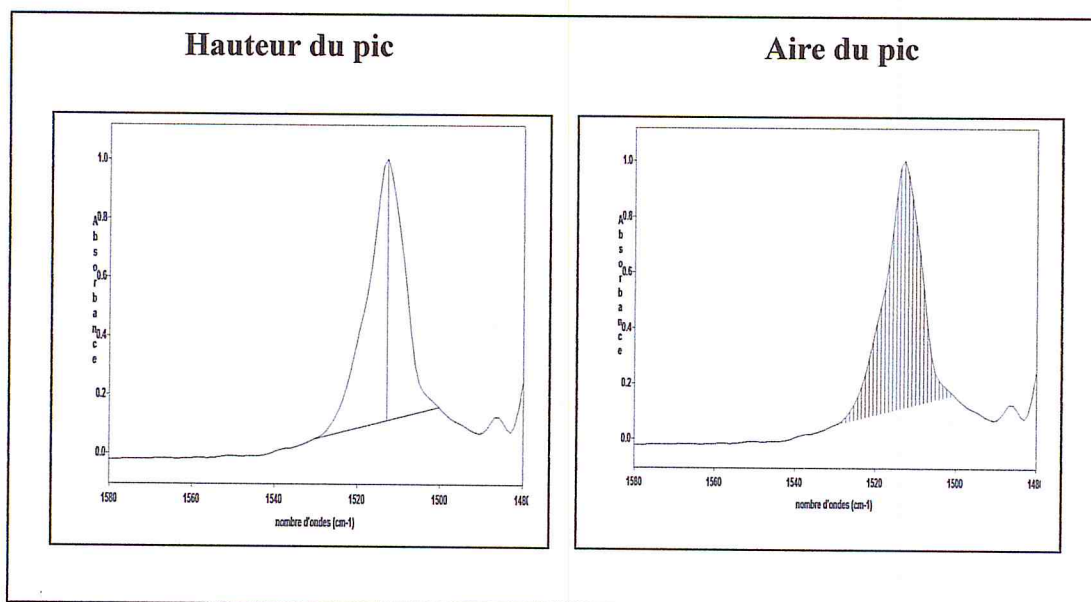


Figure II.10: Comparaison de la hauteur et l'aire de pic à 1512cm^{-1} d'une concentration de 4mg.ml^{-1} d'hydroquinone préparée directement dans CH_2Cl_2 -EtOH 80:20 (v/v).

Tableau II.2 : Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone préparée directement dans CH_2Cl_2 -EtOH 80:20 (v/v)

Paramètres analytiques	Hauteur du pic	Aire du pic
Mode de mesure		
Droite de calibration	$0.27427C - 0.01223$	$2.53370C + 0.00176$
Coefficient de corrélation	0.9992	0.9999
limite de détection (en $\mu\text{g.ml}^{-1}$)	0.035	0.019
Déviati on standard relative (en % pour n=10)	2.1	2.5
Domaine de Concentration (en mg.ml^{-1})	0.5-4	

L.D : limite de détection(en $\mu\text{g.ml}^{-1}$) obtenue par un niveau de confiance de 99.6% (k=3)

D.S.R (%) : Déviati on standard relative (pour $C=1.5 \text{mg.ml}^{-1}$)

D.C : Domaine de Concentration en mg.ml^{-1}

Conditions expérimentales : Résolution nominale 4cm^{-1} , nombre de balayage (10 scan), chemin optique 0.5 mm, background de la cellule remplie avec le solvant de dilution CH_2Cl_2 -EtOH 80:20 (v/v).

Tableau II.3 : Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone récupérée à partir de la phase moyennement polaire (CHCl₃/MeOH)

Droite de calibration	1.91027C+0.10890
Coefficient de corrélation	0.9976
limite de détection (en µg.ml ⁻¹)	0.026
Déviati on standard relative (en % pour n=10)	1.7
Domaine de Concentration (en mg.ml ⁻¹)	0.5-4
Pourcentage de récupération (en %)	75.4

L.D : limite de détection(en µg.ml⁻¹) obtenue par un niveau de confiance de 99.6% (k=3)

D.S.R (%) : Déviati on standard relative (pour C=1.5 mg.ml⁻¹)

D.C : Domaine de Concentration en mg.ml⁻¹

Conditions expérimentales : Résolution nominale 4cm⁻¹, nombre de balayage (10 scan), chemin optique 0.5 mm, background de la cellule remplie avec le blanc analytique.

II.4.4.2. Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone récupérée à partir de la phase polaire (H₂O/MeOH)

Les caractéristiques analytiques de l'hydroquinone récupérée à partir de la phase polaire (H₂O/ MeOH) sont établies et résumés dans le tableau II.4.

La figure II.12 illustre la série des solutions étalons de l'hydroquinone récupérée à partir de la phase polaire (H₂O/ MeOH) de concentration allant de 0.5 à 4 mg.ml⁻¹.

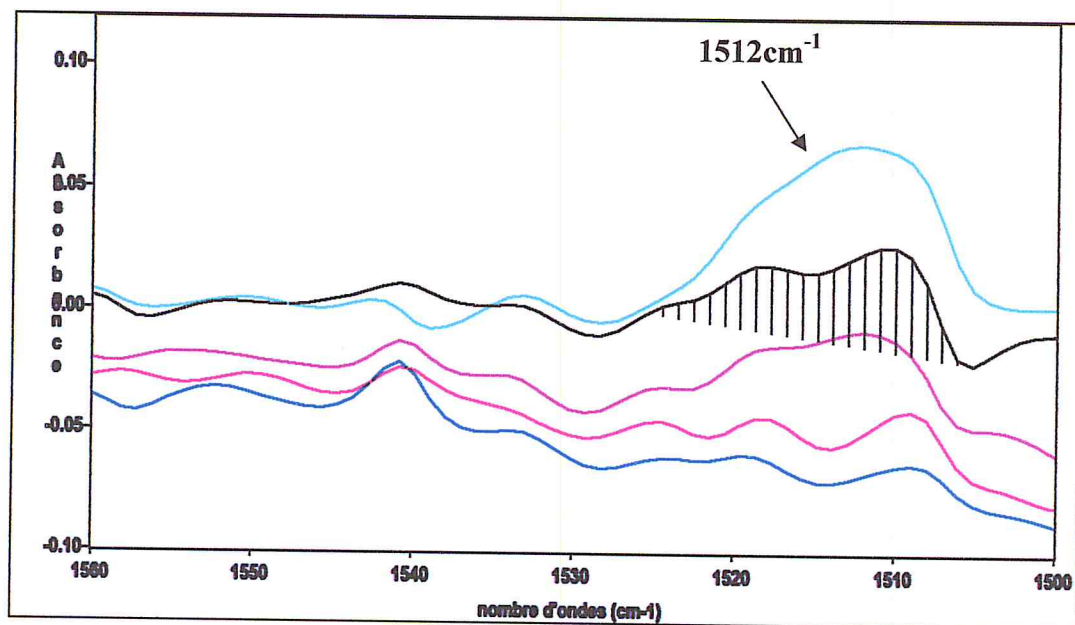


Figure II.12: Spectres IRTF d'absorbance de la série des solutions d'hydroquinone récupérée à partir de la phase polaire (H₂O/MeOH) pour un domaine de concentration compris entre 0.5-4mg.ml⁻¹

Comme on peut bien le voir, l'allure du pic à 1512cm⁻¹ n'est pas gaussienne et ne ressemble pas à celle de l'étalon mais ceci est dû au fait que la concentration de l'hydroquinone dans ce cas est trop faible et ce phénomène est toléré en spectroscopie IRTF. Il est évident dans ce cas que la considération de l'aire du pic à 1512cm⁻¹ est plus correcte pour la détermination.

Tableau II.4 : Caractéristiques analytiques de l'hydroquinone récupérée à partir de la phase polaire (H₂O/MeOH)

Droite de calibration	0.27099C+0.02607
Coefficient de corrélation	0.9996
limite de détection (en µg.ml ⁻¹)	0.18
Déviati on standard relative (en % pour n=10)	1.03
Domaine de Concentration (en mg.ml ⁻¹)	0.5-4
Pourcentage de récupération (en %)	10.7

L.D : limite de détection(en µg.ml⁻¹) obtenue par un niveau de confiance de 99.6% (k=3)

D.S.R (%) : Déviati on standard relative (pour C=1.5 mg.ml⁻¹)

D.C : Domaine de Concentration en mg.ml⁻¹

Conditions expérimentales : Résolution nominale 4cm⁻¹, nombre de balayage (10 scan), chemin optique 0.5 mm, background de la cellule remplie avec le blanc analytique.

Le pourcentage de récupération de l'ordre de 11% a été calculé en considérant le rapport des pentes de droites de calibration obtenues pour les solutions étalons traitées et les solutions étalons préparées directement dans CH₂Cl₂-EtOH 80:20 (v/v).

Cette étude confirme la répartition de l'hydroquinone entre les deux phases moyennement polaire et polaire ce qui permet le dosage de mérodi terpènes à noyau hydroquinonique de l'algue brune *cystoseira stricta* dans les deux phases.

II.4.5. Détermination des méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaires de l'algue brune *cystoseira stricta*

II.4.5.1. Par la méthode de calibration externe

Vers 100 mg d'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta* préalablement traité selon le protocole décrit dans la partie expérimentale (section II.3.2). Les méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaires récupérés dans la phase moyennement polaire ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) sont analysés par spectrométrie IRTF, le spectre est montré sur la figure II.13.

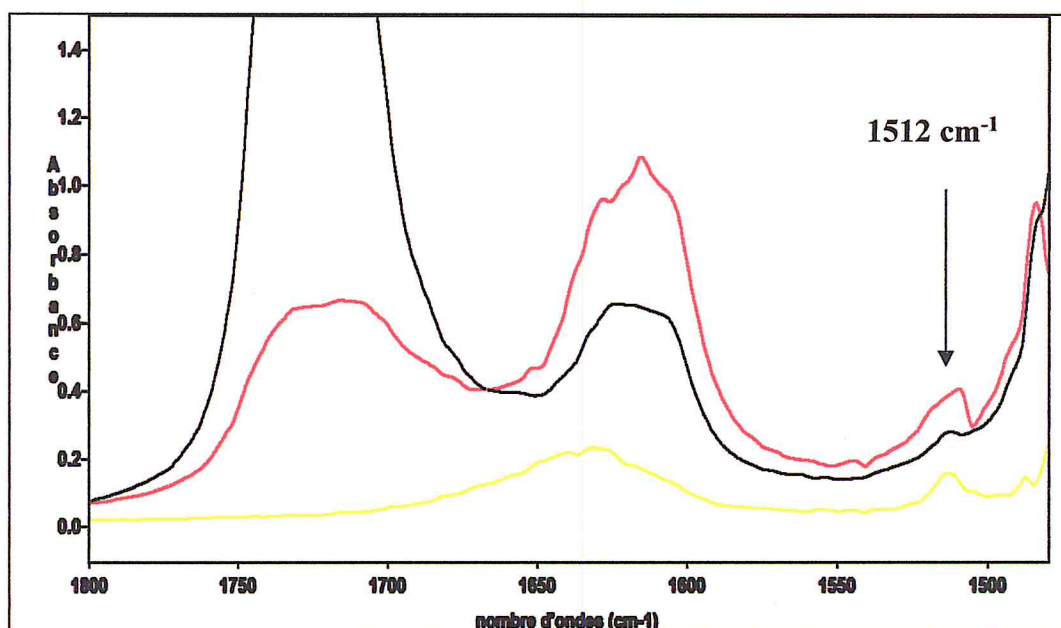


Figure II.13 : Spectres IRTF comparatifs de l'hydroquinone ($C=0.5\text{mg.ml}^{-1}$) récupérée de la phase moyennement polaire ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) (jaune), de l'extrait brut (noir) et de la phase moyennement polaire ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) obtenus après traitement de l'extrait (rouge).

Le contenu des méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaires dans l'algue brune *cystoseira stricta* est obtenu en extrapolant les valeurs d'absorbance dans la droite de calibration établie pour l'hydroquinone traitée de la même façon que les échantillons réels.

Les résultats sont résumés dans le tableau II.5 et montrent un contenu des méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaires de 4.0 ± 0.1 eg/g (valeur moyenne \pm déviation standard de deux mesures indépendantes).

Tableau II.5 : Taux de méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaires de l'extrait de l'algue brune *cystoseira stricta* déterminé par calibration externe.

Quantité de l'extrait (mg)	Aire de pic à 1512cm^{-1}	Concentration (mg.ml^{-1})	Taux (eg/g)*	Taux (eg/g)
100.7	0.86601 ± 0.00540	0.40	3.9	$4.0 \pm 0.1^\ddagger$
104.5	0.93707 ± 0.02069	0.43	4.1	

*eg de méroditerpènes à noyau hydroquinonique dans 1g d'extrait

‡valeur moyenne \pm déviation standard de deux mesures indépendantes

II.4.5.2. Par la méthode des ajouts standards

100mg d'extrait brut de l'algue brune *cystoseira stricta* ont été traités selon le protocole de (Bligh et Dyer), le contenu de la phase moyennement polaire ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) est analysé par spectrométrie IRTF et récupéré. Afin d'ajouter une concentration connue d'hydroquinone (1mg.ml^{-1} et 3mg.ml^{-1}), l'ensemble est analysé par spectrométrie IRTF, les Spectres IRTF de l'extrait traité de la phase moyennement polaire ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) (A), extrait traité avec ajout de 1mg.ml^{-1} d'hydroquinone (B), et extrait traité avec ajout de 3mg.ml^{-1} d'hydroquinone (C) sont présentés dans la figure II.14.

Le contenu des méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaires de l'algue brune *cystoseira stricta* est obtenu par le principe de détermination par la méthode des ajouts standards indiqué dans la section II.3.5.

Tableau II.6: Taux de méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaires dans l'extrait de l'algue brune *cystoseira stricta* déterminé par ajout standard.

Quantité de l'extrait (mg)	Concentration ajoutée (mg.ml ⁻¹)	Aire de pic à 1512cm ⁻¹	Concentration trouvée (mg.ml ⁻¹)	Taux (eg/g) *
100.7	1	6.05783 ± 0.49646	0.58	5.8
104.5	3	10.27991 ± 0.13089		

*eg de méroditerpènes à noyau hydroquinonique dans 1g d'extrait

Les teneurs déterminées par les deux méthodes sont comparables, cependant, des répliques supplémentaires sont nécessaires pour améliorer la précision de la détermination.

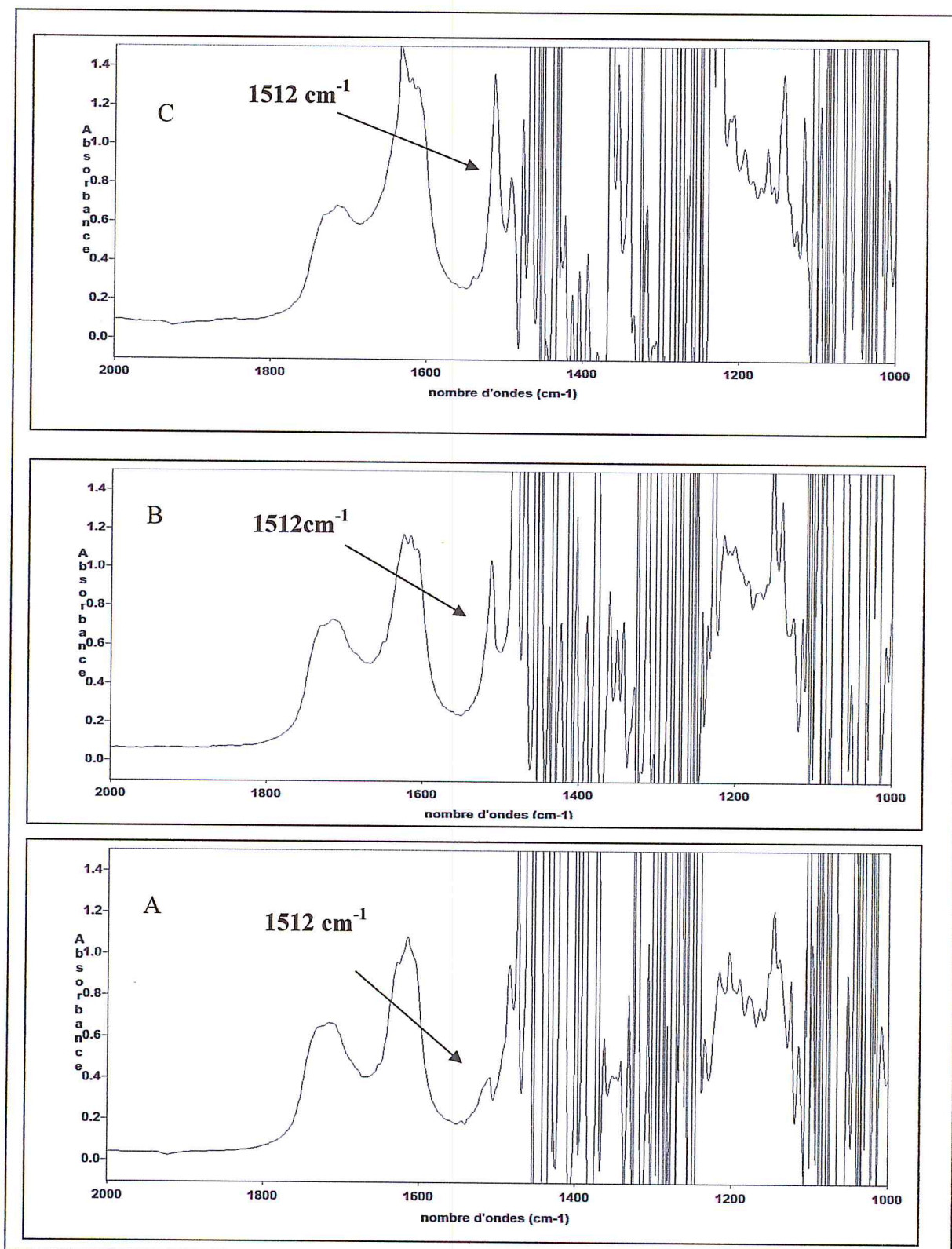


Figure II.14 : Spectres IRTF de l'extrait traité de la phase moyennement polaire ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) (A), extrait traité avec ajout de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'hydroquinone (B), et extrait traité avec ajout de $3\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'hydroquinone (C).

II.4.6. Détermination des méroditerpènes à noyau hydroquinonique polaires de l'algue brune *cystoseira stricta*

II.4.6.1. Par la méthode de calibration externe

Les méroditerpènes à noyau hydroquinonique polaires récupérés dans la phase polaire (H₂O/MeOH) récupérée à partir d'extrait ayant subi le traitement décrit dans la section II.4.5.1 sont analysés par spectrométrie IRTF, les Spectres IRTF comparatifs de l'extrait brut et de l'extrait traité de la phase polaire (H₂O/MeOH) sont montrés sur la figure II.15.

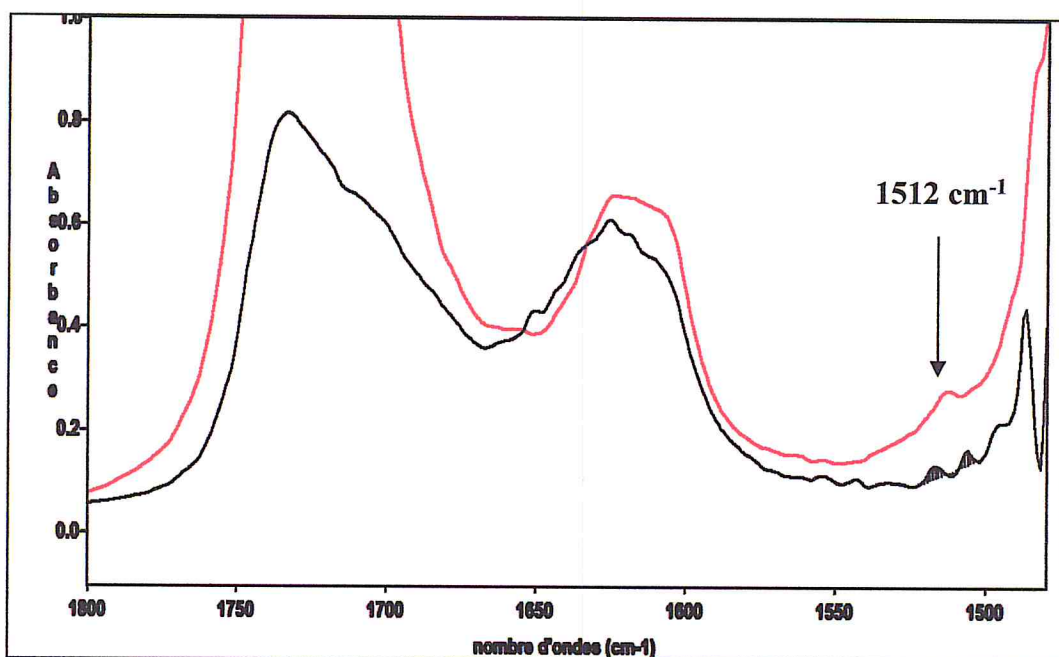


Figure II.15 : Spectres IRTF comparatifs de l'extrait brut (rouge) et de la phase polaire (H₂O/MeOH) obtenus après traitement de l'extrait (noir).

Le contenu des méroditerpènes à noyau hydroquinonique polaires de l'algue brune *cystoseira stricta* est obtenue en extrapolant les valeurs d'absorbance dans la droite de calibration établie pour l'hydroquinone traitée de la même façon que les échantillons réels.

Les résultats sont résumés dans le tableau II.7 et montrent un contenu des méroditerpènes à noyau hydroquinonique polaires de 2.8 eg/g.

Tableau II.7 : Taux de méroditerpènes à noyau hydroquinonique polaires dans l'extrait de l'algue brune *cystoseira stricta* déterminé par calibration externe.

Quantité de l'extrait (mg)	Aire de pic à 1512cm ⁻¹	Concentration (mg.ml ⁻¹)	Taux (eg/g)*
100.7	0.10231± 0.01804	0.28	2.8

*eg de méroditerpènes à noyau hydroquinonique dans 1g d'extrait

II.4.6.2. Par la méthode des ajouts standards

Dans ce cas la méthode des ajouts standards n'a pas donné un bon résultat ceci est dû probablement aux erreurs de manipulation qui deviennent importantes pour les faibles concentrations. Cependant, l'amélioration des résultats est possible par la réalisation d'autres répliques comme l'illustre la figure II.16.

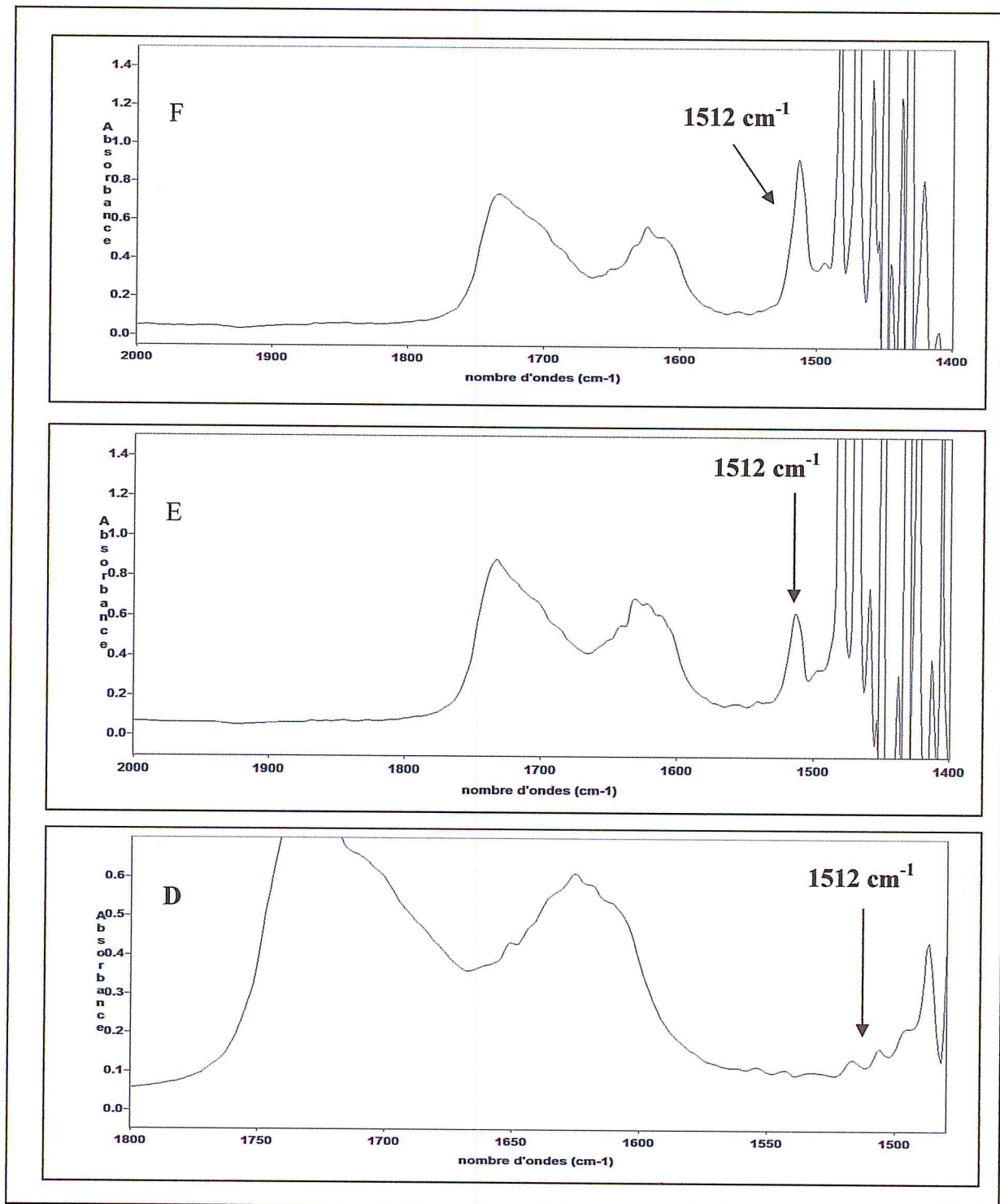


Figure II.16 : Spectres IRTF comparatifs de l'extrait traité de la phase polaire (H₂O/MeOH) (D), extrait traité avec ajout de 1mg.ml⁻¹ d'hydroquinone (E), et extrait traité avec ajout de 3mg.ml⁻¹ d'hydroquinone (F).

Le tableau II.8 résume les résultats de la détermination des méroditéropènes à noyau hydroquinonique dans l'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta* après traitement par spectrométrie IRTF.

Tableau II.8 : Détermination des méroditéropènes à noyau hydroquinonique dans l'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta* après traitement.

Méroditéropènes à noyau hydroquinonique	Taux par calibration externe (eg/g)*	Taux par ajout standard (eg/g)*
polaires	2.8	/
moyennement polaires	4.0± 0.1[‡]	5.8

*eg de méroditéropènes à noyau hydroquinonique dans 1g d'extrait

‡valeur moyenne ± déviation standard de deux mesures indépendantes

Le taux des méroditéropènes à noyau hydroquinonique obtenu est en accord avec ceux trouvés dans la documentation pour quelques méroditéropènes à noyau hydroquinonique et qui sont déterminés par chromatographie liquide à haute performance en phase normale (CLHP) [35].



**Conclusion
générale**

Conclusion

Notre mémoire a été focalisé au dosage spécifique de deux fractions des méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaire et polaire d'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta* par la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).

Les méroditerpènes à noyau hydroquinonique sont analysés globalement sous forme d'hydroquinone en exploitant la bande spécifique à 1512cm^{-1} caractéristique de la vibration du groupement C=C du noyau hydroquinonique. Il a été vérifié que les paramètres analytiques sont meilleurs en considérant les valeurs de l'aire de la bande à 1512cm^{-1} au lieu des valeurs de la hauteur du pic. Les valeurs d'absorbances sont corrigées avec une ligne de base stabilisée entre 1500 et 1530cm^{-1} et en considérant le background du blanc analytique.

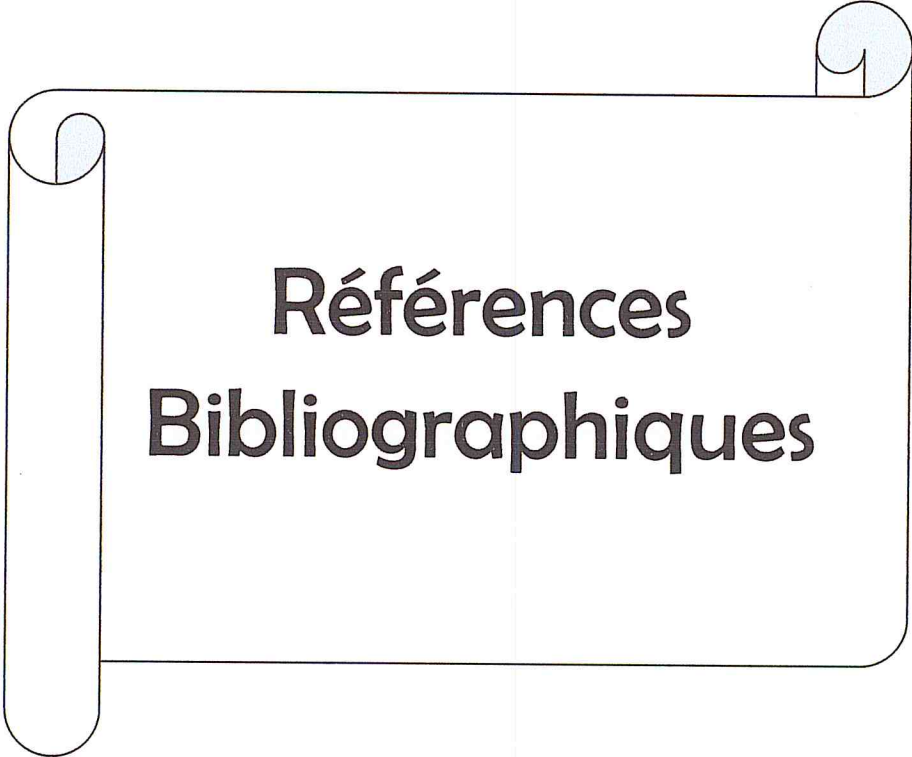
Le taux des méroditerpènes à noyau hydroquinonique moyennement polaires est de 4.0 eg/g obtenu par la méthode de calibration externe est de même ordre que celui obtenu par la méthode des additions standards et qui est de 5.8 eg/g .

Le taux des méroditerpènes à noyau hydroquinonique polaires a été déterminé par contre seulement par la méthode de calibration externe (2.8 eg/g). Cependant la méthode des additions standards a donné des résultats erronés mais l'allure des spectres obtenue laisse croire que des répliques supplémentaires améliorent les résultats.

Le taux des méroditerpènes à noyau hydroquinonique obtenu est en accord avec ceux trouvés dans la documentation pour quelques méroditerpènes à noyau hydroquinonique et qui sont déterminés par chromatographie liquide à haute performance en phase normale (CLHP) [35].

Suite aux résultats obtenus, la méthode développée, pour la détermination de méroditerpènes à noyau hydroquinonique de l'extrait lipidique de l'algue brune *cystoseira stricta* par spectrométrie IRTF, est rapide et fiable.

Il reste évident que cette étude n'est que préliminaire, des expériences complémentaires pour l'optimisation des paramètres d'extraction et spectraux sont indispensables.



**Références
Bibliographiques**

Références bibliographiques

- [1] S. Moussoukhoye, «Détermination structurale de biomolécules polaires isolées d'organismes marins de la côte sénégalaise», Thèse de doctorat, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, (2003).
- [2] T. Ainane, «Valorisation de la biomasse algale du Maroc : Potentialités pharmacologiques et Applications environnementales, cas des algues brunes *Cystoseira tamariscifolia* et *Bifurcaria bifurcata*», Thèse de doctorat, Université Hassan II Casablanca, Maroc, (2011).
- [3] Y. Viano, «Recherche de molécules non-toxiques actives en antifouling à partir d'organismes marins de Méditerranée», Thèse de doctorat, Université du Sud Toulon-Var, France, (2010).
- [4] A.S. Carlsson, J.B. V. Beilen, R. Möller, D. Clayton, «Micro and macro algae utility for industrial application», Epobio project, (2007).
- [5] P. Rajasulochana, R. Dhamocharan, P. Krishnamoorthy, S. Murugesan, «Antibacterial Activity of the Extracts of Marine Red and Brown Algae», Journal of American Science, 5 (3), 20-25, (2009).
- [6] A.A. El Gamal, «Biological importance of marine algae», Saudi Pharmaceutical Journal, 18, 1-25, (2010).
- [7] E. D'agnolo, R. Rizzo, S. Paoletti, E. Murano, «R-Phycoerythrin from red algae *Gracilaria longa*», Phytochemistry, Vol, 35, N°3, pp 693-696, (1994).
- [8] H. G. Mautner, «The chemistry of brown algae», University of California, San Francisco.
- [9] C. Cheseau, «Analyse des huiles essentielles de l'algue brune *fucus vesiculosus* de la côte nord du Saint-Laurent», Université du Québec, UQAC, (1988).

- [10] T. A. Davis, B. Volesky, A. Mucci, «A review of biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae», *Water research*, 37, 4311-4330, (2003).
- [11] N. Bouzidi, «Détermination des stérols de l'algue rouge *Asparagopsis Armata* par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier en employant l'EPS : Etude comparative avec la chromatographie liquide à haute performance», mémoire de magister, USTDB, Algérie, (2003).
- [12] H.S. Al Easa, J.M. Kornprobs, A. M. Rizk, «Major Stérol composition of some brown algae from Qatar», *Phytochemistry*, Vol 39, N°2, pp 373-374, (1995).
- [13] Z. Aliche, Contribution à l'étude chimique des extraits lipidiques et fractions volatiles de l'algue brune *cystoseira sédoïdes*», Mémoire de magister, USTDB, Algérie, (2008).
- [14] V. Amico, «Marine brown algae of family cystoseiraceae: chemistry and chemotaxonomy», *Photochemistry*, Vol 39, N°36, pp 1257-1279, (1995).
- [15] E.M. Balboa, E. Conde, A. Moure, E. Falque, H. Dominguez «In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae», *Food chemistry*, 138, 1764-1785, (2012).
- [16] F. Breton, S. Cérantola, E. Ar Gal, «Distribution and radical scavenging activity of phenols in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae)», *Journal of experimental marine biology and ecology*, 399, 167-172, (2011).
- [17] R. Koivikko, «Brown algal phlorotannins improving and applying chemical methods», Department of chemistry, university of Turku, Finland, (2008).
- [18] S. Parys, S. Kehraus, A. Krick, K.W. Glombitza, S. Carmeli, K. Klimo, C. Gerhäuser, G. M. König, «In vitro chemopreventive potential of fucophloretols from the brown alga *Fucus vesiculosus* L. by anti-oxidant activity and inhibition of selected cytochrome P450 enzyme», *Phytochemistry* 71, 221-229, (2010).
- [19] N. V. Thomas, S. Kim, «Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae», *Environmental toxicology and pharmacology*, 32, 325-335, (2011).

- [20] M. Oswald, «Déterminisme génétique de la biosynthèse des terpénols aromatiques chez la vigne», Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur Strasbourg, (2006).
- [21] P. Reddy, S. Urban, «Meroditerpenoids from the southern Australian marine brown alga *Sargassum fallax*», *Phytochemistry*, 70, 250-255, (2009).
- [22] V. Amico, G. Oriente, M. Piatteli, G. Ruberto, C. Tringali, «Novel acyclic diterpenes from the brown algae *cystoseira crinita*», *Photochemistry*, Vol 20, N°5, pp 1085-1088, (1981).
- [23] R. Valls, L. Pioveti, «The chemistry of the cystoseiraceae (Fucales, pheophyceae): Chemotaxonomic relationships», *Biochemical systematic and ecology*, Vol 23, N°7/8, pp 723-745, (1996).
- [24] M. Pellegrini, R. Valls, L. Pellegrini, «Chimiotaxonomie et marqueurs chimiques dans les algues brunes», *Lagascalia*, 19(1-2) :145-164, (1997).
- [25] V. Amico, M. Piatteli, P. Neri, G. Berto, «Meroditerpenoids from *cystoseira SPP*», University of Catania, Italy, (1988).
- [26] V. Mesguiche, R. Valls, L. Pioveti, B. Banaigs, «Meroditerpenes from *cystoseira Amentacea Var stricta* collected off the Mediterranean coasts», *Photochemistry*, Vol 45, N°7, pp 1489-1494, (1997).
- [27] A. Bennamara, A. Abourriche, M. Berrada, M. Charrouf, N. Chaib, M. Boudouma, F.X. Garneau, «Methoxybifurcarenone: an antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown algae *cystoseira tamarisifolia*», *Phytochemistry*, 52, 37-40, (1999).
- [28] A. Praud, R. Valls, L. Pioveti, B. Banaigs, J.Y. Benaim, «Meroditerpenes from the brown algae *cystoseira crinita* of the French Mediterranean coasts», *Phytochemistry*, 40, N°2, pp 495-500, (1995).
- [29] M. Daoudi, S. Bakkas, G. Culioli, A. Ortalo-Magné, L. Pioveti, M.D. Guiry, «Acyclic diterpenes and sterols from the genera *bifurcaria* and *bifurcariopsis*

(Cystoseiraceae), phaeophyceae», Biochemical systematics and ecology, 2997-3978, (2001).

[30] E. Ballesters, B. Hereu, E. Cebrian, B. Weitzmann, L. Navarro, «Rapport mission Scandola *Cystoseira*», Université de Barcelon, (2010).

[31] R. Valls, L. Pioveti, A. Praud, «The use of diterpenoids as chemotaxonomic markers in the genus *Cystoseira*», Hydrobiologia, 260/261: 549-556, (1993).

[32] V. Amico, G. Orient, P. Neri, M. Piattelli, G. Ruberto, «Tetraprenyltoluquinols from the brown algae *cystoseira stricta*», Phytochemistry, Vol, 26, N°6, pp 1715-4718, (1987).

[33] V. Amico, M. Piattelli, «Two epimeric, irregular diterpenoid toluquinols from the brown alga *cystoseira stricta*», Journal of Natural Products, Vol.52, No.5, pp 962-969, (1989).

[34] L & M. Pelligrini, «Contribution à l'étude biochimique des Cystoseiracees Mediterraneennes I *Cystoseira stricta* (Mont.) Sauvageau», Botanica Marina, Vol, XIV, pp 6-16, (1971).

[35] L. Pioveti, P. Deffo, «Determination of sterols and diterpenoids from brown algae (*cystoseiraceae*) », Journal of Chromatography, 588, 99-105, (1991).

[36] V. Amico, F. Cunsolo, M. Piattelli «Stictaketol, a new tetraprenyltoluquinol with a heterotetracyclic diterpene moiety from the brown alga *cystosira stricta*», Journal of Natural Products, Vol.50.N°3, pp 449-454, (1987).

[37] R. Valls, V. Mesguiche, L. Pioveti, M. Prost, G. Peiffer, «Meroditerpenes from the brown algae *cystoseira amentacea var. stricta* collected off the Mediterranean coast», Phytochemistry, Vol 41, N°5, pp 1367-1371, (1996).

[38] L. Benezzeddine-Boussaidi, G. Cazorla, C-Y. Guezennec, E. Fantena, P. Burnat, «Contrôle biologique de l'entraînement sportif par spectrométrie IR-TF», science & sports 23 :283-291, (2008).

- [39] C. Petibois, G. Délérís, G. Cazorla, «Nouvelles perspectives pour le suivi biologique des sportifs 1.L'analyse métabolique par spectrométrie IR-TF», *Science & Sport*, 15 : 95-7, (2000).
- [40] M. Dubernet, « Analyse instantanée de la qualité des raisins et des mouts par IRTF », France, (2002).
- [41] «Méthodes spectrométriques d'analyse et de la caractérisation», Génie des Procédés, centre SPIN, Ecole des Mines de Saint-Etienne.
- [42] G. Burgot, J.L. Burgot, «Méthodes instrumentales d'analyse chimique et application ; Méthodes chromatographiques électrophorèses et méthodes spectrales», Edition Tec &Doc, Paris, France, (2002).
- [43] S. Mjos ,B. Grung, «Evaluation of Extraction Methods for Recovery of Fatty Acids from Marine Products», Master thesis of EMQAL project, University of Bergen, (2010).
- [44] N. El Hattab, Y. Daghbouche, M. El Hattab, L. Piovetti, S. Garrigues, M.de la Gardia, «FTIR-determination of sterols from the red alga *Asparagopsis armata*: Comparative studies with HPLC», *Talanta* ,68, 1230-1235,(2006).
- [45] N. El Hattab, Y. Daghbouche, M. El Hattab, Z. Aliche, G.Culioli, L. Piovetti, S. Garrigues, M.de la Gardia, «Determination of total sterols in brown algae by Fourier transform infrared spectroscopy», *analytica chimica acta*, 616, 185-189, (2008).