

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Laboratoire des substances naturelles et biomolécules

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière
Filière : Chimie
Option : Chimie des Produits Naturels

Titre

**DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE DE CALIBRATION
MULTIVARIÉE PAR SPECTROSCOPIE FTIR POUR LA
DÉTERMINATION DES PHÉNOLS DANS DES MATRICES
NATURELLES DIVERSES.**

Mémoire présenté par :

DERBALA Rofeida

GHOURI Loudjaine



Soutenu publiquement le 10 Juillet 2018 devant le jury composé de :

Y. Daghbouche	Pr	Présidente	Université Blida 1
G. Ziane	MAA	Co-promotrice	Université Blida 1
N. Bouzidi	MCA	Promotrice	Université Blida 1

Promotion 2017-2018

REMERCIEMENTS

*On dit souvent que le trajet est aussi important que la destination.
Les cinq années d'étude nous ont permis de bien comprendre la signification
de cette phrase toute simple.
Ce parcours, en effet, ne s'est pas réalisé sans défis et sans soulever de nombreuses
questions pour lesquelles les réponses nécessitent de longues heures de travail.
A priori, on commence par rendre grâce à DIEU qui nous a donné la santé, la force
et les moyens nécessaires pour mener à terme ce travail et pour les heures de
courage, de patience et de sagesse qu'il nous a inspiré.
Que sa bénédiction et sa protection accompagnent tous nos actes dans
ce monde ici-bas.*

*Nos remerciements vont droit à Dr. Bouzidi, vous nous avez fait confiance en
acceptant de nous guider dans la réalisation de ce mémoire qui est d'ailleurs le
votre. Vos remarques et suggestions ont sans doute contribué à l'amélioration
de la qualité de ce travail.
Permettez- nous cher Maîtresse, de vous exprimer à travers ce travail tout notre
respect et notre profonde gratitude.*

*Membres de jury, on vous remercie pour l'honneur que vous nous faites en
acceptant de siéger dans ce jury malgré vos multiples occupations.
Trouvez ici un accomplissement satisfaisant.*

*Nous sommes reconnaissantes à Mlle. Nachida Bensemmane de nous donner
l'opportunité de vivre une expérience aussi enrichissante tout sur le plan humain
que professionnel.*

DEDICACE

Ce travail est le fruit d'une « aventure », qui n'aurait pas pu voir le jour sans le soutien de nombreuses personnes que je tiens à leur dédier ce travail.

Mes premiers mots vont à mes chers parents, sensibles au devenir de leurs enfants, pour leur sens élevé du devoir et leur souci de travail bien fait, pour leur soutien et appui moral, matériel et financier qui ne m'ont jamais fait défaut.

Puisse ALLAH m'aider à vous satisfaire d'avantage par ce modeste travail que je souhaite qu'il couronne vos sacrifices.

*A ma chère sœur ZINOUBA, son mari AMAR et leur petite adorable fillette
YASMINE.*

A mes chères sœurs IMEN et ANFEL

A mes chers frères AYOUB et IHEB

*Que DIEU nous garde toujours unis par cette image de fraternité accomplie dans sa
totalité.*

*A l'ensemble de la famille DERBALA et SAIDANI surtout mes deux chères
cousines AMINA et BOUCHRA.*

*Je suis reconnaissante à ma chère binôme GHOURI LOUDJAINÉ, pour les
merveilleux moments de découverte, de compréhension mutuelle et pour sa sincère
amitié. Merci d'avoir décidé de faire la route avec moi, je te remercie également
pour la sympathie dont tu m'as témoigné.*

*Mes années d'étude n'auraient pas été si mémorables sans la compagnie de mes
amies SARA, FIFI, NESRINE, IMENE, CELIA, CAMY, SAFAA, ZAHRA,
CHICHI et AMINA.*

*J'espère que les liens tissés par ces années seront solides et que le temps ne viendra
pas à bout de cette si forte et belle amitié qui nous unit.*

*J'aimerais inventer un mot assez fort pour quatre chères personnes : KHEIRA
HEDJOUJJE, OUMEIMA EL MEGHERBI, AMINA YAHYI et AYOUB TOUMI,
pour qu'elles n'aient jamais de doute
à ce que je ressens pour eux.*

*Merci de m'avoir donné le goût de l'effort et de m'avoir appris qu'aucune vague
n'est insurmontable, le temps qui passe n'efface aucun de mes souvenirs radieux
avec vous, à nous d'écrire la suite.*

ROFY





Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes parents... Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour, dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A l'ensemble de la famille Ghouri et Saçi.

A ma source de joie et de bonheur mon Fiancé Kesri Fayçal Abd Rahim merci de m'avoir remonté le moral quand je trouvais ça difficile. Et sans oublier ma belle famille je vous aime beaucoup.

A mes chères jolies sœurs Nermine et Nadine . Pour leurs soutiens Qu'ALLAH vous assiste et vous réserve une vie pleine de succès et de bonheur.

A mon binôme et chère amie très précieuse Derbala Rofeida.

A mes amies et mes camarades.

A tous ceux qui aiment la science.

LOUDJAINÉ.

Table des matières

Page

Résumés (arabe, anglais, français).

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Liste des abréviations.

Introduction générale.

Chapitre I : Synthèse bibliographique sur les clous de girofle

Introduction.....	1
I.1. Histoire de l'épice	2
I.2. Etude de la plante	3
I.2.1. Description botanique du giroflier	3
I.2.1. a) Classification	3
I.2.1. b) Description de l'arbre	3
I.3. Les principales zones de production	4
I.4. Huile essentielle du clou de girofle	5
I.4.1. Définition d'une huile essentielle	5
I.4.2. Propriétés physiques des huiles essentielles	5
I.4.3. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	5
I.4.3. a) Distillation.....	6
I.4.3. a-1) Hydrodistillation	6
I.4.3. a-2) Entraînement par vapeur d'eau	7
I.4.3. a-3) Distillation par les solvants organiques	7
I.4.3. b) Extraction par micro-ondes	8
I.4.3. c) Extraction par ultra-sons	8
I.4.3. d) Enfleurage	8
I.4.3. e) Expression à froid	9
I.4.3. f) Co2 supercritique	10
I.4.4. Composition chimique d'huile essentielle du clou de girofle	10

Chapitre II : Application de la chimométrie à la spectroscopie IRTF

Introduction.....	12
II.1. Spectroscopie infrarouge	12

II.2. Principe de fonctionnement des spectromètres infrarouges à transformé de fourier	13
II.3. Méthodes d'analyse	14
II.3.1. Méthodes de transmission	14
II.3.2. Méthodes de réflectance	15
II.4. Analyse spectrale	15
II.5. Loi de Beer-Lambert et concentration	16
II.6. Principe de l'analyse quantitative	16
II.7. Méthodes de calibrage chimométrique des spectrophotomètres	17
II.8. Analyse par régression aux moindres carrés partiels	18
II.9. Généralité sur les composés phénoliques	21
Chapitre III : Étude expérimentale	
Introduction.....	23
III.1. Appareillages et réactifs	23
III.1.1. Spectrophotomètre Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	23
III.1.2. Réactifs et produits chimiques	25
III.1.3. Choix des étalons et du solvant	25
III.2. Calibration PLS multicomposante	27
III.2.1. Définition de la méthode Quant 2	27
III.2. 2. Optimisation des modèles PLS (Quant 2)	27
III.2.2. a) Préparation de la matrice de calibration	28
III.2.2. b) Préparation de la matrice de validation de méthode	29
III.2. 3. Étapes de la création d'une méthode Quant 2	30
III.2. 4 Paramètres analytiques fournis par le logiciel	32
III.2. 5. Paramètres d'optimisation des modèles mathématiques	35
III.2.6. Détermination des concentrations des mélanges synthétiques par calibration interne (Test du set de validation)	42
III.3. Origine et identification des clous de girofle	49
III.3.1. Préparation de l'huile essentielle et de l'extrait des clous de girofle	49
III.3.1. a préparation de l'huile essentielle par hydrodistillation	49
III.3.1. b. Préparation de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur.....	52
III.3.1. c. Préparation de l'extrait	53

III.4. Analyse des extraits par PLS-FTIR	55
<i>III.4.1. Détermination des composés phénoliques dans l'huile essentielle et l'extrait</i>	55
<i>III.4.1. a. Dilution directe dans le solvant et analyse par calibration externe</i>	55
<i>III.4.1. b. Résultats d'analyse et interprétation</i>	55

Conclusion générale.

Références bibliographiques.

Liste des figures

	Page
Figure I.1 : Le giroflier.	4
Figure I.2: Les principales zones de production des clous de girofle (données 2007).	4
Figure I.3 : Modes d'extraction des huiles essentielles.	6
Figure I.4 : Schéma d'un montage d'hydrodistillation.	6
Figure I.5 : Schéma d'un montage d'entraînement à la vapeur d'eau.	7
Figure I.6 : montage d'extraction par micro-onde.	8
Figure I.7 : Montage d'une extraction par ultrasons	8
Figure I.8 : Méthode d'enfleurage.	9
Figure I.9 : Méthode d'expression à froid.	9
Figure I.10 : Principe d'une extraction par Co2 supercritique.	10
Figure II.1 : Composants de base d'un spectromètre IRTF.	13
Figure II.2 : Schéma d'un interféromètre de Michelson.	14
Figure II.3 : Modèle d'interférence enregistré avec une cellule vide.	15
Figure III.1 : Montage IRTF utilisé pour l'analyse des solutions en mode écoulement bloqué.	24
Figure III.2 : Spectres IRTF en phase liquide de l'eugénol (en bleu), l'acétate d'eugényle (en rouge), l'acide <i>salicylique</i> (en mauve) et l'acide cinnamique (en vert).	26
Figure III.3 : Fenêtre du Quant 2 d'OPUS 6.5.	27
Figure III.4 : Étapes de travail numérotées suivies dans la fenêtre de configuration.	28
Figure III.5 : Étapes à suivre lors de l'optimisation.	31
Figure III.6 : Exemple de représentations graphiques des paramètres analytiques d'un composé chimique en fonction de <i>RMSECV</i> .	32
Figure III.7 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'acide <i>cinnamique</i> .	34
Figure III.8 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'acide <i>salicylique</i> .	46
Figure III.9 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'acétate d'eugényle.	47
Figure III.10 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'eugénol.	48
Figure III.11 : Aspect macroscopique des clous de girofle.	49
Figure III.12 : Protocole d'extraction de l'huile essentielle à partir des clous de girofle.	51

- Figure III.13 :** Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau. 52
- Figure III.14 :** Protocole d'extraction de l'extrait à partir des clous de girofle. 54
- Figure III.15 :** Spectres IRTF des trois huiles essentielles et de l'extrait de concentration 33.33 mg.ml⁻¹ dilués dans le CH₂Cl₂, avec l'huile essentielle (éther) bleu, l'huile essentielle (cyclohexane) vert l'huile essentielle (entraînement à la vapeur) en mauve, et l'extrait (soxhlet) en rouge (1) et spectres des quatre étalons de concentration de 10 mg.ml⁻¹ (2) voir figure III.2. 56

Liste des abréviations

ATR :	Attenuated Total Reflectance (Réflectance totale atténuée).
°C :	Degré celcius.
CH₂Cl₂ :	Diclorométhane.
CLS :	Classical Least-Squares (Moindres carrés classique).
cm :	Centimètre.
CO₂ :	Dioxyde de carbone.
DTGS :	Deuterium Tryglycine Sulfate (Sulfate triglicine deutéré).
Eq :	Equation.
FTIR :	Fourier-Transform Infrared (Infrarouge à transformée de Fourier).
g :	Grammes.
GC-MS :	Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Chromatographie gazeuse-Spectrométrie de masse).
HE :	Huile essentielle.
HPLC :	High-Performance Liquid Chromatography. (Chromatographie liquide à haute performance).
ILS :	Inverse Least-Squares (Moindres carrés inverse).
MCT :	Tellurure de mercure-cadmium.
mg.ml :	Milligrammes par millilitre.
PCR :	Principal Component Regression (Régression du composante principale).
PIR :	Rayonnement dans le proche infrarouge.
PLS :	Partial Least Squares (Moindres carrés partiels « MCP »).
R² :	Rang.
RMECV :	Root Mean Square Error of Cross Validation (Erreur quadratique moyenne de validation croisée).
RMSEE :	Root Mean Square Error of Estimation (Erreur quadratique moyenne d'estimation).
RMSEP :	Root Mean Square Error of Prediction (Erreur quadratique moyenne de prédiction).
SPIR :	Spectroscopie dans le proche infrarouge.
µm :	Micromètre.
% :	Pourcentage.

Liste des tableaux

	page
Tableau I.1 : Classification du giroflier	3
Tableau II.1 : Quelques composés phénoliques existants chez les clous de girofle.	22
Tableau III.1 : Réactifs et produits chimiques utilisés.	25
Tableau III.2 : Composition des solutions étalons (matrice de calibration).	29
Tableau III.3 : Composition des mélanges synthétiques (matrice de validation).	29
Tableau III.4 : Rapport de validation fourni par le logiciel Quant 2.	34
Tableau III.5 : Résultats d'optimisation, de calibrage et de validation de l'acide <i>cinnamique</i> .	36
Tableau III.6 : Résultats d'optimisation, de calibrage et de validation pour l'acide salicylique.	37
Tableau III.7 : Résultats d'optimisation, de calibrage et de validation de l'acétate d'eugényle.	39
Tableau III.8 : Résultats d'optimisation, de calibrage et de validation pour l'eugénol.	41
Tableau III.9 : Résultats de calibrage pour l'acide cinnamique.	43
Tableau III.10 : Résultats de calibrage pour l'acide salicylique.	43
Tableau III.11 : Résultats de calibrage pour l'acétate d'eugényle.	44
Tableau III.12 : Résultats de calibrage pour l'eugénol.	44
Tableau III.13 : Rendement de l'extraction.	52
Tableau III.14 : Rendement de l'extraction.	53
Tableau III.15 : Rendement de l'extraction.	55
Tableau III.16 : Résultats de prédiction et teneurs des composés phénoliques et de la fraction phénolique dans les huiles essentielles et l'extrait.	57

ملخص

الهدف المراد من هذا العمل كان تنفيذ وتطوير طريقة معايرة متعددة المركبات PLS باستعمال مطيافية الـ FTIR من أجل التحديد المتزامن للمركبات الفينولية حمض السيناميك، حمض الساليسيليك، الأوجينول و اليوجينيل أسيتات في أربع مستخلصات مختلفة للقرنفل في الزيت العطري و مستخلص القرنفل من خلال استغلال إعدادات البرنامج المدمج "Quant 2" الـ OPUS 6.5، ما يتيح معالجة نطاقات ما تحت حمراء متداخلة.

لأجل بناء نماذج المعايرة متعددة المركبات، استخدم ستة عشر محلولاً قياسياً عند مستويين من التراكيز تحوي المركبات الأربع وهي حمض السيناميك، حمض الساليسيليك، الأوجينول و يوجينيل أسيتات.

تم دراسة مختلف عوامل التحسين خلال النمذجة، وتتمثل في نطاقات التحسين، خيار المعالجة المسبقة للأطياف، المجالات الطيفية ورتبة النموذج.

وكشفت نتائج التنبؤ بأن نماذج الـ PLS-FTIR كانت ملائمة من أجل التحديد المتزامن للمركبات الأربع بتقديم أخطاء تحليلية $0.015 > RMSEP > 0.084$ و $0.009 > RMSEE > 0.060$ مع معاملات تحديد مناسبة $(96 > R^2 > 99.81)$.

الكلمات المفتاحية: القرنفل (*Syzygium aromaticum*) ، حمض السيناميك، حمض الساليسيليك، الأوجينول، يوجينيل أسيتات، المعايرة متعددة المركبات ، PLS-FTIR...

Abstract

The aim of this work was to carry out and develop, a multicomponents calibration method PLS applied to FTIR spectroscopy for the simultaneous determination of phenolic compounds cinnamic acid, salicylic acid, eugenol, eugenyl acetate in essential oil and extract of clove. Using the parameters of the “Quant 2” integrated software of OPUS 6.5, allowing the treatment of overlapping infrared bands.

To build the multicomponents calibration models, sixteen standard solutions containing the four analytes, namely: *cinnamic* acid, salicylic acid, eugenole, eugenyl acetate at two levels of concentrations were used.

Various optimization parameters were studied during the modeling, quoting: optimization ranges, spectral preprocessing option, spectral regions and ranks of the model.

Prediction results revealed that PLS-FTIR models were adequate for the simultaneous determination of the four analytes by providing analytical errors $0.015 < RMSEP < 0.084$ and $0.009 < RMSEE < 0.060$ with convenient coefficients of determination ($99.97 > R^2 > 96$).

Keywords: clove (*syzygium aromaticum*), cinnamic acid, salicylic acid, eugenol, eugenyl acetate, Multicomponents calibration, PLS-FTIR,,,

Résumé

L'objectif assigné à ce travail était de réaliser et de développer une méthode de calibration multicomposée PLS appliquée à la spectroscopie IRTF pour la détermination simultanée des composés phénoliques l'acide cinnamique, l'acide salicylique, l'eugénol et l'acétate d'eugényle dans l'huile essentielle et l'extrait de clous de girofle en exploitant d'avantage les paramètres du logiciel intégré « Quant 2 » d'OPUS 6.5, permettant le traitement des bandes infrarouge chevauchées.

Pour construire les modèles de la calibration multicomposée, seize solutions étalons contenant les quatre analytes à savoir l'acide cinnamique, l'acide salicylique, l'eugénol et l'acétate d'eugényle à deux niveaux de concentrations ont été utilisés.

Différents paramètres d'optimisation ont été étudié lors de la modélisation, on cite : les gammes d'optimisation, l'option de prétraitement spectral, les régions spectrales et les rangs du modèle.

Les résultats de la prédiction ont révélé que les modèles PLS-FTIR étaient adéquats pour la détermination simultanée des quatre analytes en fournissant des erreurs analytiques $0.084 > RMSEP > 0.015$ et $0.060 > RMSEE > 0.009$ avec des bons coefficients de détermination ($99.81 > R^2 > 96$).

Mots-clés : clous de girofle (*Syzygium aromaticum*), Acide cinnamique, Acide salicylique, Eugénol, Acétate d'eugényle, Calibration multi variée, PLS-FTIR,,



INTRODUCTION
GENERALE.

Introduction générale

La chimie analytique peut être définie comme l'étude des méthodes physiques et chimiques de l'analyse chimique. D'ailleurs, l'encyclopédie universelle définit la chimie analytique comme suit : « *la chimie analytique est la branche de la chimie qui a pour but l'identification, la caractérisation, et la quantification des substances chimiques ainsi que le développement des méthodes nécessaires à cette analyse. Elle s'intéresse également à la compréhension des phénomènes mis en jeu dans les processus et les techniques d'analyse afin de pouvoir sans cesse les améliorer* ».

Les spectroscopies optiques, en exploitant les interactions entre la matière et la lumière, permettent d'obtenir la composition chimique et de caractériser les propriétés physiques et chimiques d'échantillons selon la gamme spectrale utilisée.

Dans l'infrarouge, les niveaux vibrationnels sont sondés pour caractériser aussi bien les groupements chimiques constituant l'échantillon que la structure moléculaire ou encore les propriétés physiques, d'ordre et désordre, de stress mécanique, optique, etc...

En pratique, les spectromètres actuels dits à transformée de Fourier (FTIR) possèdent des qualités permettant une large gamme de possibilités d'analyse.

La régression des moindres carrés partiels (PLS), qui peut être vue comme une méthode de régularisation basée sur la réduction de la dimensionnalité est la méthode la plus utilisée dans le traitement des données spectroscopiques IRTF.

Depuis plusieurs années, de nombreux produits de phytothérapie sont mis sur le marché, et sous différentes galéniques rendant le choix difficile. La qualité de la plante utilisée : plante fraîche, plante sèche, issue de l'Agriculture Biologique ou non, conditionne sa teneur et sa richesse en actifs. Ces actifs ont été étudiés et reproduits chimiquement pour être incorporés de nos jours dans de nombreux médicaments.

Le clou de girofle est un bouton de fleur séchée originaire d'Indonésie. Épice savoureuse dans nos cuisines, elle cache bien d'autres vertus, notamment pour avoir une meilleure santé.

L'**eugénol** qu'il contient, leur confère en effet ses propriétés médicales.

Le clou de girofle et son huile essentielle ont de nombreuses vertus : antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire, anesthésique...

Ce travail a été effectué au laboratoire de chimie des produits naturels, du département de chimie de la faculté des sciences, Université de Blida 1 a pour but de :

- L'application d'un nouveau logiciel de calibration multi variée PLS, le « Quant 2 ».
- Le développement d'une nouvelle méthode de dosage des phénols dans l'huile essentielle et l'extrait des clous de girofle par spectrométrie IRTF en utilisant les modèles prédictifs optimisés de la calibration PLS.

Ce manuscrit est réparti en trois chapitres :

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique sur les clous de girofle.

Le deuxième chapitre comporte une partie théorique sur les connaissances de bases de cette étude, tout en commençant par la spectroscopie IRTF, la régression par moindres carrés partiels (PLS) et en terminant par des généralités sur les composés phénoliques.

Le troisième chapitre présente une étude expérimentale consacrée à développer ensuite à déterminer, à l'aide du logiciel Quant 2, les bons modèles de calibration multi variée PLS-FTIR pour le dosage des acides phénoliques (l'acide cinnamique et l'acide salicylique), de l'eugénol, et d'un dérivé phénolique (acétate d'eugényle) dans trois différentes huiles essentielles et un extrait.

Nous avons terminé ce mémoire par une conclusion générale qui nous permettra d'avoir des perspectives liées à ce travail

Introduction

Le clou de girofle provient d'une plante appelée giroflier (*Syzygium aromaticum*). Chaque bouton floral de cette plante est un clou de girofle [1].

Le giroflier (*Syzygium aromaticum*) est un arbre de la famille des Myrtaceae qui peut vivre 100 ans. Il est également connu sous d'autres noms : *Caryophyllus aromaticus*, *Eugenia aromatica*, *Eugenia caryophyllata* et *Eugenia caryophyllus*. Le giroflier commence à donner des fruits à l'âge de 5 ou 6 ans mais il s'agit d'une très faible production qu'il vaut mieux ne pas récolter. La première floraison normale se produit vers les 8-10 ans : c'est à partir de ce moment que la production des clous de girofle devient exploitable. Il faut attendre que l'arbre atteigne les 20 ans pour atteindre la pleine production (production optimale).

La principale production de giroflier provient de l'Indonésie, mais les clous de girofle utilisés pour l'alimentation viennent en majorité de Madagascar, ceux de l'Indonésie étant utilisés pour faire des cigarettes, appelées «kreteks» [2].

Le clou de girofle a été utilisé pendant des années dans des préparations dentaires, des bonbons et de la gomme pour sa saveur et sa capacité à promouvoir la santé orale, mais offre aussi une myriade de bienfaits pour la santé. Son composant chimique principal, l'eugénol, en fait une huile essentielle très stimulante et énergisante qui peut favoriser la circulation du sang et bénéficier à la santé cardiovasculaire. Le clou de girofle est un antioxydant puissant qui peut aider à conjuguer les radicaux libres et à maintenir un système immunitaire sain. En raison de sa haute teneur en phénol, la prudence doit être prise lors de l'inhalation directe du clou de girofle et il doit être dilué lorsqu'il est appliqué sur la peau. En tant qu'épice culinaire, le clou de girofle ajoute une saveur épicée à tout plat ou dessert tout en offrant des bienfaits à la santé interne. Une goutte de clou de girofle peut apaiser les dents et les gencives tout en maintenant la santé bucco-dentaire générale [3].

L'essence de girofle contient une forte proportion d'eugénol. L'eugénol 4-allyl-2-méthoxyphénol est un composé aromatique de la famille des phénylpropènes dont les usages sont nombreux. Il sert à la préparation de la vanilline artificielle [4].

Les essences de clous, de griffes, de feuilles et d'anthofles servent également en pharmacie pour la préparation de divers médicaments (propriétés antiseptiques, anesthésiantes), en chirurgie (propriétés bactéricides), en droguerie, en parfumerie, en savonnerie, pour la préparation des pâtes dentifrices, pour la préparation de certaines peintures et vernis [5, 6].

Accessoirement, les anthofles peuvent également être utilisés en confiserie [7]. Les déchets des feuilles cuites peuvent servir de compost favorisant la croissance des bananiers et de la canne à sucre [8].

I.1. Histoire de l'épice

Le mot épice tire son origine du latin *species* qui signifie espèce, substance ou drogue. Il désigne de nombreuses plantes comme le poivre, la cannelle, la vanille, le safran, ou bien le giroflier, possédant toutes des arômes puissants qui stimulent nos perceptions olfactives et gustatives.

Autrefois, une épice était toujours synonyme de denrée rare, de denrée de luxe. Elles étaient vendues au poids de l'or ! Les épices faisaient l'objet de cadeau à la nouvelle année, aux mariages, aux baptêmes, sous forme de confitures ou de dragées. C'est de là que nous vient cette tradition des dragées aux cérémonies.

Nous nous intéresserons plus particulièrement au clou de girofle. Il était très bien connu des Chinois, et cela bien avant l'ère chrétienne. A cette époque, il fallait se rafraîchir l'haleine en mâchant quelques clous « hi-sho-hiang » avant de pouvoir parler à l'Empereur [9].

Par la suite, les commerçants arabes auraient introduit cette épice en Europe au VIIème siècle [10]. Ce serait finalement l'explorateur portugais Serrano qui aurait découvert en 1511 que le giroflier était cultivé sur l'archipel des Moluques en Indonésie et en particulier dans les petites îles de Banda et de Ternate. C'est ainsi que les Portugais acquirent le monopole du commerce des clous de girofle durant près de 100 ans. En 1605, les Hollandais conquièrent l'archipel et afin d'empêcher toute concurrence ils concentrèrent la culture de girofliers sur l'île d'Amboine, une autre petite île de l'archipel [11]. Ce n'est qu'une centaine d'années plus tard, en 1753, que l'arrivée du navigateur français Pierre Poivre fit basculer le monopole hollandais. Les girofliers furent tout d'abord introduits à l'Ile de France (Ile Maurice), puis, suite à l'autorisation de transport des plants en 1772, à l'Ile Bourbon (Ile de la Réunion), la Guyane, St Domingue et la Martinique. Le giroflier fut par la suite introduit à Sainte-Marie en 1827 par la Société Albran-Carayon-Hugot et enfin sur la côte Est de la « Grande Terre » de Madagascar aux alentours de 1900 [12].

I.2. Etude de la plante

I.2.1. Description botanique du giroflier

I.2.1. a) Classification

Tableau I.1 : Classification du giroflier.

Classe	Angiosperme
Sous-classe	Tiporées
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Sous-famille	Myrtoideae
Genre	Syzygium
Espèce	Syzygium aromaticum

Comme beaucoup d'espèces, le giroflier a porté plusieurs noms scientifiques avant d'être nommé *Syzygium aromaticum* :

- *Caryophyllus aromaticus*.
- *Eugenia caryophyllata*.
- *Eugenia caryophyllus*.
- *Eugenia aromatic*.
- *Jambosa caryophyllus*.
- *Syzygium aromaticum*.

Actuellement, les noms *Syzygium aromaticum* et *Eugenia caryophyllus* sont tous les deux employés [13, 14, 15].

I.2.1. b) Description de l'arbre

Cet arbre vivace originaire des Moluques et du sud des Philippines peut atteindre une hauteur de 12 mètres sur un sol perméable et fertile. Mais il supporte mal le froid, et la température ne devrait pas descendre en dessous de 15–18 °C pendant la saison froide.

Le genre comporte quelque 400–500 espèces qui sont à présent également cultivées dans d'autres régions du globe. Les grosses feuilles ovales de jusqu'à 12 cm de long sont disposées par paires opposées.

Les fleurs blanches rosées agréablement parfumées donnent des baies pourpres aromatiques. La multiplication du giroflier s'effectue par semis de graines mures. Les boutons floraux séchés du *Syzygium aromaticum* sont une épice très connue et très appréciée.

Les boutons sont roses à rougeâtres avant d'être séchés et prennent ensuite une teinte brune foncée.

Les espèces les plus fines sont les clous de girofle des Moluques, archipel de l'est d'Indonésie, ainsi que celles de Penang, Zanzibar et Madagascar. Les clous de girofle américains sont réputés être de qualité inférieure à cause de leur plus faible teneur en huile essentielle [16].



Figure I.1 : Le giroflier [16].

I.3. Les principales zones de production

Les principales zones de production des clous de girofle sont les régions de : Sava la plus au Nord, Analanjirofo, Atsinanana, Vatovavy-Fitovinany et celle de Atsimo Atsinanana plus au Sud (figure I.2) [17].

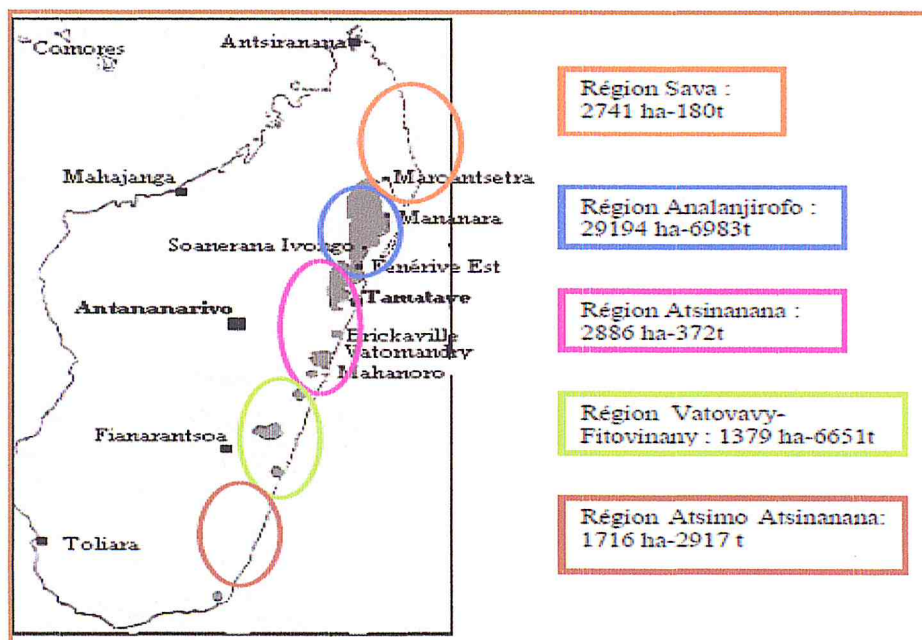


Figure I.2: Les principales zones de production des clous de girofle (données 2007) [17].

I.4. Huile essentielle du clou de girofle

I.4.1. Définition d'une huile essentielle

Nous trouvons différentes définitions d'une huile essentielle dans :

- ❖ La **Pharmacopée européenne 7e édition** qui définit une huile essentielle comme un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage [18].
- ❖ La **Pharmacopée française 11e édition** : Les huiles essentielles médicinales sont des huiles essentielles au sens de la Pharmacopée européenne, possédant des propriétés médicamenteuses [19].

I.4.2. Propriétés physiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles étant des substances volatiles et non des corps gras. Leur volatilité augmente avec la chaleur. Elles sont **insolubles dans l'eau** et solubles dans de l'alcool ou dans un corps gras, leur consistance est huileuse mais non grasse.

Elles sont liquides à température ambiante, leur densité est inférieure à celle de l'eau, sauf exception comme l'HE de giroflier par exemple. Leurs couleurs sont variées, beaucoup sont jaunâtres ou **incolores** mais les couleurs peuvent aller du jaune vert au brun rouge. Elles sont très odorantes [20].

I.4.3. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles de la matière végétale peut être réalisée au moyen de nombreux et divers procédés basés sur des techniques anciennes comme : distillation, expression, enfleurage ou plus récentes comme : extraction par irradiation micro-onde, ou par ultra-sons [21].

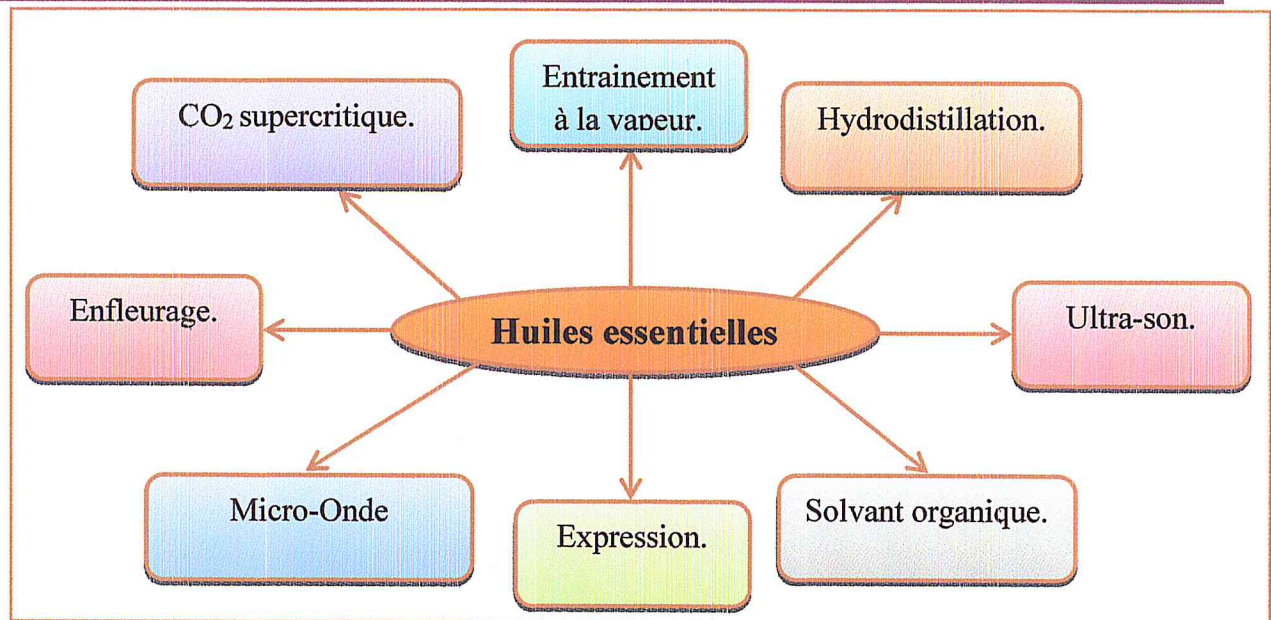


Figure I.3 : Modes d'extraction des huiles essentielles [21].

1.4.3. a) Distillation

1.4.3. a-1) Hydrodistillation

C'est la technique la plus simple et la plus répandue. Elle consiste à immerger la matière première directement dans l'eau, puis l'ensemble est porté à ébullition. L'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. Les vapeurs formées sont condensées par un système de réfrigération par courant d'eau [22].

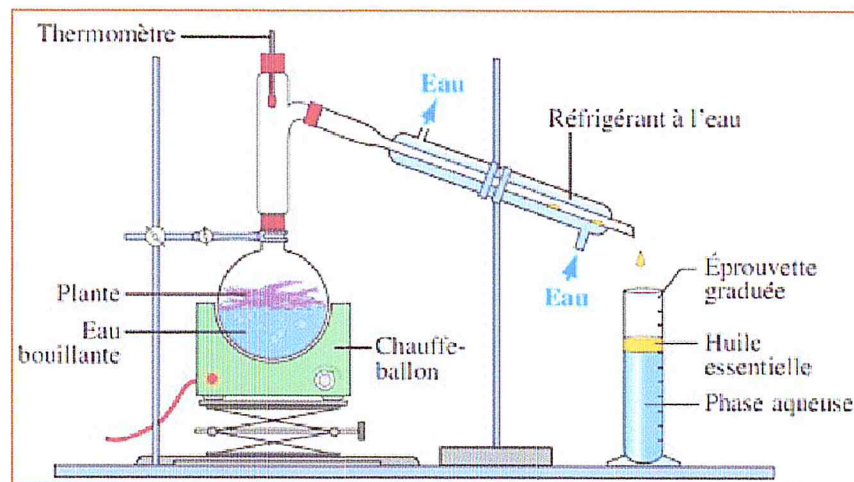


Figure I.4 : Schéma d'un montage d'hydrodistillation [22].

1.4.3. a-2) Entraînement par vapeur d'eau

La plante aromatique est placée entière ou broyée s'il s'agit d'organes durs (racine ou écorce), dans une cuve et immergée dans l'eau. Le procédé consiste à faire traverser cette cuve par de la vapeur d'eau produite par une chaudière indépendante. La vapeur d'eau entraîne l'huile essentielle de la plante puis passe dans un serpentin baignant dans de l'eau fraîche. Ainsi, il y a condensation et le liquide aboutit dans l'«essencier» ou «vase florentin» dans lequel l'huile essentielle se sépare de l'eau par différence de densité (voir figure I.5). Les huiles essentielles ont, pour la plupart, une densité inférieure à celle de l'eau (< 1), sauf exception (cas de l'HE de giroflier présentant une densité de 1,0594).

Ainsi, dans la majorité des cas, l'huile essentielle constitue la phase supérieure et flotte au-dessus de l'hydrolat aromatique ce qui permet de la recueillir par débordement. Cet hydrolat aromatique, aussi appelé eau florale, renferme une faible quantité de molécules aromatiques (moins de 5%) ; il est utilisé notamment chez les jeunes enfants ainsi qu'en cosmétologie [23].

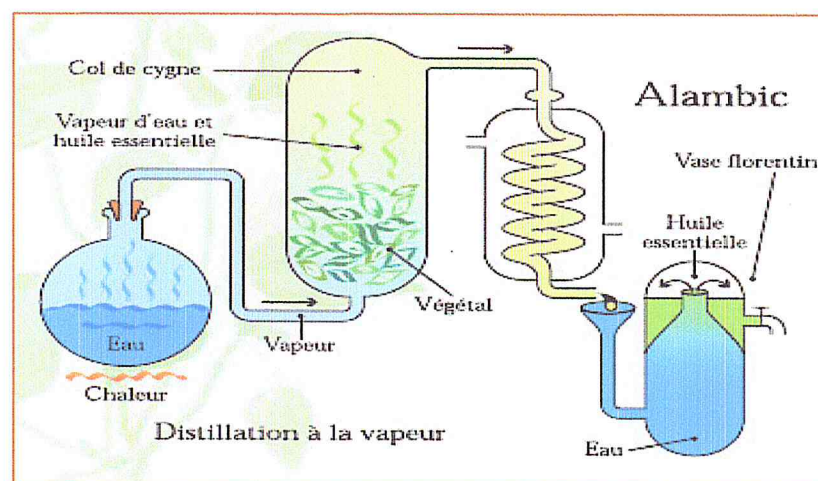


Figure I.5 : Schéma d'un montage d'entraînement à la vapeur d'eau [23].

1.4.3. a-3) Distillation par les solvants organiques

Certaines huiles essentielles ont une densité voisine de l'eau et le procédé par distillation à la vapeur d'eau ne peut être dans ce cas utilisé. Le principe consiste à faire macérer la plante dans le solvant afin de faire passer les substances odorantes dans le solvant [24].

1.4.3. b) Extraction par micro-ondes

L'extraction par micro-onde consiste à chauffer l'extractant (eau ou solvant organique) mis en contact avec la plante sous l'énergie micro-ondes ce qui permet un chauffage homogène. Ce nouveau procédé d'extraction permet des gains de temps et d'énergie considérables [25, 26].

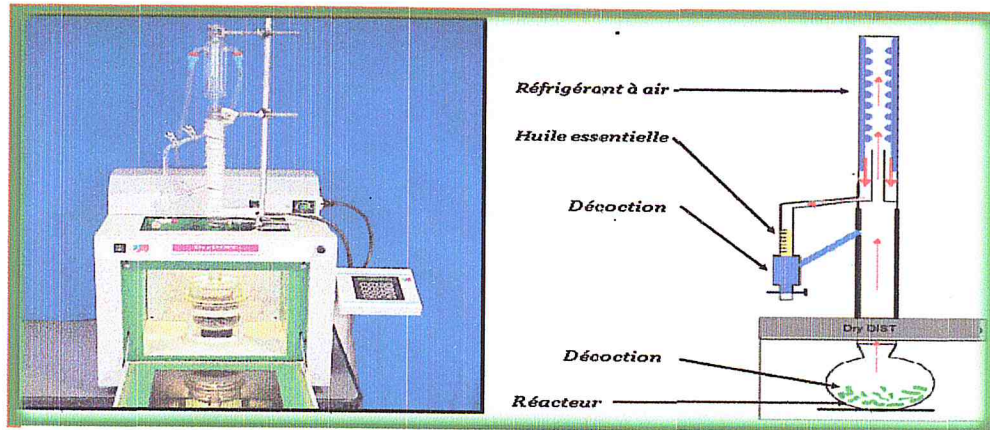


Figure I.6 : montage d'extraction par micro-onde [25].

1.4.3. c) Extraction par ultra-sons

Le matériel végétal mis en contact avec le solvant (eau ou solvant organique) est immergé dans un bain à sonication maintenu à une agitation constante.



Figure I.7 : Montage d'une extraction par ultrasons [27].

1.4.3. d) Enfleurage

L'enfleurage est une technique assez difficile. Elle date de l'antiquité égyptienne et est basée sur la forte affinité des molécules odorantes pour les graisses. Elle est réservée principalement aux organes fragiles qui sont les fleurs (violette, tubéreuse, jasmin...).

Celles-ci sont étalées délicatement sur des plaques de verre enduites de mince couche de graisse et on superpose ces plaques sur des châssis de bois. Les substances volatiles

diffusent et sont absorbées par la couche de graisse. Ensuite ces graisses sont épuisées à l'alcool. Ce procédé a tendance à disparaître car il nécessite une forte main-d'œuvre [23].

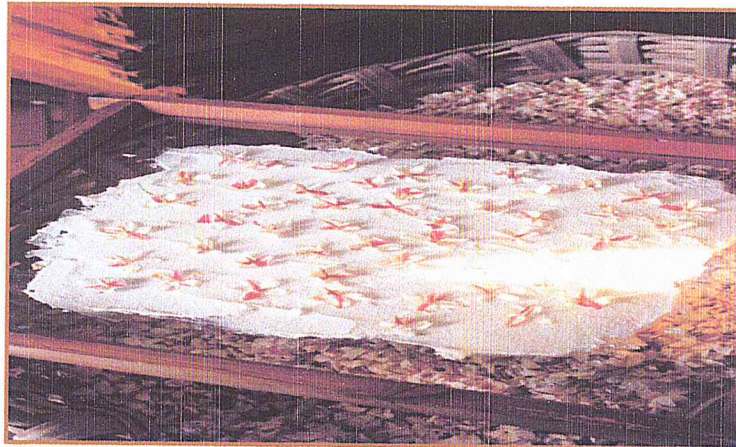


Figure I.8 : Méthode d'enfleurage [23].

1.4.3. e) Expression à froid

Les huiles essentielles de fruits d'hespéridés ou encore d'agrumes ont une très grande importance dans l'industrie des parfums et des cosmétiques. Cependant ce sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes. C'est pourquoi, spécifiquement pour cette catégorie de matière première, est utilisé un procédé totalement différent d'une distillation classique, qui est l'expression à froid. Le principe de cette technique est basé sur la rupture ou la dilacération des parois des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits et sur la pression du contenu de ces sacs sur les parois [23].

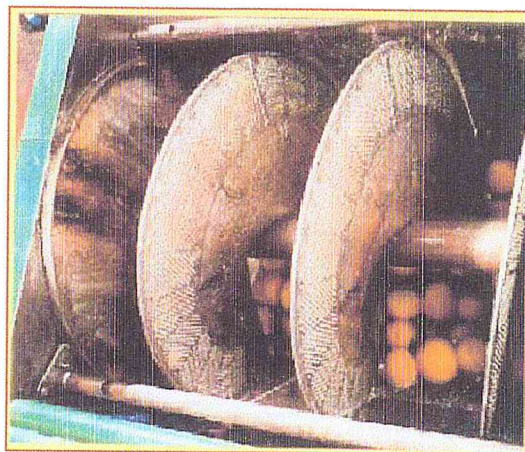


Figure I.9 : Méthode d'expression à froid [23].

I.4.3. f) CO_2 supercritique

Il consiste à faire circuler du CO_2 supercritique, sous pression et température, à travers une matière, puis d'opérer une décompression pour récupérer l'extrait ou le contaminant.

A la dépressurisation, le CO_2 est libéré sous forme gazeuse et le composé recherché sous forme liquide ou solide. Le CO_2 supercritique peut voir sa polarité modifiée par l'ajout d'un « dopant » polaire communément appelé co-solvant permettant ainsi d'augmenter le spectre des molécules extraites par le solvant supercritique. Par ailleurs, le développement d'unité fonctionnant à haute pression (>400 bar) permet de récupérer des molécules de plus en plus polaires sans ajout de co-solvant [23].

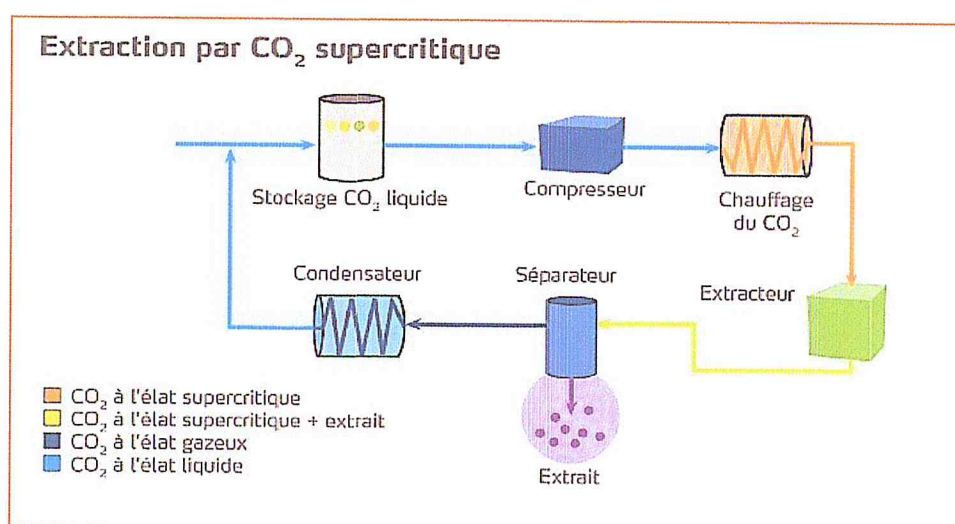


Figure I.10 : Principe d'une extraction par CO_2 supercritique [23].

I.4.4. Composition chimique de l'huile essentielle du clou de girofle

Les huiles essentielles des clous, des feuilles et des griffes du girofle sont principalement caractérisées par l'eugénol, l'acétate d'eugényle et le β -caryophyllène mais à des proportions différentes selon les auteurs.

Une teneur élevée en eugénol et en β -caryophyllène, respectivement de 78 % et de 13 % est remarquée dans l'huile essentielle de clou de Prashar et al. (2006) alors que les huiles essentielles étudiées par Pawar et Thaker (2006) présentent une faible teneur en eugénol (47,64 %) avec une concentration en benzyle alcool de 34 %. Par ailleurs, les huiles essentielles de clous analysées par Fu et al. (2007) et Chaieb et al. (2007) diffèrent énormément. Les huiles analysées par Fu et al. sont caractérisées par l'eugénol (68,52 %), le β -caryophyllène (19 %), acétate d'eugényle (10,15 %) et α -caryophyllène (1,85 %) et celles de Chaieb et al. par l'eugénol (88,58 %), l'acétate d'eugényle (5,62 %), le β -caryophyllène (1,39 %) et d'autres constituants mineurs (0,1 à 0,9 %). aussi que le β -caryophyllène (2,9 %),

le nérol (0,79 %) l'oxyde de caryophyllène (0,67 %) sont présents dans les huiles essentielles venant de Little Andaman alors que ces constituants sont absents ou sous forme de traces dans les échantillons venant du sud de l'Inde (Gopalakrishnan et al., 1988). De même, l'acétate d'eugényle (1,5 %) et l' α -farnésol (0,5 %) ont été seulement détectés dans les huiles du sud de l'Inde [24].

CHAPITRE II

APPLICATION DE LA CHIMIOMETRIE A LA SPECTROSCOPIE *IRTF*.

Introduction

L'origine de la spectroscopie infrarouge remonte à l'année 1800, lorsque William Herschel a découvert la région infrarouge du spectre électromagnétique. Depuis 1905, lorsque William W. Coblentz a couru le premier spectre infrarouge, la spectroscopie vibrationnelle est devenue un outil d'analyse important dans la recherche et dans les domaines techniques [28].

Pendant les années 1930 et 1940, les progrès de l'électronique ont abouti à l'introduction de thermocouples de rayonnement infrarouge. En conséquence, une instrumentation « moderne » pour la spectroscopie d'absorption devenait régulièrement disponible dans les années 40 [29].

L'apparition des premiers spectromètres infrarouges à transformée de Fourier (IRTF) de la catégorie de recherche au début des années 1970 a initié la naissance de la spectrométrie infrarouge moderne. Après les instruments analytiques (depuis la fin des années 70) et les instruments de routine (depuis le milieu des années 80), des instruments spécialisés sont maintenant disponibles à des prix raisonnables [30].

Les applications de la spectrométrie infrarouge moderne incluent les examens d'identité et de pureté simples et routiniers ainsi que l'analyse quantitative, les mesures de processus et l'identification des composés inconnus..., en combinaison avec la chimométrie, elle est maintenant appliquée à de nombreux autres domaines, ex. : polymères, agriculture et alimentation, échantillons géologiques, industrie pharmaceutique, analyse biologique et médicale [30].

II.1. Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge (IR) est une classe de spectroscopie qui traite de la région infrarouge du spectre électromagnétique. C'est une technique basée essentiellement sur les vibrations des atomes d'une molécule et elle recouvre une large gamme de techniques, la plus commune étant un type de spectroscopie d'absorption [31, 32].

Il est relativement facile d'obtenir des spectres d'échantillons en solution ou dans les états liquide, solide ou gazeux. Un spectre infrarouge est généralement obtenu en passant le rayonnement infrarouge par un échantillon et en déterminant quelle fraction du rayonnement d'incident est absorbée à une énergie particulière [29, 32].

Les spectromètres infrarouges à transformée de Fourier sont aujourd'hui principalement utilisés et ont amélioré radicalement l'acquisition des spectres infrarouges [32].

II.2. Principe de fonctionnement des spectromètres infrarouges à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est basée sur l'idée de l'interférence du rayonnement entre deux faisceaux pour produire un interférogramme. Ce dernier est un signal produit en fonction du changement de la longueur de trajet entre les deux faisceaux. Les deux domaines de distance et de fréquence sont interconvertibles par la méthode mathématique de transformation de Fourier [33].

Les composants de base d'un spectromètre IRTF sont représentés schématiquement dans la figure II.1. Le rayonnement sortant de la source est passé à travers un interféromètre puis à l'échantillon avant d'atteindre le détecteur. Lors de l'amplification du signal, dans laquelle les contributions à hautes fréquences ont été éliminées par un filtre, les données sont converties en forme numérique par un convertisseur analogique-numérique et transférées à l'ordinateur pour la transformation de Fourier [33].

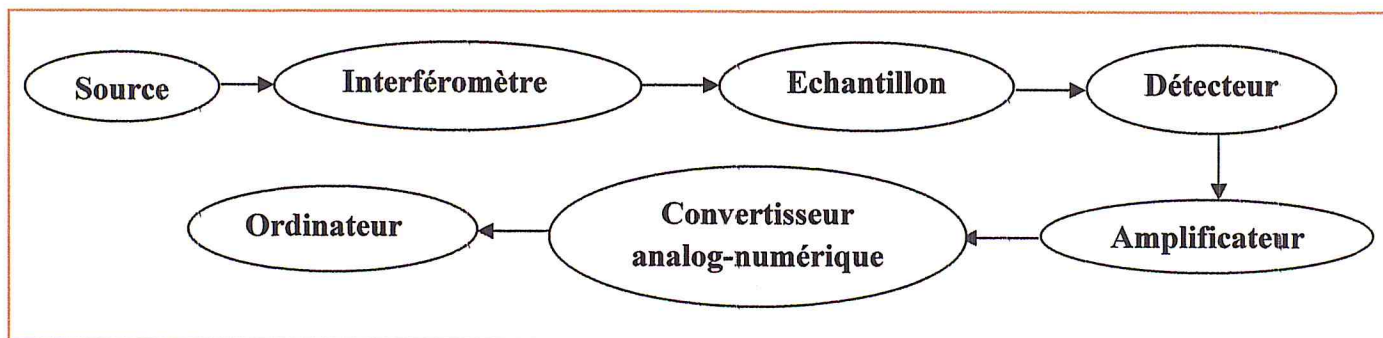


Figure II.1 : Composants de base d'un spectromètre IRTF [33].

L'interféromètre le plus utilisé couramment dans la spectrométrie IRTF est un interféromètre de Michelson, qui se compose de deux miroirs perpendiculaires, dont l'un peut se déplacer dans une direction perpendiculaire au plan (figure II.2). Un film semi-réfléchissant, le séparateur de faisceau, divise les plans de ces deux miroirs [34].

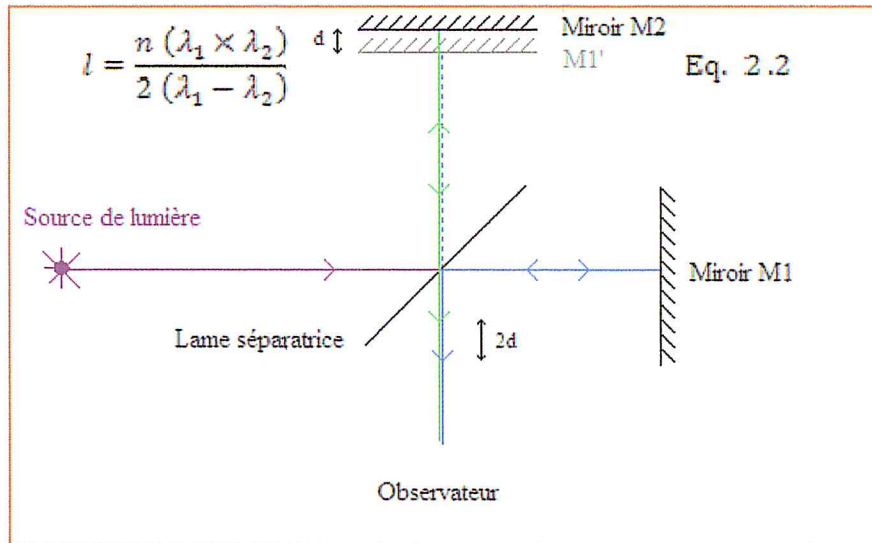


Figure II.2 : Schéma d'un interféromètre de Michelson [34].

II.3. Méthodes d'analyse

II.3.1. Méthodes de transmission

La spectroscopie de transmission est la méthode infrarouge la plus ancienne et la plus directe. Cette technique est basée sur l'absorption du rayonnement infrarouge à des longueurs d'onde spécifiques lorsqu'il traverse un échantillon. Il est possible d'analyser des échantillons sous forme liquide, solide ou gazeuse en utilisant cette approche [29, 35].

Calibrage de la longueur du trajet optique

La longueur du trajet cellulaire peut être mesurée par la méthode de comptage des franges d'interférence. Si une cellule vide avec des fenêtres parallèles est placée dans le spectromètre et une gamme de longueurs d'onde balayée, un modèle d'interférence semblable comme celui montré dans la figure II.3 sera obtenu. L'amplitude de la forme d'onde varie de 2 à 15%, selon l'état des fenêtres. La relation entre la longueur de trajet de la cellule l et les franges de crête à crête est donnée par :

$$l = \frac{n}{2 (\sigma_1 - \sigma_2)}$$

Eq. 2.1

Où n est le nombre de franges de crête à crête complètes entre deux maximums (ou minimums) à σ_1 et σ_2 .

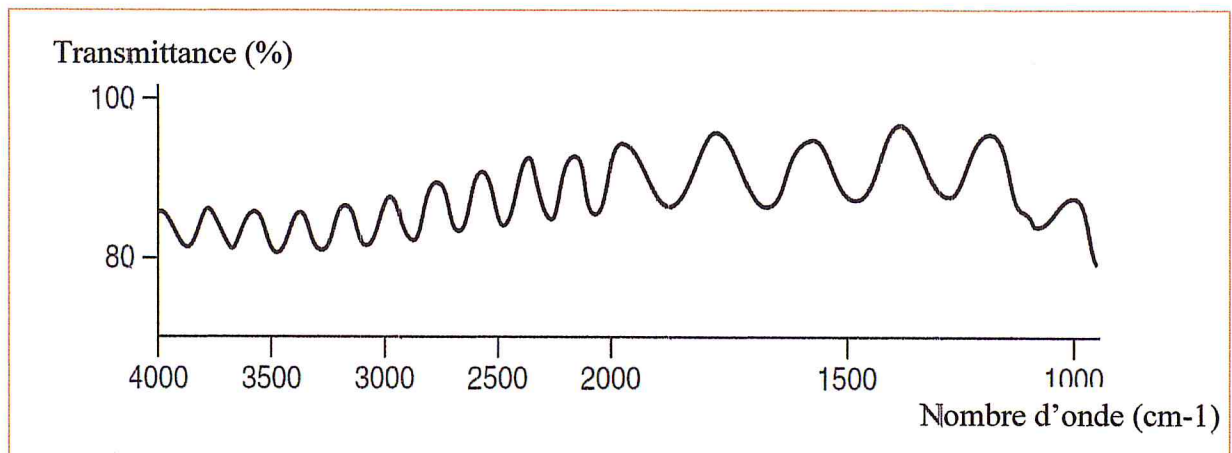


Figure II.3 : Modèle d'interférence enregistré avec une cellule vide [29].

II.3.2 Méthodes de réflectance

Les techniques de réflectance peuvent être utilisées pour des échantillons qui sont difficiles à analyser par les méthodes de transmission classiques. Les mesures de réflectance interne peuvent être effectuées en utilisant une cellule de réflectance totale atténuée (ATR) en contact avec l'échantillon [36, 37].

II.4. Analyse spectrale

Une fois qu'un spectre infrarouge a été enregistré, l'étape suivante de cette technique expérimentale est l'interprétation. Heureusement, l'interprétation du spectre est simplifiée par le fait que les bandes qui apparaissent peuvent généralement être attribuées à des parties particulières d'une molécule, produisant ce qu'on appelle les fréquences de groupe [30, 38].

La plupart des instruments commerciaux présentent un spectre dont le nombre d'ondes diminue de gauche à droite.

La région IR du spectre comprend la région de longueur d'onde comprise entre environ 0.78 et 1000 μm (ou de nombre d'onde de 13,000 à 10 cm^{-1}). Il est utile, tant sur le plan des applications que sur le plan de l'instrumentation, de diviser cette zone du spectre en trois régions principales : infrarouge lointain ($< 400 \text{ cm}^{-1}$), infrarouge moyen (4000 - 400 cm^{-1}) et infrarouge proche (13,000 - 4000 cm^{-1}). De nombreuses applications en infrarouge

utilisent la zone de l'infrarouge moyen, mais les zones infrarouges proche et lointain fournissent également des informations importantes sur certains matériaux [39].

II.5. Loi de Beer-Lambert et concentration

La loi de Beer-Lambert est utilisée pour relier la quantité de lumière transmise par un échantillon à l'épaisseur de cet échantillon. L'absorbance d'une solution est directement proportionnelle à l'épaisseur et à la concentration de l'échantillon, comme suit :

$$A = \epsilon l C$$

Où A est l'absorbance de la solution, C la concentration et l la longueur du trajet de l'échantillon [39].

II.6. Principe de l'analyse quantitative

La spectroscopie infrarouge quantitative peut fournir certains avantages par rapport aux autres techniques analytiques. Cette dernière peut être utilisée pour l'analyse d'un composant de mélange, en particulier lorsque les composés dans le mélange sont chimiquement similaires ou ont des propriétés physiques très semblables (par exemple, des isomères structuraux). Dans ces cas, l'analyse par la spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis), par exemple, est difficile car les spectres des composants seront presque identiques [40, 41].

La loi de Beer-Lambert nous dit qu'une courbe d'absorbance en fonction de la concentration doit être linéaire avec une pente de ϵl et passer par l'origine. En théorie, pour analyser une solution de concentration inconnue, des solutions de concentration connue doivent être préparées, une bande appropriée choisie, l'absorbance à ce nombre d'onde mesurée et un graphe d'étalonnage tracé. La concentration du composé en solution peut être lue à partir du graphe d'étalonnage, étant donné que son absorbance est connue.

Non seulement l'analyse infrarouge quantitative peut être effectuée sur des systèmes simples (échantillons liquides et solides), mais elle peut aussi être appliquée à des systèmes multi-composants.

II.7. Méthodes de calibrage chimiométrique des spectrophotomètres

L'analyse chimique par spectrophotométrie repose sur l'acquisition rapide d'un grand nombre de données spectrales (plusieurs centaines, voire plusieurs milliers). Lorsque ces données ne sont pas condensées dans des vecteurs propres, seul un petit nombre d'entre elles peuvent entrer dans la constitution de chaque modèle de calibrage pour la détermination d'un constituant particulier. Les modèles de calibrage consistent véritablement en des équations de conversion des données spectrales (entrée) en des valeurs de composition chimique (sortie). L'établissement de ces équations suppose l'ajustement des paramètres affectant les valeurs d'entrée pour arriver aux valeurs de sortie les plus proches possibles de la réalité [42].

L'amélioration de la technologie informatique associée à la spectroscopie a conduit à l'expansion de la spectroscopie infrarouge quantitative. L'application des méthodes statistiques à l'analyse de données expérimentales est connue sous le nom de « chimiométrie ».

La chimiométrie s'intéresse à l'évaluation des données analytiques observées à l'aide des mathématiques, particulièrement les méthodes statistiques. Quelques méthodes d'analyse des données multivariées qui sont utilisées pour l'analyse des données spectroscopiques d'IRTF seront décrites ici, sans détailler les mathématiques associées à ces méthodes [43].

Les méthodes analytiques les plus couramment utilisées dans la spectroscopie infrarouge sont les suivantes :

- 1) Régression des moindres carrés classique (CLS).
- 2) Régression des moindres carrés inverse (ILS).
- 3) Régression des moindres carrés partiels (PLS).
- 4) Régression des composantes principales (PCR).

Les méthodes de régression CLS et ILS sont des méthodes des moindres carrés impliquant des opérations matricielles. Ces méthodes peuvent être limitées lorsque des mélanges très complexes sont étudiés et des méthodes d'analyse factorielle, telles que PLS et PCR, peuvent être plus utiles. Les méthodes d'analyse factorielle utilisent des fonctions pour modéliser la variance dans un ensemble de données [44, 45].

Avec le temps, les méthodes d'évaluation chimiométriques sont devenues une partie essentielle de l'analyse environnementale, de la médecine (ex. : analyses médico-légales), de

l'analyse des processus, du contrôle de qualité, de la criminologie et de nombreux autres domaines [43].

II.8. Analyse par régression aux moindres carrés partiels

La régression par moindres carrés partiels, notée PLS, est une méthode d'analyse quantitative statistique permettant de construire des modèles prédictifs lorsque les variables explicatives sont nombreuses et très corrélées. L'accent est mis dans cette méthode sur la prédiction et non sur l'identification, problématique qui relève plutôt des différentes techniques descriptives d'analyse factorielle [46].

La régression PLS a été développée à l'origine par Herman Wold dans les années 60 comme technique économétrique puis fut popularisée auprès des chimistes par son propre fils, Svante Wold, pour être appliquée au contrôle de processus industriels [47].

L'objectif de la régression PLS est d'extraire des « composantes », variables latentes responsables de la variation des variables explicatives, qui modélisent au mieux le comportement des variables expliquées. Pour prédire les variables expliquées à partir des variables explicatives, la PLS procède de manière indirecte en extrayant des composantes T à partir des variables explicatives X (absorbances) pour estimer des composantes U qui permettront de calculer les réponses y (concentrations) [46, 48].

Les composantes T et U sont choisies pour obtenir une liaison optimale au sein de chaque paire de composantes. Il s'agit en fait d'une forme robuste de l'analyse des redondances maximales qui recherche les directions de l'espace des variables explicatives liées aux plus fortes variations dans l'espace des variables expliquées mais biaisées vers des directions mieux prédites [46, 48].

La sortie du modèle PLS peut être une seule variable, à savoir la concentration de l'analyte, on parle dans ce cas de modèle PLS-1 par opposition au modèle PLS-2 qui permet de traiter en sortie non pas un vecteur mais une matrice et qui permet notamment de prédire les concentrations de plusieurs éléments simultanément [49]. Les chimistes se sont intéressés aux méthodes multivariées dès lors que l'approche univariée ne permettait pas de traiter des spectres complexes [50].

Comme pour toute analyse par IRTF, un prétraitement des données spectrales est nécessaire afin de disposer de données centrées sur la valeur moyenne ou même centrées réduites, ce qui signifie qu'elles sont en plus normalisées par l'écart-type.

Dans le cas de l'analyse de données spectrales, considérons comme précédemment une matrice X de dimension (N, k) avec N le nombre de spectres et k le nombre de variables. En sortie du modèle, nous aurons le vecteur y de longueur N correspondant à la concentration de l'analyte pour chaque échantillon [49].

Pour fixer les notations, d'une manière générale, le modèle de la régression PLS s'écrit [51, 52] :

$$X = t_1 p_1^T + t_2 p_2^T + t_3 p_3^T + \dots + t_A p_A^T + E_A \quad \text{Eq. 2.3}$$

$$y = t_1 q_1 + t_2 q_2 + t_3 q_3 + \dots + f_A \quad \text{Eq. 2.4}$$

On remarque que les deux quantités X et y sont exprimées en fonction des mêmes scores t_i tandis que chacune a ses propres vecteurs propres à savoir p_i pour X et q_i pour y . De même, chaque quantité a son propre résidu à savoir E_i pour X et f_i pour y . Grâce à ce système de deux équations couplées, on maximise la corrélation entre les N spectres (X) et les N valeurs de concentration de l'analyte (y) [49].

On prend comme conditions initiales : $E_0 = X$ et $f_0 = y$. Puis on relie les deux résidus par un paramètre de poids W tel que [51, 52] :

$$W_1 = E_0^T f_0 = X^T Y \quad \text{Eq. 2.5}$$

On peut ainsi calculer le premier score qui s'écrit :

$$t_1 = E_0 W_1 = X W_1 \quad \text{Eq. 2.6}$$

Ce qui permet de calculer les vecteurs propres p_i et q_i :

$$p_1 = \frac{E_0^T t_1}{t_1^T t_1} \quad \text{Eq. 2.7}$$

$$q_1 = \frac{f_0^T t_1}{t_1^T t_1} \quad \text{Eq. 2.8}$$

On peut finalement calculer les résidus à l'itération suivante :

$$E_1 = E_0 - t_1 p_1^T \quad \text{Eq. 2.9}$$

$$f_1 = f_0 - t_1 q_1^T \quad \text{Eq. 2.10}$$

À ce stade, on peut calculer le second poids et ensuite le second score :

$$W_2 = E_1^T f_1 \quad \text{Eq. 2.11}$$

$$t_2 = E_1 W_2 \quad \text{Eq. 2.12}$$

Et ainsi de suite. Plus généralement, on peut donc écrire :

$$E_a = E_{a-1} - t_a p_a^T \quad \text{Eq. 2.13}$$

$$f_a = f_{a-1} - t_a q_a^T \quad \text{Eq. 2.14}$$

$$w_a = E_{a-1}^T f_{a-1} \quad \text{Eq. 2.15}$$

$$t_a = E_{a-1} w_a \quad \text{Eq. 2.16}$$

$$p_a = \frac{E_{a-1}^T t_a}{t_a^T t_a} \quad \text{Eq. 2.17}$$

$$q_a = \frac{f_{a-1}^T t_a}{t_a^T t_a} \quad \text{Eq. 2.18}$$

Une fois que le modèle PLS est construit, pour calculer les scores d'un échantillon inconnu, il faut avant tout lui appliquer la même normalisation que celle qui a servi à l'étalonnage.

Ainsi, si l'étalonnage a été effectué avec des variables centrées, on devra soustraire au spectre inconnu (vecteur x_0) le vecteur \bar{X} des moyennes de la matrice X [49] :

$$e_0 = x_0 - \bar{X} \quad \text{Eq. 2.19}$$

Pour un échantillon inconnu, les scores sont également calculés d'une façon itérative si bien que pour chaque composante a , on peut écrire :

$$t_{a0} = e_{a-1} w_a \quad \text{Eq. 2.20}$$

Et on calcule le nouveau résidu pour le prochain calcul de score :

$$e_a = e_{a-1} - t_{a0} p_a \quad \text{Eq. 2.21}$$

Finalement, lorsqu'on fixe le nombre A de composantes, la valeur prédite pour y s'écrit [51, 52] :

$$\hat{y}_{AD} = \sum_{\alpha=1}^A t_{\alpha 0} q_{\alpha} \quad \text{Eq. 2.22}$$

II.9. Généralité sur les composés phénoliques

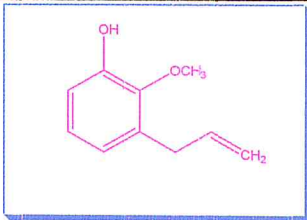
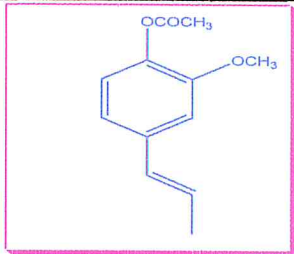
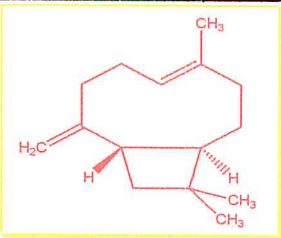
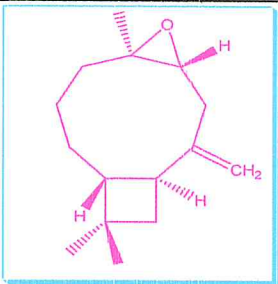
Les composés phénoliques sont parmi les classes les plus répandues de métabolites dans la nature, et leur distribution est presque omniprésente. On estime que 100,000 à 200,000 métabolites secondaires existent et environ 20% du carbone fixé par la photosynthèse est canalisé dans la voie des phénylpropanoïdes, produisant ainsi la majorité des phénols d'origine naturelle tels que les flavonoïdes et les stilbènes [53, 54].

Bien que les monophénols à proprement parler, tels que l'acide *p*-coumarique, ne sont pas des polyphénols, ils partagent cependant avec ces derniers beaucoup de leurs propriétés et caractéristiques, étant ainsi connu comme « polyphénols fonctionnels » [55].

Dans la littérature il existe deux propositions pour définir les polyphénols. La première les définit comme étant une structure moléculaire qui porte plusieurs groupement phénoliques tandis que la deuxième indique la présence d'un groupement phénol polyhydroxylé. Ces polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par les végétaux pour se défendre contre les agressions environnementales. Il s'agit des dérivés connus par une grande variété structurale dont environ 8000 composés ont été identifiés [56, 57].

Bien qu'une grande variété de phénols des plantes existe, la plupart de ces composés proviennent d'une origine commune : les acides aminés phénylalanine ou tyrosine. Ces acides sont désaminés en acides cinnamiques, qui entrent dans la voie des phénylpropanoïdes. Une étape clé dans cette voie de biosynthèse est l'introduction d'un ou plusieurs groupements hydroxyle dans le cycle phényle. En conséquence, ces composés sont dérivés d'une composante squelettique carbonique commune : l'unité phénylpropanoïde en C6-C3. La biosynthèse, selon cette voie, produit une grande variété de composés phénoliques : les acides cinnamiques (C6-C3), les acides benzoïques (C6-C1), les flavonoïdes (C6-C3-C6), les proanthocyanidines [(C6-C3-C6)_n], les coumarines (C6-C3), les stilbènes (C6-C2-C6), les lignanes (C6-C3-C3-C6) et les lignines [(C6-C3)_n] [58, 59].

Tableau II.1 : Quelques composés phénoliques existants chez les clous de girofle [1].

Composés phénoliques	Structure	Pourcentage (%)
Eugénol		70 à 90%
Acétate d'Eugényl		9 à 15%
Béta-caryophyllène		5 à 12%
Caryophyllène-oxyde		<1%

CHAPITRE III

ETUDE

EXPERIMENTALE.

Introduction

Le clou de girofle forme une source riche en métabolites primaires. Il est beaucoup utilisé en cuisine pour parfumer le pain d'épices. Le clou de girofle contient de 15 à 20% d'huile essentielle. Celle-ci présente de nombreuses propriétés pharmacologiques comprenant une action anti-inflammatoire, antiseptique, analgésique, bactéricide mais est également très utilisée en parfumerie. Ces propriétés sont liées à ce qu'il contient de divers métabolites secondaires (phénols, terpènes...). L'huile essentielle du clou de girofle est composée majoritairement d'eugénol (85 à 90%), de caryophyllène, de tanins et d'acide oléanolique.

Les travaux de recherche réalisés sur le clou de girofle montrent une teneur élevée en composés phénoliques, où les acides phénoliques représentent la classe majeure dans cette espèce. L'identification et la quantification de ces composés a été faite, dans la plupart des cas, par UPLC-ESI-MS/MS ou GC-MS qui sont des techniques indispensables et assez « coûteuses » ou par la méthode Folin-Ciocalteu qui reste néanmoins une technique destructive et semi-quantitative.

L'objectif principal de ce travail de recherche était le développement d'une nouvelle méthode analytique pour la détermination des teneurs des composés majoritaires (l'eugénol, l'acide cinnamique, l'acide salicylique et l'acétate d'eugényle) chez le clou de girofle par la spectroscopie IRTF en exploitant les principes de la chimiométrie à la calibration multicomposante de la méthode de régression des moindres carrés partiels (PLS) du logiciel Quant 2 d'OPUS.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de chimie des substances naturelles et des molécules bioactives, laboratoire du département de chimie, faculté des sciences, Université Blida 1.

III.1. Appareillages et réactifs

III.1.1. Spectrophotomètre Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de marque Jasco, équipé d'un détecteur Sulfate de triglycine dopé au lanthane α -alanine deutéré DLaTGS et une source céramique à haut rendement pour une stabilité maximale à température ambiante, d'une source infrarouge moyen ($7800 - 350\text{cm}^{-1}$), d'un rayonnement de laser et un diviseur de faisceau KBr a été utilisé. L'alignement optique permanent est garanti par des miroirs en coin (rétro-réfléchissants) avec auto alignement pour un maximum d'énergie, avec une

résolution de 4 cm^{-1} . Le traitement des spectres est réalisé avec le logiciel OPUS 6.5 sous le système d'exploitation Microsoft Windows XP.

La fenêtre utilisée pour l'analyse de la phase liquide était en fluorure de baryum (BaF_2) avec une entretoise en téflon de 0.1 mm d'épaisseur. Les tubes de connections sont en téflon avec un diamètre intérieur de 0.8 mm et le chargement est réalisé en employant des tubes de chlorure de polyvinyle de diamètre intérieur de 2.79 mm . L'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution de 4 cm^{-1} et un nombre de scan égal à 15 spectres par rapport à un background stabilisé préalablement dans les mêmes conditions instrumentales avec une cellule remplie de solvant utilisé pour la préparation des solutions.

L'introduction des mélanges a été faite à l'aide d'un système à écoulement bloqué avec une cellule de flux. L'avantage d'une telle cellule est d'éviter les inconvénients du nettoyage et du remplissage des cellules conventionnelles classiques.

Le système d'écoulement a été réalisé en utilisant une pompe péristaltique, le flux est stoppé momentanément une fois la cellule est remplie. On obtient le spectre et on rétablit le flux pour rincer la cellule avec le solvant et la remplir à nouveau avec une autre solution.

Les spectres enregistrés sont traités à l'aide d'une macro (boucle) qui a été construite à partir de logiciel intégré Quant 2 d'OPUS pour faire la calibration multicomposante.

La figure III.1 représente le montage de la chaîne utilisée pour l'analyse.

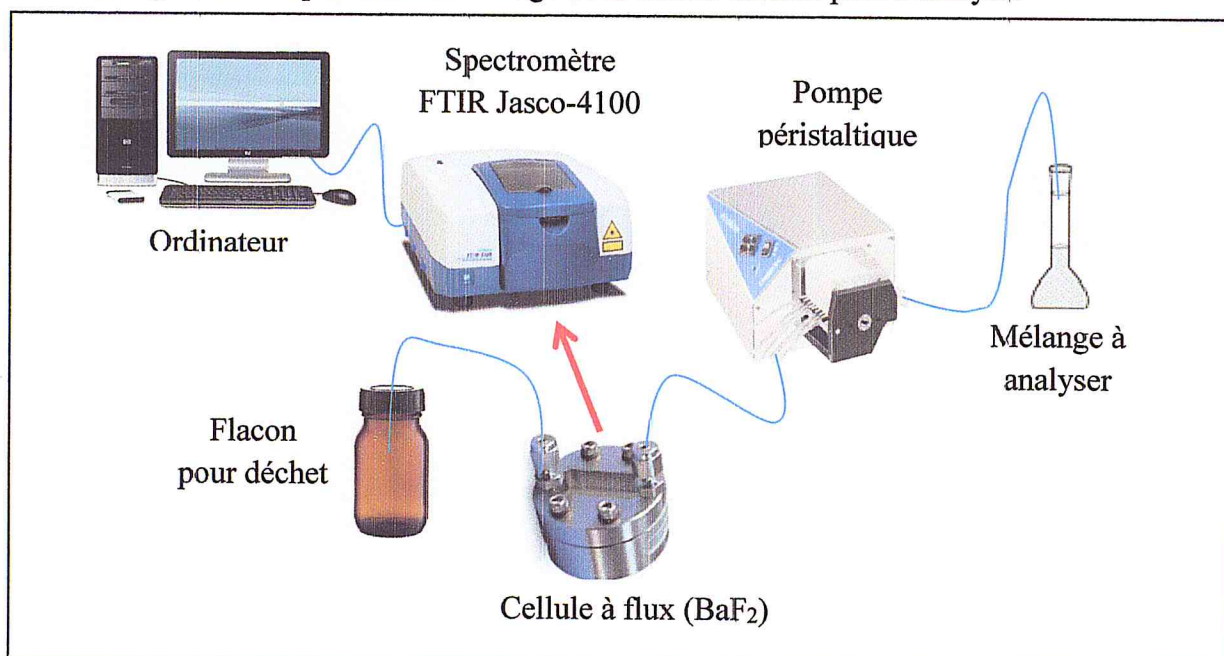


Figure III.1 : Montage IRTF utilisé pour l'analyse des solutions en mode écoulement bloqué.

III.1.2. Réactifs et produits chimiques

Tous les réactifs utilisés dans cette étude : le dichlorométhane stabilisé avec l'amylène et les étalons, sont de grade analytique (tableau III.1).

Le tableau III.1 représente les réactifs et les produits chimiques utilisés.

Tableau III.1 : Réactifs et produits chimiques utilisés.

Produit	Pureté (%)	Fournisseur	Pays
Acide salicylique	99%	Sigma-Aldrich	France
Acide cinnamique	97%	Sigma-Aldrich	France
Acétate d'eugényle	98%	Sigma-Aldrich	France
Eugénol	99%	Prolabo	Espagne
Dichlorométhane	99.9%	Honeywell	France
Cyclohexane	99.8%	Sigma-Aldrich	Allemagne
Hexane	95%	Sigma-Aldrich	Allemagne
MgSO ₄	98%	Sigma-Aldrich	Allemagne
Ether diéthylique	99.5%	Sigma-Aldrich	Allemagne

III.1.3. Choix des étalons et du solvant

Pour développer les modèles de calibration multicomposante on a choisi une série de quatre (04) composés qui sont présents dans le clou de girofle à savoir l'acide salicylique, l'acide cinnamique, l'eugénol et l'acétate d'eugényle.

En phase liquide, un des solvants chlorés doit être choisi pour les analyses infrarouges. Le dichlorométhane avec une toxicité moins faible que les autres solvants chlorés et une polarité moyenne n'interfère pas avec les bandes spécifiques des phénols donc il était le solvant approprié. Cependant, la majorité des composés phénoliques ne sont solubles que dans les alcools, donc on avait choisis le dichlorométhane comme solvant.

La Figure III.2 montre des spectres IRTF d'absorbance comparatifs des quatre étalons utilisés à des concentrations équivalentes (10 mg.ml⁻¹) préparés séparément dans le solvant CH₂Cl₂ dans le domaine spectral compris entre 4000 et 400 cm⁻¹.

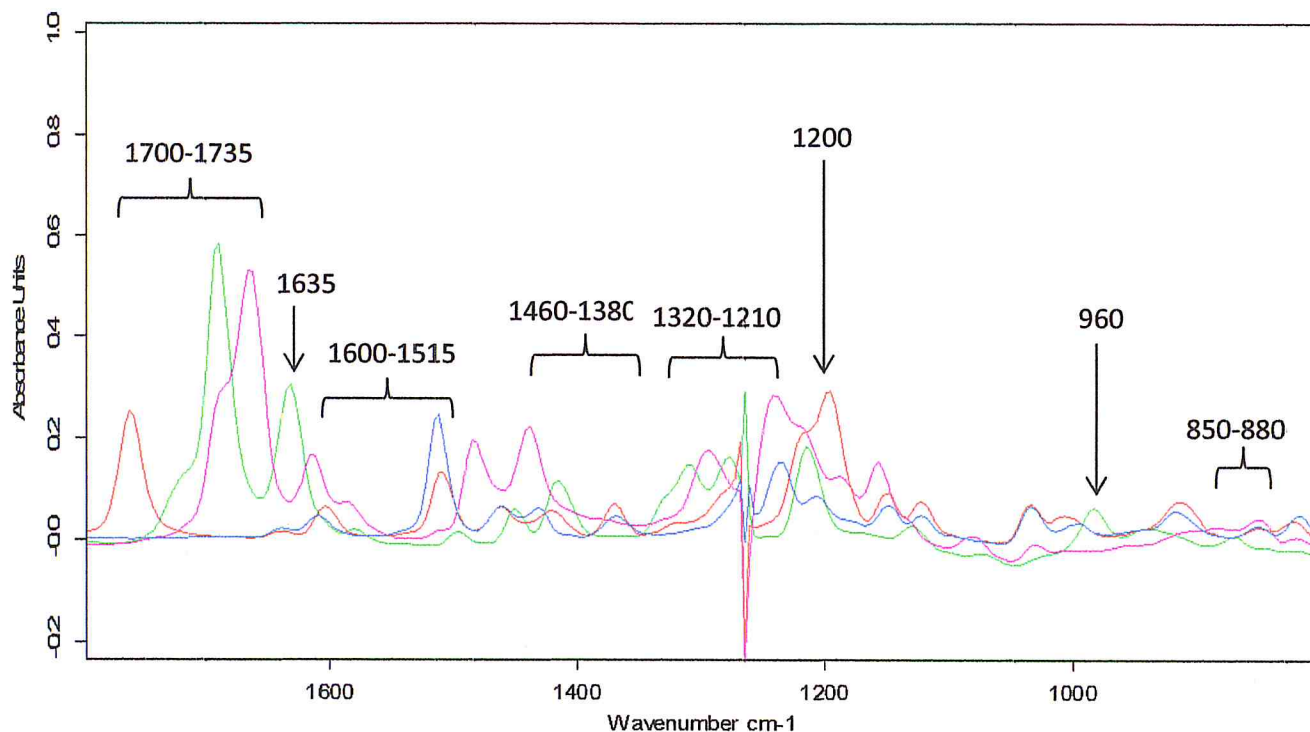


Figure III.2 : Spectres IRTF en phase liquide de l'eugénol (en bleu), l'acétate d'eugényle (en rouge), l'acide *salicylique* (en mauve) et l'acide cinnamique (en vert).

On constate que les spectres des étalons montrent une forte bande à $1700-1735\text{ cm}^{-1}$ qui représente l'élongation du groupement $\text{C}=\text{O}$ de l'acide cinnamique, l'acide salicylique et l'acétate d'eugényle. Ils présentent une bande à 1635 cm^{-1} relative à l'élongation du groupement $\text{C}=\text{C}$ d'un alcène caractéristique de l'acide cinnamique, l'eugénol et l'acétate d'eugényle et également deux bandes intenses à 1600 et 1515 cm^{-1} qui correspondent à l'élongation du groupement $\text{C}=\text{C}$ aromatique.

La gamme entre 1465 et 1380 cm^{-1} contient des bandes caractéristiques de la déformation des groupes CH , CH_2 et CH_3 et aux cycles des composés aromatiques. Les pics à 1200 cm^{-1} présentent l'élongation du groupement $\text{C}-\text{O}$ des phénols.

Les pics à environ $1320-1210\text{ cm}^{-1}$ correspondent aux $\text{C}-\text{O}$ des acides salicylique et cinnamique.

La bande moyenne à 960 cm^{-1} apparaît seulement dans les spectres d'acide cinnamique et d'acétate d'eugényle est caractéristique de la déformation de la liaison $\text{C}-\text{H}$ hors-plan ($\text{trans-RCH}=\text{CHR}$), alors que les deux pics à 880 et 850 cm^{-1} montrent les cycles aromatiques tri-substitué et para-substitué respectivement.

III.2. Calibration PLS multicomposante

III.2.1. Définition de la méthode Quant 2

Le Quant 2 est une méthode d'analyse quantitative statistique permettant de construire des modèles prédictifs lorsque les variables explicatives sont nombreuses et très corrélées.

La sortie du modèle PLS de Quant 2 peut être une seule variable, à savoir la concentration de l'analyte, on parle dans ce cas de méthode PLS-1 (monovariante) par opposition à la méthode PLS-2 (multivariante) qui permet de traiter en sortie non pas un vecteur mais une matrice et qui permet notamment de prédire les concentrations de plusieurs éléments simultanément.

L'avantage d'utilisation du Quant 2 par rapport au Quant 1 est que le premier permet de traiter des spectres des étalons complexes qui sont exclusivement constitués de pics superposés et qui ne sont pas spécifiques.

III.2.2. Optimisation des modèles PLS (Quant 2)

Dans ce travail on a exploité le logiciel intégré Quant 2 d'OPUS (figure III.3) afin de développer des modèles de calibration multicomposante (PLS-1). Ces derniers seront utilisés pour déterminer simultanément les teneurs des composantes chimiques choisies dans des

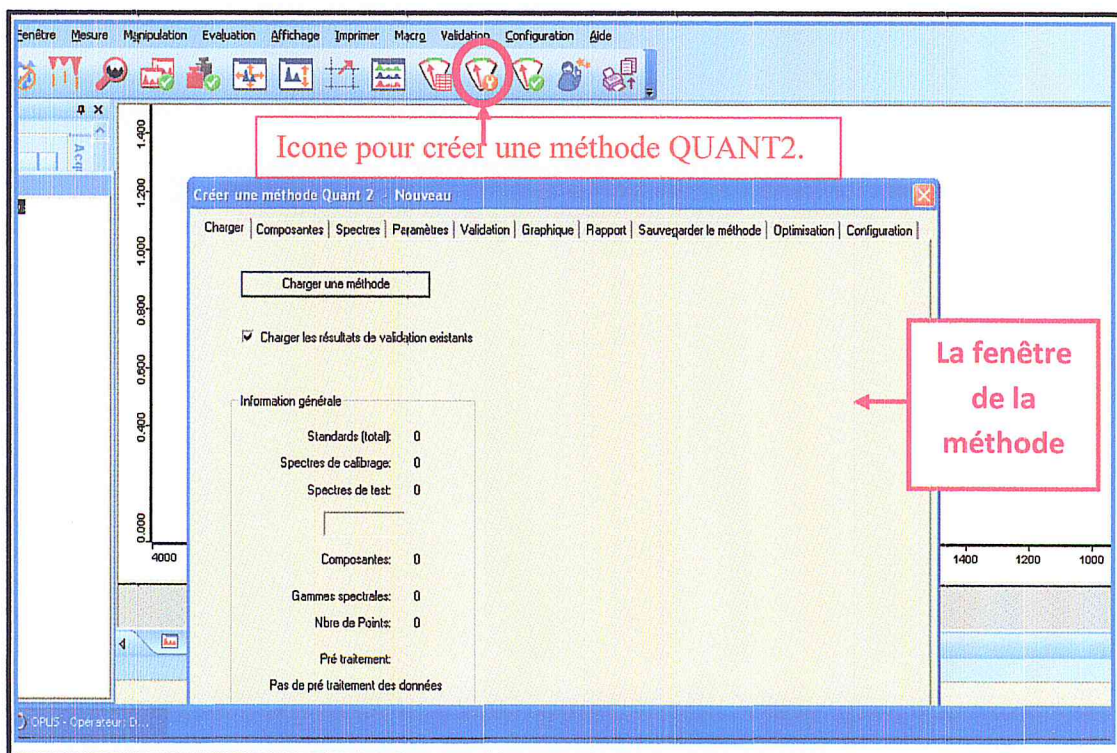


Figure III.3 : Fenêtre du Quant 2 d'OPUS 6.5

échantillons réels après un calibrage préalable avec des solutions étalons.

Le calibrage s'effectue donc avec les concentrations des composantes et les spectres des mélanges. Pour ce faire, on apparie aux spectres des gammes d'optimisation bien définies.

III.2.2. a) Préparation de la matrice de calibration

Afin de procéder au calibrage et obtenir les meilleures valeurs de prédiction, on doit disposer d'une probabilité de concentrations des mélanges. Chacun de ces derniers doit contenir une concentration connue et différente.

Pour construire les modèles, quatre (4) composés ont été choisis, deux limites « supérieures » et « inférieures » des concentrations considérées ont été sélectionnées, respectivement, par rapport à la teneur des composés dans le clou de girofle et en respectant la limite de détection infrarouge.

Donc, nous avons considéré les gammes des concentrations pour l'eugénol comprises entre 0.4 et 4 mg.ml⁻¹, l'acétate d'eugényle entre 0.3 et 3 mg.ml⁻¹, l'acide salicylique entre 0.2 - 2 mg.ml⁻¹ et l'acide cinnamique entre 0.1 - 1 mg.ml⁻¹.

En parallèle, selon la formule 2^n , où n c'est le nombre des étalons utilisés, seize (16) solutions étalons de concentrations différentes doivent être préparées à partir de quatre (4) solutions mères de concentrations équivalentes de 10 mg.ml⁻¹.

Les compositions des seize solutions étalon, en termes de concentrations, sont regroupées dans le tableau III.2.

Tableau III.2 : Composition des solutions étalons (matrice de calibration).

Étalon	Eugénol		Acétate d'eugényle		Acide salicylique		Acide cinnamique	
	C_F (mg.ml ⁻¹)	V_M (ml)	C_F (mg.ml ⁻¹)	V_M (ml)	C_F (mg.ml ⁻¹)	V_M (ml)	C_F (mg.ml ⁻¹)	V_M (ml)
M 01	4	2	3	1.5	2	1	1	0.5
M 02	4	2	3	1.5	2	1	0.1	0.05
M 03	4	2	3	1.5	0.2	0.1	1	0.5
M 04	4	2	0.3	0.15	2	1	1	0.5
M 05	0.4	0.2	3	1.5	2	1	1	0.5
M 06	4	2	3	1.5	0.2	0.1	0.1	0.05
M 07	4	2	0.3	0.15	2	1	0.1	0.05
M 08	4	2	0.3	0.15	0.2	0.1	1	0.5
M 09	0.4	0.2	3	1.5	0.2	0.1	1	0.5
M 10	0.4	0.2	3	1.5	2	1	0.1	0.05
M 11	0.4	0.2	0.3	0.15	2	1	1	0.5
M 12	4	2	0.3	0.15	0.2	0.1	0.1	0.05
M 13	0.4	0.2	3	1.5	0.2	0.1	0.1	0.05
M 14	0.4	0.2	0.3	0.15	2	1	0.1	0.05
M 15	0.4	0.2	0.3	0.15	0.2	0.1	1	0.5
M 16	0.4	0.2	0.3	0.15	0.2	0.1	0.1	0.05

C_F : Concentration de l'étalon dans la solution étalon en mg.ml⁻¹, V_M : Volume prélevé de la solution mère en ml (un volume final de 5 ml est considéré).

III.2.2. b) Préparation de la matrice de validation de méthode

Cette étape consiste à vérifier la fiabilité de la méthode ou des modèles mathématiques construits en utilisant des mélanges synthétiques de concentrations connues (Tableau III.3).

Tableau III.3 : Composition des mélanges synthétiques (matrice de validation).

Étalon	Eugénol		Acétate d'eugényle		Acide salicylique		Acide cinnamique	
	C_F (mg.ml ⁻¹)	V_M (ml)	C_F (mg.ml ⁻¹)	V_M (ml)	C_F (mg.ml ⁻¹)	V_M (ml)	C_F (mg.ml ⁻¹)	V_M (ml)
Mélange synth.								
MS 01	1.40	0.70	1.50	0.75	0.50	0.25	0.20	0.10
MS 02	1.80	0.90	1.80	0.90	0.90	0.45	0.40	0.20
MS 03	2.20	1.10	2.00	1.00	1.20	0.60	0.60	0.30
MS 04	2.70	1.35	2.60	1.30	1.60	0.80	0.70	0.35
MS 05	3.50	1.75	2.80	1.40	1.90	0.95	0.80	0.40

C_F : Concentration de l'étalon dans le mélange synthétique en mg.ml⁻¹, V_M : Volume prélevé de la solution mère en ml (le volume considéré était 5 ml).

Pour chaque mélange de la matrice de calibration et de validation, nous avons réalisé 5 analyses IRTF dépendantes parmi lesquelles seulement 4 répliques spectrales ont été sélectionnées.

III.2.3. Étapes de la création d'une méthode Quant 2

Les étapes d'édition de la méthode Quant 2 sont répétitives où le logiciel intégré c'est lui qui fait tous les calculs. Il faut juste comprendre bien en premier lieu les commandes à inviter. Ces commandes sont comme suit :

- Sur la barre d'outils au-dessus, cliquer sur « Composantes » puis sur « Ajouter une composante », spécifier après la désignation et l'unité des composantes.
- Sur « Spectres », ajouter les spectres avec leurs répliques ensuite sélectionner dans le set de données ceux spectres qui vont être utilisés pour le calibrage, les tests ou ceux qui seront complètement exclus.
- Appuyer sur « Configuration », sélectionner « Gammes d'optimisation définies par l'utilisateur » puis « Gammes A,B (max. 10) » et après « sélection interactive ». À cette fenêtre, le choix des gammes doit être judicieux et englobe les bandes d'intérêt.
- L'option « Options de traitement des données » permet de choisir le type de traitement spectral avant l'optimisation ce qui peut améliorer plus les résultats.

La figure III.4 explique avec numérotation les étapes suivies lors de la configuration.

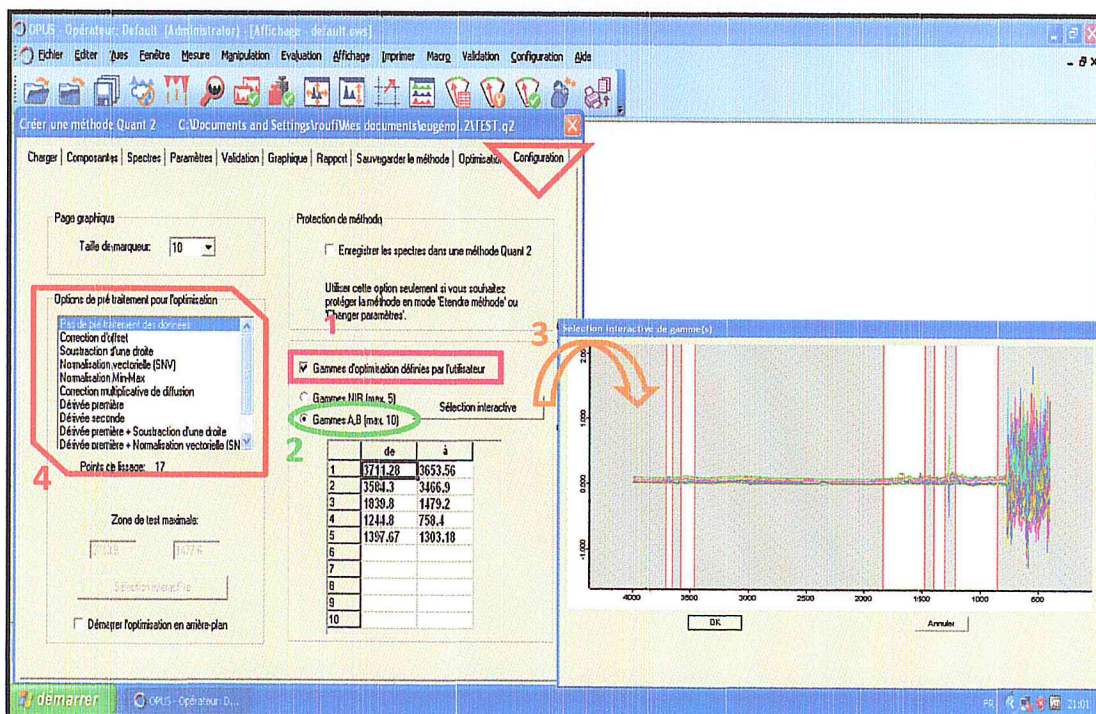


Figure III.4 : Étapes de travail numérotées suivies dans la fenêtre de configuration.

- Dans « Validation », taper dans « rang max. » la valeur de la variable latente généralement on met "15" pour toutes les composantes, on choisit la composante à tester en appuyant sur « actif » ensuite on met dans la zone du « Nombre d'échantillon exclus » le nombre de répliques spectrales.
- Maintenant sur « Optimisation », sélectionner « Général A » puis appuyer sur « Optimiser », l'ordinateur va traiter les données, cette opération peut prendre quelques secondes. Une fois elle se termine, choisir la région appropriée et cliquer sur « Utiliser les paramètres » (Figure III.5).

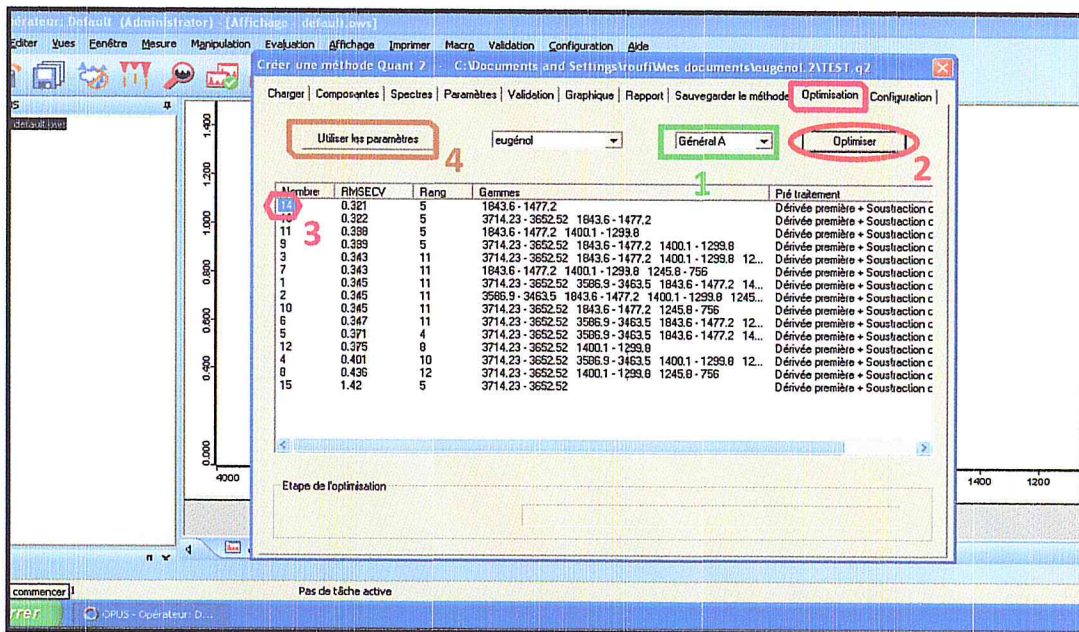


Figure III.5 : Étapes à suivre lors de l'optimisation.

- Directement après l'étape précédente, le logiciel va se transférer vers la validation, il suffit juste de sélectionner un des deux paramètres : « Validation croisée » si on veut prendre le *RMSECV* comme un paramètre principal ou bien « Test du set de validation » si le *RMSEP* sera lui le paramètre principal. Cliquer enfin sur « Valider » et « OK ».
- Après « Validation », la fenêtre « Graphique » va afficher automatiquement les résultats sous forme de graphes et de tableaux.
- Finalement, dans la barre d'outils cliquer sur « Sauvegarder la méthode », définir le rang de la méthode et appuyer sur « Sauvegarder la méthode », à cette étape

sélectionner les modèles choisis, entrer un nom correspondant à la méthode puis « Sauvegarder ».

III.2. 4. Paramètres analytiques fournis par le logiciel

Le logiciel Quant 2 présente les résultats sous forme de représentations graphiques ou sous forme de tableaux et afin de valider les méthodes optimisées, le logiciel présente les paramètres analytiques suivants :

- **R^2** : Le coefficient de détermination donne le pourcentage de variance présent dans les valeurs des composantes réelles, qui est reproduit dans la prédiction. R^2 approche 100% quand les valeurs de concentration prédites approchent les valeurs réelles.
- **Rang** (*facteur* ou bien *variable latente*) : c'est le nombre de vecteurs PLS utilisés dans le Quant 2.
- **RMSEP** (ou *Erreur Quadratique Moyenne de Prédiction*) : dans le cas de test du set de validation, la valeur de l'erreur *RMSEP* peut être prise comme critère pour juger la qualité de la prédiction du modèle utilisé.
- **RMSEE** (ou *Erreur Quadratique Moyenne d'Estimation*) : ce critère détermine respectivement la précision et la dispersion statistique des estimations de calibrage.
- **RMSECV** (ou *Erreur Quadratique Moyenne de Validation Croisée*) : les valeurs de *RMSECV* sont utilisées pour estimer la fiabilité d'un modèle quand la méthode de la validation croisée est choisie.

La figure III.6 montre un exemple de représentations graphiques des paramètres analytiques en considérant le *RMSECV* comme paramètre principal. Les diagrammes (A) illustrent l'adaptation aux valeurs paramétrées, c-à-d la corrélation entre la valeur prédite et la valeur réelle, (B) représente la différence par rapport aux valeurs paramétrées, c-à-d la dispersion de l'erreur absolue par rapport à la valeur réelle, (C) montre la corrélation entre le *RMSECV* et le rang et enfin (D) illustre le coefficient de détermination R^2 en fonction du rang de la méthode. Les quatre diagrammes obtenus permettent d'apprécier la qualité de la série de calibrage.

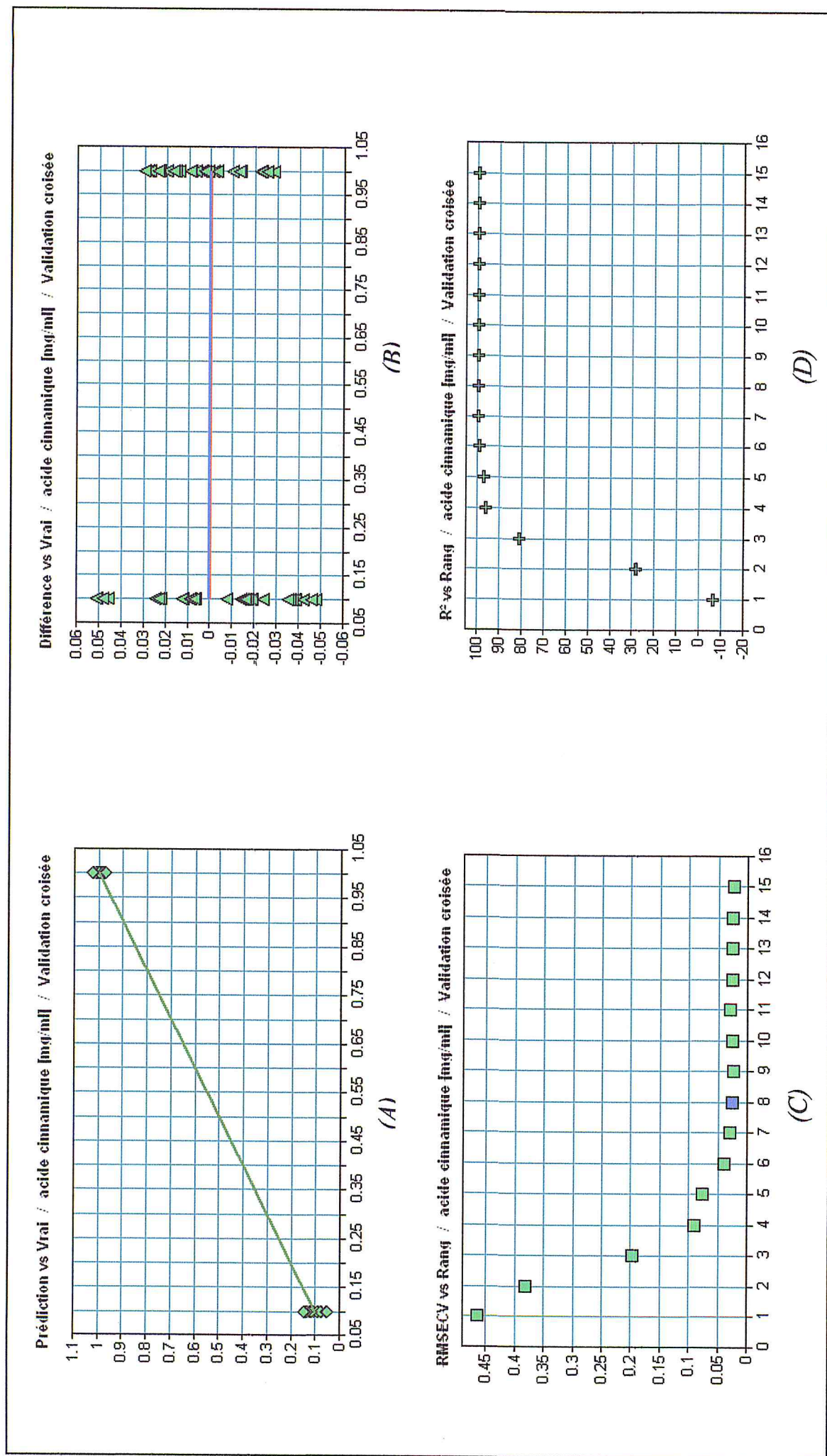


Figure III.6 : Exemple de représentations graphiques des paramètres analytiques d'un composé chimique en fonction de RMSECV.

Le tableau III.4 fournit par le logiciel, résumé dans un seul rapport les résultats de calibrage et des tests de chaque composante à part. Chaque table contient toutes les informations relatives de la calibration et la validation ainsi que toutes les données relatives à la composante choisie de la solution de calibrage.

Tableau III.4 : Rapport de validation fourni par le logiciel Quant 2.

Rapport de validation				
Information générale				
Fichier méthode:	PAS DE PRE TRT.1.q2			
Standards (total):	64			
Spectres de calibrage:	64			
Spectres de test:	20			
Bloc de données:	AB			
Composantes (total):	4			
Gammes spectrales:	4			
Points utilisés:	684			
Centrage moyen:	Oui			
Pré traitement:	Pas de pré traitement des données			
Gammes spectrales:				
de	à			
3715.19	3652.62			
3586.9	3462.6			
1843.6	1476.2			
1401	1299.8			
acide cinnamique				
Gamme de concentration:	0.2 - 0.8			
Unités:	mg/ml			
Type de validation:	Test du set de validation			
Erreur de prédiction moyenne				
Rang	R ²	RMSEP	Rang recom	
1	32.23	0.177		
2	69.18	0.12		
3	53.5	0.147		
4	79.88	0.0966		
5	93.98	0.0529		
6	96.95	0.0376		
7	92.93	0.0573		
8	95.14	0.0475		
9	99.46	0.0158		+
10	96.95	0.0376		
11	97.45	0.0344		
12	93.14	0.0564		
13	82.38	0.0904		
14	66.19	0.125		
15	59.25	0.138		
Valeurs de composantes				
Rang utilisé:	9			
Fichier	Vrai	Prédiction	Différence	Intrus poss
MS1-2.jws.dx	0.2	0.2277	-0.0277	
MS1-3.jws.dx	0.2	0.2183	-0.0183	
MS1-4.jws.dx	0.2	0.2192	-0.0192	
MS1-5.jws.dx	0.2	0.2049	-0.00494	
MS2-2.jws.dx	0.4	0.4233	-0.0233	
MS2-3.jws.dx	0.4	0.4052	-0.00517	
MS2-4.jws.dx	0.4	0.412	-0.012	
MS2-5.jws.dx	0.4	0.4142	-0.0142	
MS3-2.jws.dx	0.6	0.6154	-0.0154	
MS3-3.jws.dx	0.6	0.5934	0.00664	
MS3-4.jws.dx	0.6	0.5969	0.0031	
MS3-5.jws.dx	0.6	0.6001	-0.000108	
MS4-2.jws.dx	0.7	0.7149	-0.0149	
MS4-3.jws.dx	0.7	0.7017	-0.00167	
MS4-4.jws.dx	0.7	0.7029	-0.0029	
MS4-5.jws.dx	0.7	0.7102	-0.0102	
MS5-2.jws.dx	0.8	0.8277	-0.0277	
MS5-3.jws.dx	0.8	0.8111	-0.0111	
MS5-4.jws.dx	0.8	0.833	-0.033	
MS5-5.jws.dx	0.8	0.8017	-0.00171	

III.2. 5. Paramètres d'optimisation des modèles mathématiques

Le Quant 2 permet d'établir différents paramètres de régression comme les gammes d'optimisation, l'option de prétraitement spectral, les régions spectrales utilisées et le rang jusqu'à atteindre les meilleurs résultats possibles.

Le prétraitement des données est une étape importante dans l'exécution d'un étalonnage. Pour assurer la reproductibilité des échantillons d'étalonnage, plusieurs spectres de chaque échantillon doivent être acquis. Si les spectres du même échantillon ne sont pas identiques, une procédure de prétraitement des données doit être choisie pour les aligner les uns avec les autres.

Le but du prétraitement des données est donc d'assurer une bonne corrélation entre les données spectrales et les valeurs de concentration. Les méthodes suivantes peuvent être appliquées :

- **Correction d'offset** : déplace les spectres afin de régler le minimum de y à zéro.
- **Soustraction d'une droite** : s'adapte à une ligne droite du spectre et la soustrait. Cela explique une inclinaison dans le spectre enregistré.
- **Dérivée première** : calcule la première dérivée du spectre. Cette méthode met l'accent sur les bords abrupts d'un pic. Il est utilisé pour souligner les caractéristiques prononcées, mais les petites fonctionnalités sur un large fond. Le bruit spectral est également amélioré.

Aucune recommandation générale ne peut être donnée si un ensemble de données donné doit être prétraité ou quelle méthode convient le mieux pour cela. Par conséquent, la méthode de prétraitement des données optimales ne peut être trouvée que de manière empirique en appliquant plusieurs méthodes à vos données spectrales et en comparant les résultats.

Dans cette étude nous avons optimisé tous ces paramètres et les résultats sont résumés dans les tableaux de III.6 à III.9 pour les quatre étalons. Chaque tableau contient toutes les données relatives à la composante choisie des solutions de calibrage, les erreurs calculées $RMSEP$, $RMSEE$, $RMSECV$ et le R^2 pour chaque erreur.

Le paramètre principal suivi pour établir les modèles, dans notre étude, était l'erreur quadratique moyenne de prédiction ($RMSEP$).

A) Acide cinnamique

Tableau III.5 : Résultats d'optimisation, de calibrage et de validation de l'acide *cinnamique*.

Traitement spectrale	Région spectrale	Rang	RMSEP	R ²	RMSE-CV	R ²	RMSEE	R ²
Pas de prétraitement des données	3715.19-3652.52 3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	5	0.052	93.98	0.087	96.21	0.046	99.02
		6	0.037	96.95	0.089	96.05	0.034	99.47
		7	0.057	92.93	0.037	99.32	0.017	99.86
		8	0.047	95.14	0.037	99.32	0.016	99.89
	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2	5	0.038	96.79	0.089	96.02	0.042	99.20
		6	0.028	98.29	0.081	96.70	0.089	96.02
		7	0.038	96.73	0.032	99.49	0.042	99.20
		8	0.037	97.06	0.035	99.36	0.089	96.20
	3586.9-3462.6 1401-1299.8	5	0.142	66.34	0.229	74.09	0.117	93.83
		6	0.106	77.74	0.165	86.56	0.109	94.77
		7	0.111	73.67	0.146	89.47	0.079	97.24
		8	0.123	67.61	0.070	97.56	0.039	99.36
Correction d'offset	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	5	0.016	99.41	0.096	95.40	0.035	99.94
		6	0.035	97.23	0.057	98.35	0.023	99.76
		7	0.034	97.38	0.027	99.63	0.015	99.90
		8	0.066	90.52	0.031	99.52	0.011	99.94
	1843.6-1476.2 1401-1299.8	5	0.034	99.47	0.094	95.63	0.034	99.47
		6	0.022	99.77	0.057	98.35	0.022	99.77
		7	0.016	99.89	0.029	99.57	0.016	99.89
		8	0.013	99.92	0.030	99.53	0.013	99.92
Soustraction d'une droite	1843.6-1476.2 1401-1299.8	4	0.027	98.40	0.052	98.64	0.034	99.46
		5	0.035	97.31	0.034	99.47	0.021	99.79
		6	0.027	98.35	0.021	99.77	0.013	99.92
		7	0.015	99.51	0.020	99.80	0.009	99.96
	3715.19-3652.52 3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	4	0.027	98.43	0.051	98.70	0.033	99.50
		5	0.034	97.42	0.034	99.42	0.021	99.80
		6	0.027	98.35	0.022	99.75	0.013	99.92
		7	0.013	99.62	0.020	99.79	0.010	99.96
	1843.6-1476.2	4	0.026	98.51	0.052	98.63	0.034	99.45
		5	0.034	97.47	0.035	99.39	0.021	99.79
		6	0.026	98.46	0.021	99.77	0.013	99.92
		7	0.013	99.59	0.020	99.79	0.010	99.95
Dérivée première	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	4	0.047	98.99	0.090	96.00	0.047	98.99
		5	0.024	99.72	0.042	99.09	0.024	99.72
		6	0.018	99.85	0.029	99.56	0.018	99.85
		7	0.014	99.91	0.028	99.60	0.014	99.90
	1843.6-1476.2 1401-1299.8	4	0.133	61.99	0.079	96.29	0.043	99.15
		5	0.127	65.44	0.037	99.30	0.021	99.79
		6	0.115	71.75	0.029	99.58	0.018	99.85

Suite :

Dérivée première	3586.9-3462.6 1401-1299.8	5	0.073	88.28	0.120	92.89	0.046	99.04
		6	0.076	87.56	0.077	97.06	0.046	99.05
		7	0.121	68.46	0.084	96.50	0.041	99.26
		8	0.134	61.53	0.089	96.02	0.039	99.35
Dérivée première + soustraction d'une droite	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	4	0.137	59.55	0.089	96.05	0.046	99.01
		5	0.133	62.14	0.040	99.08	0.024	99.73
		6	0.117	70.65	0.029	99.56	0.018	99.85
	1843.6-1476.2 1401-1299.8	4	0.136	60.37	0.084	96.48	0.047	99.97
		5	0.130	63.51	0.037	99.31	0.021	99.79
		6	0.118	69.91	0.029	99.57	0.018	99.85
	3586.9-3462.6 1401-1299.8	4	0.092	81.61	0.147	89.33	0.098	95.55
		5	0.079	86.53	0.138	90.58	0.093	96.08

B) Acide salicylique :

Tableau III.6 : Résultats d'optimisation, de calibrage et de validation pour l'acide salicylique.

Traitement spectrale	Région spectrale	Rang	RMSEP	R ²	RMSE-CV	R ²	RMSEE	R ²	
Pas de prétraitement des données	3715.19-3652.52 1843.6-1476.2	5	0.078	97.51	0.093	98.92	0.041	99.80	
		6	0.076	97.62	0.062	99.52	0.036	99.86	
		7	0.076	97.63	0.045	99.75	0.024	99.94	
		8	0.075	97.70	0.039	99.81	0.023	99.94	
	1843.6-1476.2	5	0.080	97.39	0.082	99.17	0.055	99.66	
		6	0.080	97.39	0.062	99.52	0.036	99.85	
		7	0.079	97.42	0.045	99.75	0.029	99.91	
		8	0.096	96.24	0.032	99.87	0.021	99.95	
	3715.19-3652.52 3586.9-3462.6 1843.6-1476.2	5	0.080	97.36	0.088	99.04	0.037	99.84	
		6	0.080	97.37	0.058	99.58	0.033	99.87	
		7	0.084	97.10	0.037	99.82	0.022	99.95	
		8	0.084	97.11	0.035	99.84	0.022	99.95	
	Correction d'offset	3715.19-3652.52 1843.6-1476.2	5	0.074	97.73	0.077	99.27	0.048	99.74
			6	0.081	97.31	0.060	99.54	0.036	99.86
			7	0.072	97.88	0.039	99.81	0.026	99.92
			8	0.079	97.41	0.043	99.77	0.023	99.94
3715.19-3652.52 1843.6-1476.2 1401-1299.8		5	0.075	97.70	0.073	99.33	0.048	99.74	
		6	0.081	97.31	0.070	99.38	0.038	99.83	
		7	0.073	97.83	0.040	99.80	0.027	99.92	
		8	0.082	97.22	0.038	99.82	0.021	99.95	
1843.6-1476.2		5	0.187	85.75	0.073	99.33	0.037	99.84	
		6	0.107	95.33	0.059	99.56	0.030	99.90	
		7	0.095	96.25	0.041	99.79	0.026	99.92	

Soustraction d'une droite	3715.19-3652.52 1843.6-1476.2	4	0.085	97.00	0.062	99.52	0.046	99.75	
		5	0.082	97.24	0.045	99.75	0.031	99.89	
		6	0.080	97.34	0.037	99.82	0.026	99.92	
		7	0.089	96.76	0.041	99.79	0.023	99.94	
	3715.19-3652.52 3586.9-3462.6 1843.6-1476.2	4	0.085	97.00	0.071	99.37	0.047	99.74	
		5	0.082	97.24	0.045	99.74	0.032	99.89	
		6	0.080	97.34	0.037	99.82	0.026	99.92	
		7	0.089	96.76	0.041	99.78	0.023	99.94	
	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2	4	0.087	96.90	0.071	99.36	0.048	99.74	
		5	0.084	97.12	0.044	99.75	0.031	99.89	
		6	0.081	97.29	0.037	99.82	0.026	99.92	
		7	0.094	96.40	0.043	99.77	0.022	99.95	
Dérivée première	1843.6-1476.2	3	0.15	89.74	0.072	99.35	0.055	99.64	
		4	0.16	89.58	0.055	99.61	0.039	99.83	
		5	0.19	83.88	0.040	99.80	0.026	99.92	
		6	0.19	83.88	0.040	99.80	0.027	99.92	
		7	0.23	78.09	0.052	99.66	0.025	99.93	
		8	0.14	91.01	0.066	99.45	0.023	99.94	
	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2	3	0.159	89.70	0.075	99.30	0.056	99.62	
		4	0.161	89.43	0.056	99.60	0.039	99.82	
		5	0.196	84.35	0.040	99.80	0.027	99.92	
		6	0.195	84.57	0.039	99.80	0.027	99.92	
		7	0.223	79.70	0.054	99.64	0.024	99.94	
		8	0.146	91.28	0.063	99.50	0.021	99.95	
	3715.19-3652.52 1843.6-1476.2	3	0.158	89.81	0.073	99.33	0.055	99.64	
		4	0.161	89.50	0.055	99.61	0.038	99.83	
		5	0.193	84.77	0.041	99.79	0.027	99.92	
		6	0.192	84.98	0.039	99.80	0.027	99.92	
		7	0.214	81.33	0.044	99.75	0.025	99.93	
		8	0.094	96.35	0.062	99.52	0.021	99.95	
	Dérivée première + soustraction d'une droite	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2	3	0.161	89.51	0.073	99.34	0.055	99.65
			4	0.162	89.29	0.055	99.62	0.038	99.83
			5	0.197	84.20	0.040	99.80	0.026	99.92
			6	0.196	84.44	0.039	99.81	0.026	99.92
			7	0.219	80.45	0.054	99.63	0.023	99.94
			8	0.114	94.75	0.063	99.50	0.020	99.96
1843.6-1476.2		3	0.161	89.43	0.071	99.36	0.055	99.65	
		4	0.162	89.31	0.055	99.62	0.038	99.83	
		5	0.201	83.56	0.040	99.80	0.026	99.92	
		6	0.200	83.64	0.040	99.80	0.026	99.92	
		7	0.229	78.67	0.053	99.64	0.024	99.93	
		8	0.102	95.77	0.065	99.47	0.022	99.95	
1843.6-1476.2 1401-1299.8		3	0.161	89.39	0.072	99.35	0.055	99.64	
		4	0.163	89.17	0.055	99.62	0.039	99.82	
		5	0.199	83.88	0.040	99.80	0.027	99.92	
		6	0.198	84.06	0.039	99.81	0.027	99.92	
		7	0.207	82.53	0.055	99.63	0.024	99.93	
		8	0.095	96.31	0.064	99.49	0.021	99.95	

C) Acétate d'eugényle :

Tableau III.7 : Résultats d'optimisation, de calibrage et de validation de l'acétate d'eugényle.

Traitement spectrale	Région spectrale	Rang	RMSEP	R ²	RMSE-CV	R ²	RMSEE	R ²
Pas de prétraitement des données	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2	5	0.117	93.58	0.173	98.35	0.088	99.61
		6	0.098	95.48	0.161	98.58	0.073	99.73
		7	0.086	96.49	0.082	99.63	0.046	99.89
		8	0.085	96.59	0.082	99.63	0.046	99.90
	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	5	0.095	95.73	0.156	98.66	0.076	99.71
		6	0.078	97.16	0.145	98.85	0.066	99.79
		7	0.084	96.66	0.082	99.62	0.047	99.89
		8	0.079	97.04	0.088	99.58	0.047	99.89
	3586.9-3462.6 1401-1299.8	5	0.067	97.90	0.098	99.47	0.071	99.74
		6	0.053	98.67	0.107	99.37	0.065	99.79
		7	0.064	98.09	0.109	99.35	0.061	99.82
		8	0.066	97.94	0.099	99.45	0.057	99.85
Correction d'offset	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	5	0.215	78.49	0.140	98.93	0.060	99.82
		6	0.209	79.62	0.110	99.34	0.054	99.86
		7	0.186	83.83	0.082	99.62	0.048	99.89
		8	0.078	97.12	0.104	99.40	0.046	99.90
	3715.19-3652.52 1843.6-1476.2 1401-1299.8	5	0.096	95.67	0.144	99.86	0.061	99.81
		6	0.092	96.00	0.120	99.21	0.057	99.84
		7	0.100	95.34	0.084	99.61	0.049	99.88
		8	0.096	95.67	0.112	99.31	0.044	99.91
	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2	5	0.215	78.38	0.165	98.50	0.067	99.77
		6	0.207	80.10	0.121	99.19	0.058	99.83
		7	0.176	85.50	0.086	99.59	0.049	99.88
		8	0.073	97.48	0.099	99.46	0.047	99.90
Soustraction d'une droite	3715.19-3652.52 3586.9-3462.6 1843.6-1476.2	5	0.056	98.53	0.096	99.49	0.062	99.87
		6	0.055	98.57	0.093	99.52	0.057	99.84
		7	0.095	95.72	0.094	99.51	0.043	99.91
		8	0.108	94.59	0.094	99.51	0.036	99.94
	3715.19-3652.52 3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	5	0.055	98.55	0.095	99.50	0.061	99.81
		6	0.054	98.63	0.093	99.52	0.057	99.84
		7	0.080	96.98	0.093	99.52	0.042	99.91
		8	0.083	96.78	0.094	99.51	0.035	99.94
	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	5	0.059	98.36	0.096	99.49	0.062	99.81
		6	0.060	98.28	0.092	99.53	0.057	99.84
		7	0.082	96.83	0.090	99.55	0.041	99.92
		8	0.079	97.08	0.093	99.52	0.035	99.94
Dérivée première	3715.19-3652.52 3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	4	0.076	97.29	0.096	99.49	0.063	99.80
		5	0.072	97.54	0.095	99.50	0.059	99.82
		6	0.082	96.84	0.096	99.49	0.058	99.83
		7	0.272	65.41	0.090	99.55	0.047	99.89

Suite :

Dérivée première	3586.9-3462.6	5	0.083	96.75	0.097	99.55	0.059	99.82
	1843.6-1476.2	6	0.091	96.07	0.094	99.48	0.058	99.83
	1401-1299.8	7	0.282	62.87	0.086	99.51	0.045	99.90
	3715.19-3652.52	4	0.099	95.37	0.098	99.46	0.069	99.76
	3586.9-3462.6	5	0.081	96.92	0.093	99.53	0.066	99.79
	1401-1299.8	6	0.181	84.64	0.107	99.37	0.058	99.84
		7	0.274	64.94	0.109	99.34	0.054	99.86
Dérivée première + soustraction d'une droite	3586.9-3462.6	5	0.099	95.35	0.099	99.46	0.060	99.82
	1843.6-1476.2	6	0.111	94.21	0.096	99.49	0.059	99.83
	1843.6-1476.2	5	0.101	95.26	0.104	99.40	0.062	99.81
	1401-1299.8	6	0.113	94.03	0.097	99.48	0.060	99.82
	3715.19-3652.52	5	0.079	97.02	0.100	99.45	0.062	99.81
	1843.6-1476.2 1401-1299.8	6	0.091	96.12	0.099	99.46	0.061	99.82

D) Eugénol :

Tableau III.8 : Résultats d'optimisation, de calibrage et de validation pour l'eugénol.

Traitement spectrale	Région spectrale	Rang	RMSEP	R ²	RMSE-CV	R ²	RMSEE	R ²
Pas de prétraitement des données	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	5	0.058	99.35	0.181	98.99	0.092	99.76
		6	0.047	99.57	0.141	99.38	0.077	99.83
		7	0.049	99.55	0.101	99.68	0.047	99.94
		8	0.041	99.51	0.090	99.75	0.046	99.94
	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2	5	0.033	99.79	0.171	99.09	0.086	99.79
		6	0.039	99.71	0.127	99.50	0.069	99.87
		7	0.058	99.36	0.094	99.72	0.046	99.94
		8	0.060	99.32	0.088	99.76	0.045	99.94
	1843.6-1476.2 1401-1299.8	5	0.037	99.73	0.098	99.70	0.052	99.92
		6	0.036	99.75	0.093	99.73	0.052	99.93
		7	0.045	99.62	0.108	99.64	0.047	99.94
		8	0.047	99.59	0.095	99.72	0.047	99.94
Correction d'offset	3715.19-3652.52 3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	5	0.049	99.55	0.144	99.36	0.065	99.88
		6	0.046	99.59	0.123	99.53	0.063	99.89
		7	0.050	99.53	0.102	99.68	0.059	99.90
		8	0.159	95.28	0.112	99.61	0.048	99.94
	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	5	0.049	99.54	0.134	99.45	0.066	99.88
		6	0.044	99.62	0.117	99.58	0.063	99.89
		7	0.056	99.39	0.103	99.67	0.060	99.90
		8	0.144	96.12	0.117	99.58	0.047	99.94
	3715.19-3652.52 1843.6-1476.2 1401-1299.8	5	0.051	99.51	0.130	99.48	0.066	99.88
		6	0.047	99.58	0.115	99.59	0.064	99.89
		7	0.048	99.56	0.114	99.60	0.060	99.90
		8	0.095	98.31	0.105	99.66	0.048	99.94
Soustraction d'une droite	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2	3	0.031	99.82	0.096	99.71	0.070	99.86
		4	0.031	99.81	0.085	99.77	0.060	99.90
		5	0.033	99.79	0.093	99.73	0.059	99.90
		6	0.088	98.55	0.107	99.65	0.052	99.92
	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	3	0.031	99.82	0.094	99.72	0.069	99.86
		4	0.031	99.81	0.086	99.77	0.060	99.90
		5	0.033	99.79	0.093	99.73	0.060	99.90
		6	0.048	99.55	0.100	99.67	0.057	99.91
Dérivée première	3715.19-3652.52 3586.9-3462.6 1843.6-1476.2	4	0.154	95.57	0.106	99.66	0.065	99.88
		5	0.173	94.42	0.096	99.71	0.062	99.89
		6	0.185	93.56	0.100	99.69	0.061	99.90
		7	0.258	87.56	0.100	99.69	0.053	99.92
	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	4	0.141	96.26	0.107	99.65	0.067	99.87
		5	0.169	94.62	0.097	99.71	0.061	99.89
		6	0.175	94.25	0.101	99.69	0.061	99.90
		7	0.218	91.10	0.104	99.66	0.055	99.92

Suite :

Dérivée première + soustraction d'une droite	3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	4	0.151	95.73	0.108	99.64	0.065	99.88
		5	0.176	94.22	0.095	99.72	0.061	99.89
		6	0.181	93.85	0.098	99.70	0.061	99.90
		7	0.235	89.43	0.105	99.66	0.053	99.92
	3715.19-3652.52 3586.9-3462.6 1843.6-1476.2 1401-1299.8	4	0.150	95.76	0.105	99.66	0.065	99.88
		5	0.170	94.59	0.096	99.71	0.062	99.89
		6	0.178	94.07	0.101	99.69	0.061	99.90
		7	0.240	88.83	0.102	99.68	0.053	99.92
	1843.6-1476.2 1401-1299.8	4	0.150	95.72	0.111	99.62	0.067	99.87
		5	0.182	93.76	0.096	99.71	0.062	99.89
		6	0.189	93.29	0.099	99.69	0.061	99.90
		7	0.254	87.91	0.105	99.66	0.054	99.92

Les modèles de calibration en **gras** sont les modèles choisis pour faire les tests de validation, le choix était basé sur les valeurs des différents paramètres analytiques.

III.2. 6. Détermination des concentrations des mélanges synthétiques par calibration interne (Test du set de validation)

L'application choisie pour vérifier l'efficacité des modèles PLS développés était la détermination simultanée par la méthode de calibration interne de l'acide *cinnamique*, l'acide salicylique, l'acétate d'eugényle et l'eugénol dans les mélanges synthétiques préparés auparavant (Tableau III.3). Les résultats sont représentés dans les tableaux de III.9 à III.12 et les figures de III.7 à III.10.

Tableau III.9 : Résultats de calibrage pour l'acide cinnamique.

Informations générales			
Standards (total) :	84	Gammes spectrales (cm ⁻¹) :	
Spectres de calibrage :	64	de	à
Spectres de test :	20	1843.6	1476.2
Composantes (total) :	4	1401	1299.8
Points utilisés :	488		
Acide cinnamique			
Gamme de concentration :	0.2 – 0.8		
Unités :	mg/ml		
Type de validation :	Test du set de validation		
Erreur de prédiction moyenne			
Rang de méthode	R ²	RMSEP	
7	99.51	0.0150	
Valeurs de concentration des composantes			
Solution étalon	Vrai	Prédiction ($x \pm \delta$)	Différence* ($x \pm \delta$)
Mélange synthétique 1	0.2	0.2054 ± 0.0089	-0.005 ± 0.009
Mélange synthétique 2	0.4	0.4180 ± 0.0085	-0.018 ± 0.008
Mélange synthétique 3	0.6	0.6018 ± 0.0090	-0.018 ± 0.009
Mélange synthétique 4	0.7	0.7057 ± 0.0069	-0.005 ± 0.007
Mélange synthétique 5	0.8	0.8195 ± 0.0145	-0.018 ± 0.016
$(x \pm \delta)$: Valeur moyenne ± Déviation standard pour (n=5), cinq valeurs dépendantes.			
*Différence = Valeur réelle – Valeur de prédiction.			

Tableau III.10 : Résultats de calibrage pour l'acide salicylique.

Informations générales			
Standards (total) :	84	Gammes spectrales (cm ⁻¹) :	
Spectres de calibrage :	64	de	à
Spectres de test :	20	3715.19	3652.52
Composantes (total) :	4	1843.6	1476.2
Points utilisés :	448		
Acide salicylique			
Gamme de concentration :	0.5 – 1.9		
Unités :	mg/ml		
Type de validation :	Test du set de validation		
Erreur de prédiction moyenne			
Rang de méthode	R ²	RMSEP	
4	97.82	0.073	
Valeurs de concentration des composantes			
Solution étalon	Vrai	Prédiction ($x \pm \delta$)	Différence* ($x \pm \delta$)
Mélange synthétique 1	0.5	0.4469 ± 0.0044	0.0531 ± 0.0044
Mélange synthétique 2	0.9	1.042 ± 0.0101	-0.142 ± 0.0101
Mélange synthétique 3	1.2	1.173 ± 0.0174	0.0268 ± 0.0175
Mélange synthétique 4	1.6	1.541 ± 0.0137	0.0594 ± 0.0136
Mélange synthétique 5	1.9	1.889 ± 0.0261	0.0113 ± 0.0258
$(x \pm \delta)$: Valeur moyenne ± Déviation standard pour (n=5), cinq valeurs dépendantes.			
*Différence = Valeur réelle – Valeur de prédiction.			

Tableau III.11 : Résultats de calibrage pour l'acétate d'eugényle.

Informations générales			
Standards (total) :	84	Gammes spectrales (cm ⁻¹) :	
Spectres de calibrage :	64	de	à
Spectres de test :	20	3586.9	3462.6
Composantes (total) :	4	1843.6	1476.2
Points utilisés :	618	1401	1299.8
Acétate d'eugényle.			
Gamme de concentration :	1.6 – 2.8		
Unités :	mg/ml		
Type de validation :	Test du set de validation		
Erreur de prédiction moyenne			
Rang de méthode	R ²	RMSEP	
7	96.66	0.0846	
Valeurs de concentration des composantes			
Solution étalon	Vrai	Prédiction ($x \pm \delta$)	Différence* ($x \pm \delta$)
Mélange synthétique 1	1.5	1.660 ± 0.0184	-0.0609 ± 0.0183
Mélange synthétique 2	1.8	1.758 ± 0.0171	0.0417 ± 0.0169
Mélange synthétique 3	2.0	1.969 ± 0.0469	0.0313 ± 0.0469
Mélange synthétique 4	2.6	2.526 ± 0.0237	0.0743 ± 0.0234
Mélange synthétique 5	2.8	2.731 ± 0.0591	0.0693 ± 0.0592
($x \pm \delta$) : Valeur moyenne ± Déviation standard pour (n=5), cinq valeurs dépendantes.			
*Différence = Valeur réelle – Valeur de prédiction.			

Tableau III.12 : Résultats de calibrage pour l'eugénol.

Informations générales			
Standards (total) :	84	Gammes spectrales (cm ⁻¹) :	
Spectres de calibrage :	64	de	à
Spectres de test :	20	3586.9	3462.6
Composantes (total) :	4	1843.6	1476.2
Points utilisés :	618	1401	1299.8
Acétate d'eugényle.			
Gamme de concentration :	1.6 – 2.8		
Unités :	mg/ml		
Type de validation :	Test du set de validation		
Erreur de prédiction moyenne			
Rang de méthode	R ²	RMSEP	
3	99.82	0,0314	
Valeurs de concentration des composantes			
Solution étalon	Vrai	Prédiction ($x \pm \delta$)	Différence* ($x \pm \delta$)
Mélange synthétique 1	1.5	1.660 ± 0.0184	-0.0609 ± 0.0183
Mélange synthétique 2	1.8	1.758 ± 0.0171	0.0417 ± 0.0169
Mélange synthétique 3	2.0	1.969 ± 0.0469	0.0313 ± 0.0469
Mélange synthétique 4	2.6	2.526 ± 0.0237	0.0743 ± 0.0234
Mélange synthétique 5	2.8	2.731 ± 0.0591	0.0693 ± 0.0592
($x \pm \delta$) : Valeur moyenne ± Déviation standard pour (n=5), cinq valeurs dépendantes.			
*Différence = Valeur réelle – Valeur de prédiction.			

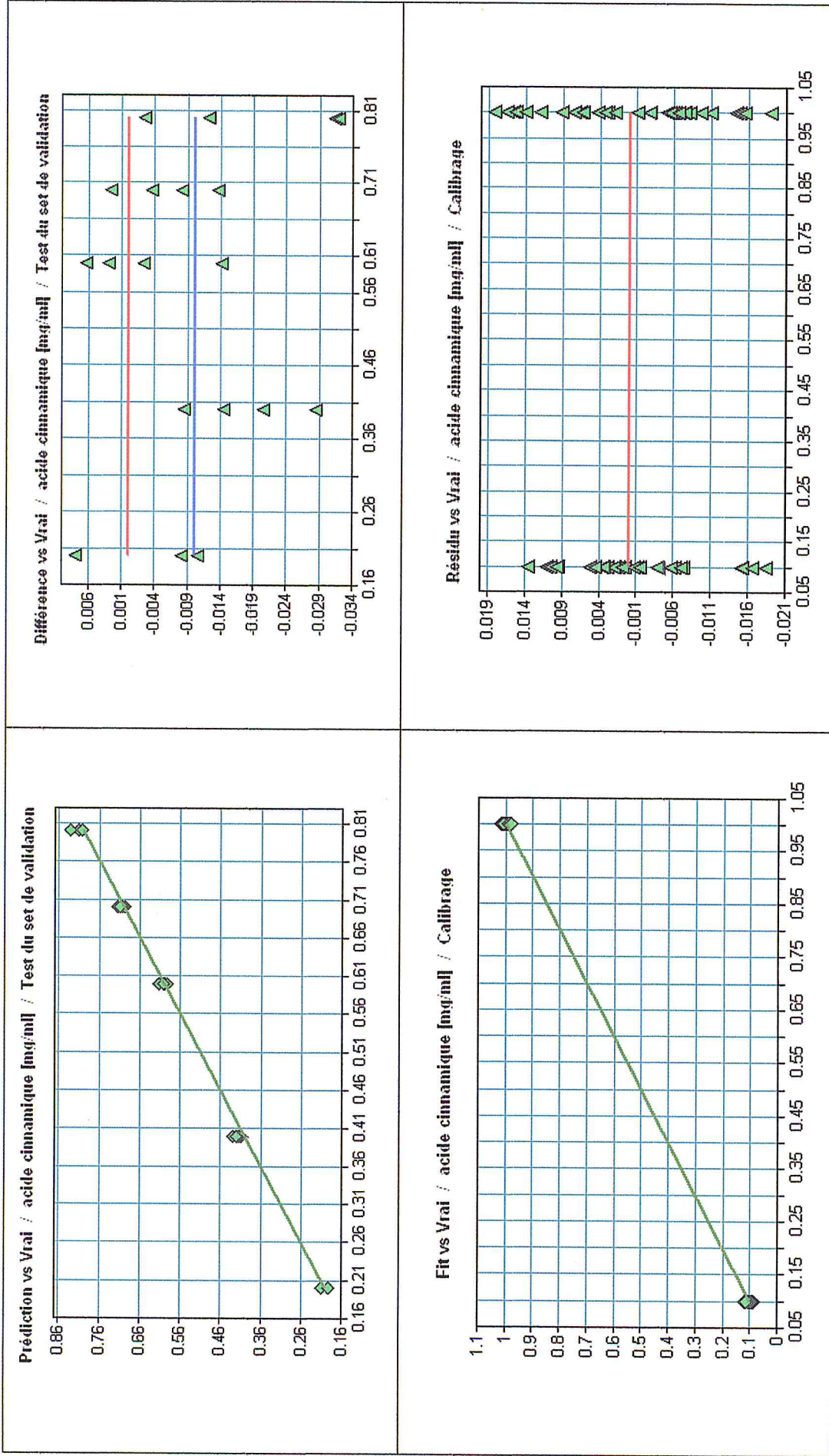


Figure III.7 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'acide cinnamique.

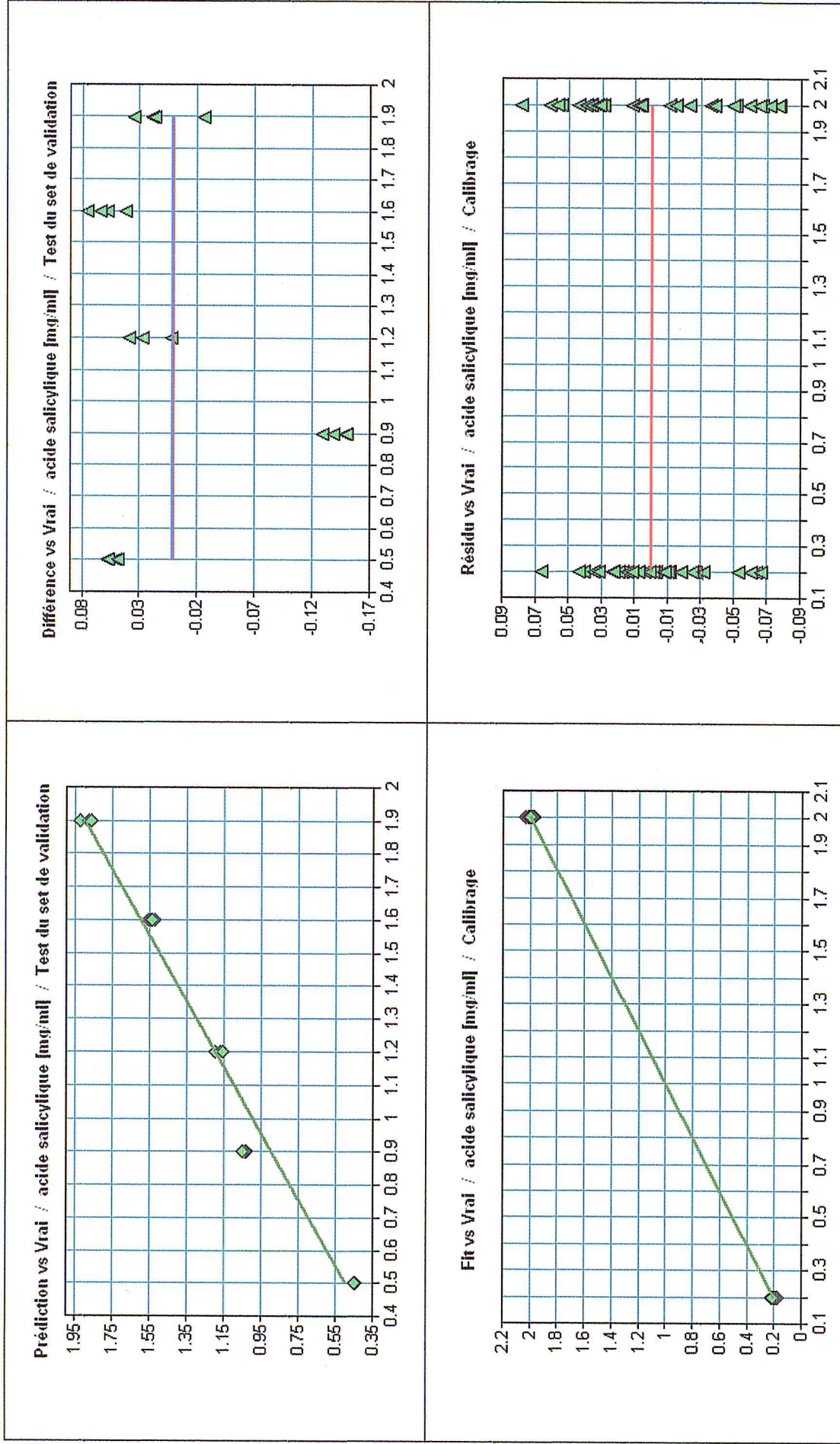


Figure III.8 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'acide salicyclique.

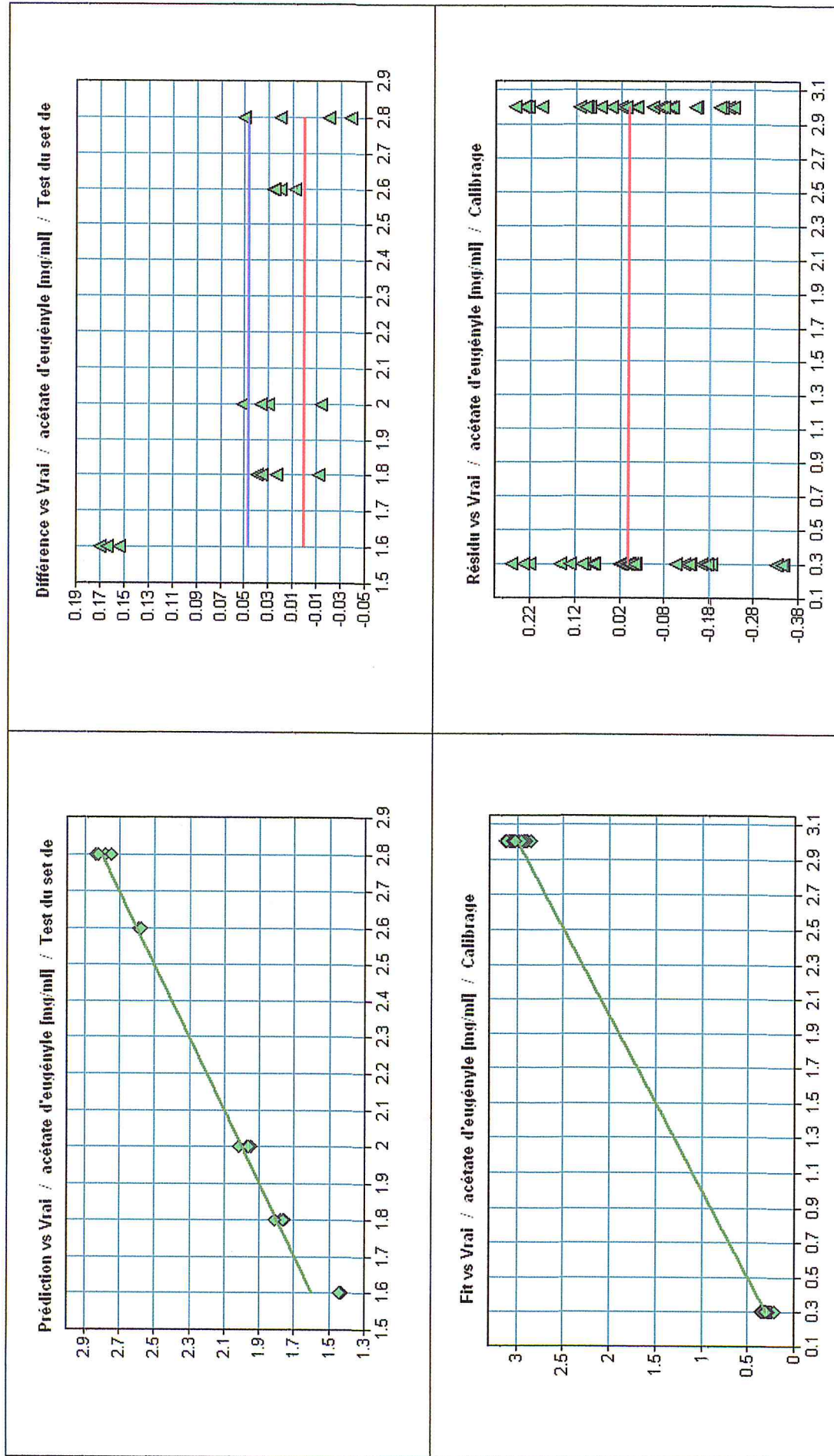


Figure III.9 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'acétate d'eugényle.

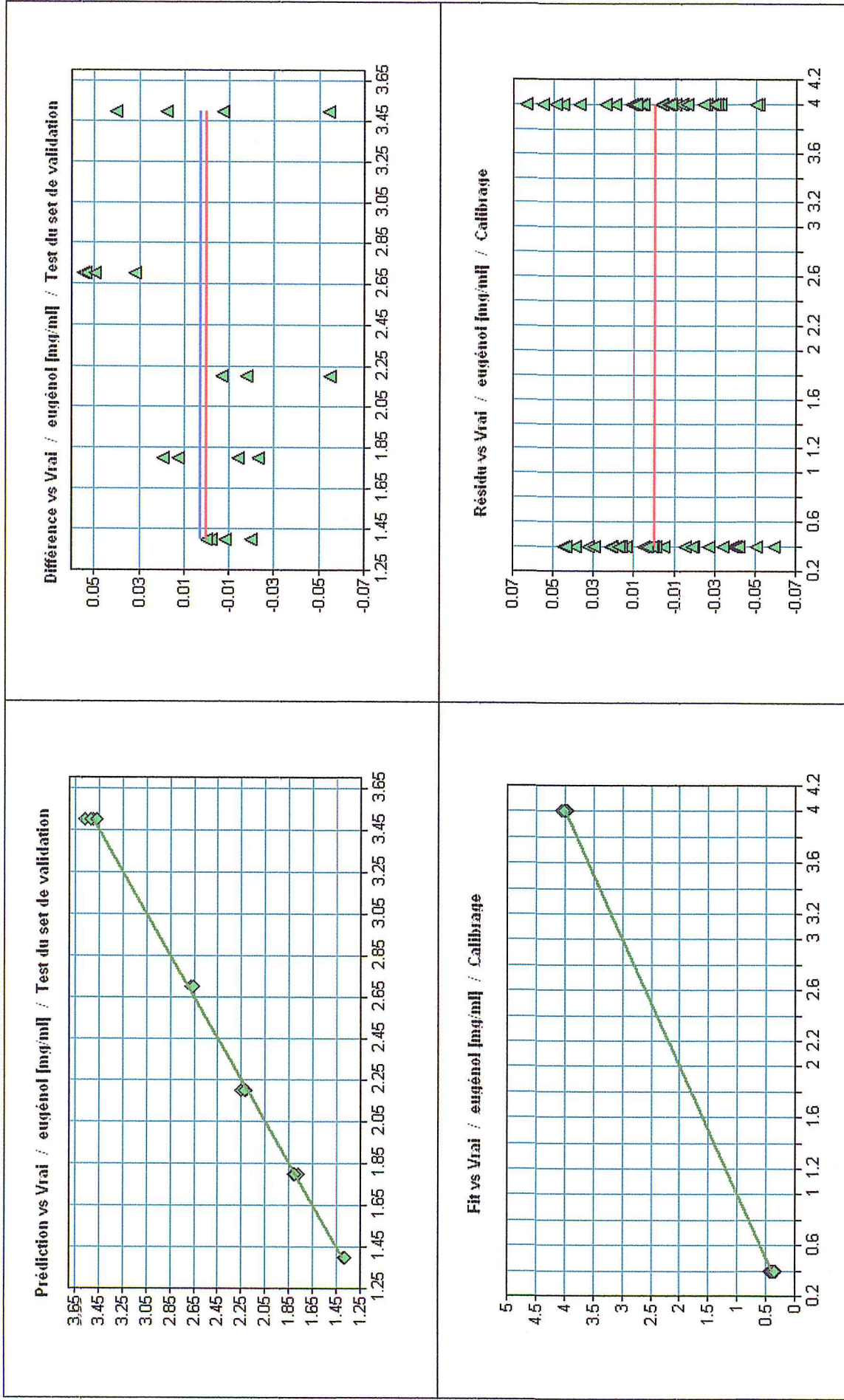


Figure III.10 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'eugéno.

Suite aux résultats de ces analyses consécutives, on peut conclure que les modèles PLS développés sont adéquats pour la détermination simultanée des quatre étalons.

Les quatre modèles donnent de bons coefficients de détermination ($99 > R^2 > 96$) et des erreurs *RMSEP* inférieurs à 0.08 permettant d'estimer la bonne qualité du calibrage. Les meilleurs paramètres analytiques sont obtenus pour l'acide cinnamique.

III.3. Origine et identification des clous de girofle

Le clou de girofle utilisé pour l'étude quantitative des composés phénoliques par la spectroscopie IRTF provient de l'Indonésie. Il a une forme de clous, de couleur brun foncé. (Figure III.11).



Figure III.11 : Aspect macroscopique des clous de girofle.

III.3.1. Préparation de l'huile essentielle et de l'extrait des clous de girofle

Les clous de girofle achetés ont été broyés grossièrement et stockés dans un endroit sec et à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation.

III.3.1. a. Préparation de l'huile essentielle par hydrodistillation

Une masse bien déterminée de la poudre des clous de girofle a été introduite dans un ballon de 1000 ml rempli au deux tiers d'eau distillée et quelques graines de pierres ponce. Le mélange a été chauffé. Les vapeurs d'eau ont été condensées à l'aide d'un réfrigérant et recueillies dans un erlenmeyer.

Le distillat obtenu a une odeur caractéristique et un aspect blanchâtre.

Afin de récupérer l'huile essentielle, environ 9 g de sel (NaCl) ont été ajoutés au distillat et le mélange a été agité jusqu'à dissolution complète du sel. Le contenu de l'erlenmeyer a été versé dans une ampoule à décanter, et mélangé avec un volume bien

déterminé de solvant (soit le cyclohexane ou l'éther diéthylique). Le mélange solvant-distillat a été agité au moins pendant deux minutes et dégazé.

Après décantation, la phase organique a été séparée. Trois extractions successives ont été répétées afin d'épuiser la phase aqueuse.

Ensuite, les phases organiques récupérés des quatre extractions ont été regroupées, séchées par une quantité de $MgSO_4$ et filtrées sur du papier filtre. Puis, le filtrat a été évaporé sous vide en utilisant un évaporateur rotatif.

Finalement, l'huile essentielle récupérée est gardée dans un réfrigérateur à $+4^{\circ}C$ jusqu'à l'analyse.

Les étapes d'extraction suivies sont résumées dans la figure III.12.



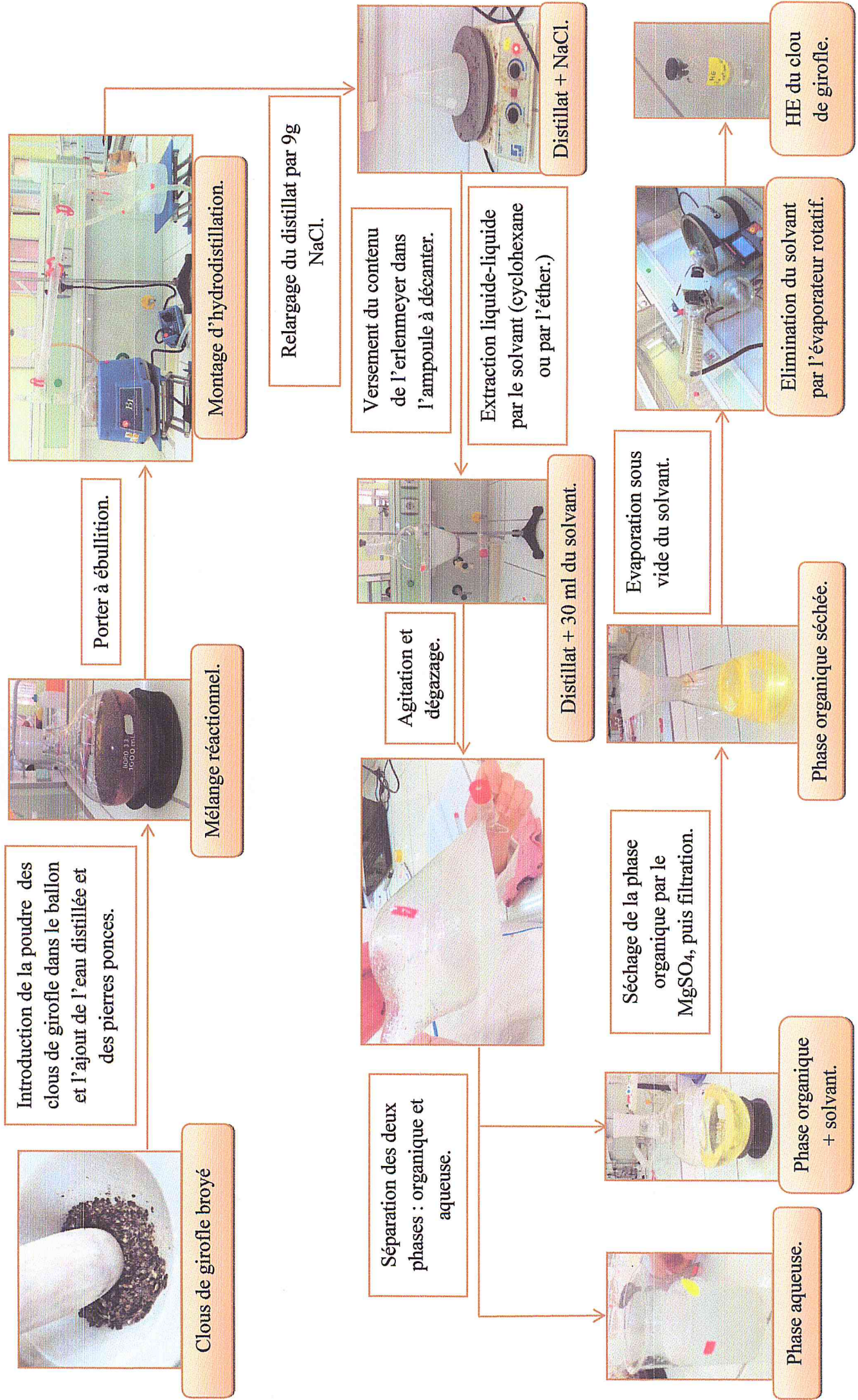


Figure III.12 : Protocole d'extraction de l'huile essentielle à partir des clous de girofle.

Le tableau III.13 regroupe le rendement d'extraction des clous de girofle.

Tableau III.13 : Rendement de l'extraction.

Solvant utilisé	cyclohexane	Ether diéthylique
Masse des clous de girofle utilisée	60 g	60 g
Masse de l'huile récupérée	5.52 g	9.6 g
Rendement d'extraction (%)	9.2	16

III.3.1. b. Préparation de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur

Le montage de l'extraction de l'huile essentielle de clous de girofle par entraînement à la vapeur d'eau (la figure III.13) est constitué d'un ballon rempli au deux tiers d'eau distillée, surmonté d'une ampoule à décanter contenant la matière végétale. Le ballon est porté à ébullition, les vapeurs formées traversent la matière végétale contenue dans l'ampoule à décanter. Cette dernière est reliée à un réfrigérant permettant de condenser les vapeurs issues de l'ampoule à décanter. L'hétéro-azéotrope eau – huile condensé est récupéré dans un bécher. La durée de l'extraction est fixée à 3 h pour une masse de plante de 30g.



Figure III.13 : Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau.

Afin de récupérer la totalité du distillat, on procède par extraction liquide-liquide avec un solvant organique (éther diéthylique). Les traces d'eau présentes dans la phase organique sont éliminées par séchage avec du sulfate de magnésium ($MgSO_4$), suivie par l'évaporation du solvant par un évaporateur rotatif. Le rendement global de l'huile est de 13.20%.

Le tableau III.14 regroupe le rendement d'extraction des clous de girofle.

Tableau III.14 : Rendement de l'extraction.

Solvant utilisé	hexane
Masse des clous de girofle utilisée	30 g
Masse de l'huile récupérée	3.98 g
Rendement d'extraction (%)	13.20

III.3.1. c. Préparation de l'extrait

La méthode d'extraction de l'extrait des clous de girofle utilisée est l'extraction par soxhlet. Une quantité de la poudre des clous de girofle a été mise dans la cartouche d'extraction du soxhlet.

Le solvant utilisé est l'hexane, qui a été introduit dans un ballon de 1000 ml avec de la pierre ponce, puis, le ballon a été chauffé pour démarrer l'extraction. Les vapeurs du solvant ont été passés par le tube adducteur et condensées dans le réfrigérant. Ensuite, ces vapeurs ont été retombées dans le corps de l'extracteur, faisant macérer la poudre des clous de girofle dans l'hexane. Le solvant condensé a été accumulé dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube *siphon*, qui a provoqué alors le retour du liquide dans le ballon, et l'hexane a été enrichi en composés solubles ; c'est le premier *sulfonage*.

L'extraction a été arrêtée après quatre sulfonages, lorsque le liquide entourant la cartouche a été devenu clair, cette couleur indique que le solvant n'extrait plus rien du solide.

Le contenu du ballon a été ensuite traité à l'aide d'un évaporateur rotatif pour éliminer l'hexane et recueillir l'extrait. Finalement, l'extrait récupéré est gardé dans un réfrigérateur à +4°C jusqu'à l'analyse.

Les étapes d'extraction sont résumées dans la figure III.14.

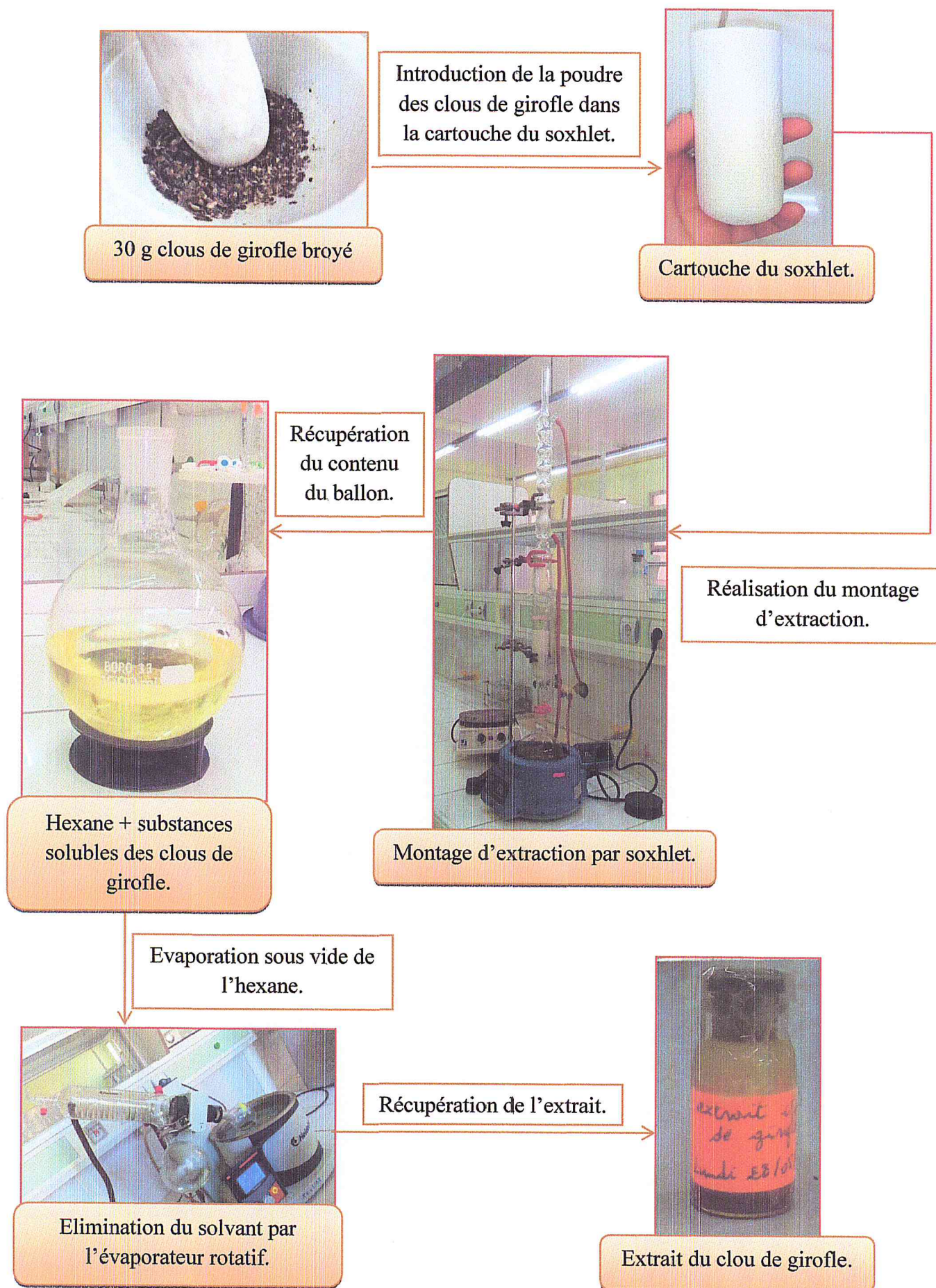


Figure III.14 : Protocole d'extraction de l'extrait à partir des clous de girofle.

Le tableau III.15 regroupe les données de l'extraction des clous de girofle.

Tableau III.15 : Rendement de l'extraction.

Solvant utilisé	hexane
Masse des clous de girofle utilisée	30 g
Masse de l'extrait récupéré	3.98 g
Rendement d'extraction (%)	13.20

III.4. Analyse des extraits par PLS-FTIR

III.4.1. Détermination des composés phénoliques dans l'huile essentielle et l'extrait

III.4.1. a. Dilution directe dans le solvant et analyse par calibration externe

Le but de cette expérience était de vérifier la possibilité de la détermination simultanée des quatre composés phénoliques à savoir l'acide cinnamique, l'acide salicylique, l'acétate d'eugényle et l'eugénol dans l'huile essentielle extraite par deux méthodes différentes hydrodistillation et entraînement à la vapeur et dans l'extrait hexanoïque obtenu par soxhlet.

Une masse de 100 mg de chaque huile essentielle et extrait a été diluée dans 3 ml du dichlorométhane.

III.4.1. b. Résultats d'analyse et interprétation

Il est important de signaler la rapidité de l'exécution de la méthode de calibration externe du Quant 2 parce qu'il suffit d'introduire les modèles prédictifs puis les spectres obtenus et avec un simple clic sur « Analyser » on peut accéder au tableau des résultats ainsi que tous les graphes et les statistiques de calibrage effectué.

La figure III.15 présente les spectres IRTF comparatifs d'absorbance des trois huiles essentielles et de l'extrait dilués dans CH_2Cl_2 dans le domaine spectral compris entre 4000 et 400 cm^{-1} .

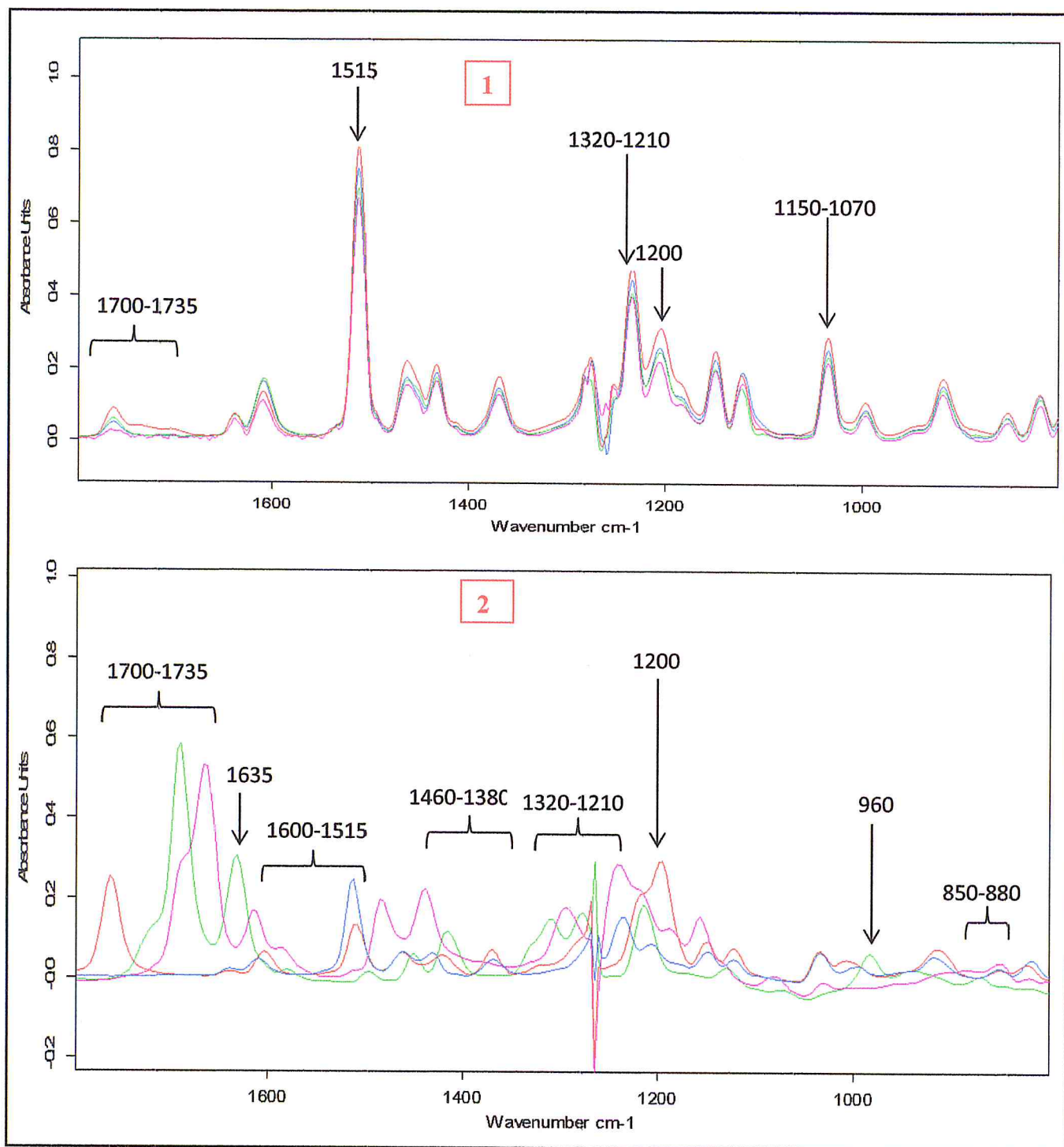


Figure III.15 : Spectres IRTF des trois huiles essentielles et de l'extrait de concentration 33.33 mg.ml⁻¹ dilués dans le CH₂Cl₂, avec l'huile essentielle (éther) **bleu**, l'huile essentielle (cyclohexane) **vert** l'huile essentielle (entraînement à la vapeur) en **mauve**, et l'extrait (soxhlet) en **rouge (1)** et spectres des quatre étalons de concentration de 10 mg.ml⁻¹ **(2)** voir figure III.2.

D'après les spectres IRTF, on remarque que l'allure des spectres des trois huiles essentielles et extrait de clous de girofle sont similaires au spectre de l'eugénol et de l'acétate d'eugényle étant donné que ces derniers sont d'après la littérature les composés majoritaires

dans les clous de girofle. Par contre, les deux acides cinnamique et salicylique ne partagent pas toutes les bandes avec les échantillons d'extrait et d'huile essentielle car ils sont présents en faible concentrations.

Le tableau III.16 donne les résultats des concentrations prédites moyennes et les teneurs des composés phénoliques et de la fraction phénolique dans les huiles essentielles et l'extrait dilués directement dans le CH_2Cl_2 .

Tableau III.16 : Résultats de prédiction et teneurs des composés phénoliques et de la fraction phénolique dans les huiles essentielles et l'extrait.

Extrait ou huile essentielle	Analytes	$C \pm \delta$ (mg.ml ⁻¹)	Teneurs (%)
Extrait	Acide cinnamique	0.3586 ± 0.0051	1.08
	Acide salicylique	0.0557 ± 0.0037	0.17
	Acétate d'eugényle	23.89 ± 0.13	71.68
	Eugénol	4.062 ± 0.028	12.19
	Fraction phénolique	28.37 ± 0.17	85.19
HE entrainement à la vapeur	Acide cinnamique	0.124 ± 0.030	0.37
	Acide salicylique	0.0500 ± 0.0031	0.15
	Acétate d'eugényle	22.81 ± 1.42	66.55
	Eugénol	1.7293 ± 0.45418	5.19
	Fraction phénolique	24.71 ± 1.90	74.13
HE hydrodistillation (cyclohexane)	Acide cinnamique	0.280 ± 0.016	0.84
	Acide salicylique	0.01999 ± 0.0073	0.60
	Acétate d'eugényle	22.88 ± 0.45	68.65
	Eugénol	2.781 ± 0.050	8.34
	Fraction phénolique	25.96 ± 0.52	77.88
HE hydrodistillation (éther diéthylique)	Acide cinnamique	0.183 ± 0.011	0.55
	Acide salicylique	0.0660 ± 0.0030	0.20
	Acétate d'eugényle	24.91 ± 0.25	74.74
	Eugénol	2.404 ± 0.019	7.21
	Fraction phénolique	27.56 ± 0.29	82.69

$C \pm \delta$: Valeur moyenne ± Déviation standard pour (n=5), cinq valeurs dépendantes.

La concentration de la fraction phénolique a été déduite chaque fois par la sommation des concentrations des quatre composantes.

- Les concentrations prédites des analytes sont dans les limites du domaine de calibrage à l'exception de celles de l'acide salicylique qui montrent des faibles concentrations dues probablement à sa faible teneur dans la matrice étudiée, et de celles de l'acétate d'eugényle qui présente des concentrations élevées.
- Les teneurs prédites de l'eugénol et de l'acétate d'eugényle sont respectivement de 5 à 12% et de 67 à 75%. En comparaison avec la littérature (voir tableau II.1), il s'avère que ces taux ne sont pas concordants avec les valeurs prédites, ceci est probablement dû aux composantes de la matrice de calibration ne reflétant pas la matrice réelle. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.



*CONCLUSION
GENERALE.*

Conclusion générale

Nous avons réussi à travers ce travail à exécuter le logiciel intégré « Quant 2 », qui a pour but de traiter des spectres des matrices complexes présentant des bandes IR chevauchées.

Afin de construire les modèles de calibration, seize solutions étalons ont été préparées à partir de quatre composés phénoliques qui sont présents dans les clous de girofle (l'acide cinnamique, l'acide salicylique, l'eugénol et l'acétate d'eugényle) et dissous dans le dichlorométhane dans les domaines de concentrations comprises entre 0.1 et 4 mg.ml⁻¹ puis analysées avec un spectromètre IRTF.

Nous avons étudié les différents paramètres d'optimisation lors de cette modélisation à savoir les gammes d'optimisation, les traitements spectraux (sans prétraitement des données, correction d'offset, soustraction d'une droite, dérivée première et dérivée première + soustraction d'une droite), les régions spectrales utilisées et les rangs des méthodes (de 3 à 8).

Le paramètre principal suivi pour établir les modèles prédictifs, dans notre étude, est le *RMSEP* où les meilleurs paramètres analytiques de calibrage et de prédiction sont obtenus en utilisant la région spectrale : 3715.19-3652.52, 3586.9-3462.6, 1843.6-1476.2 et 1401-1299.8 cm⁻¹.

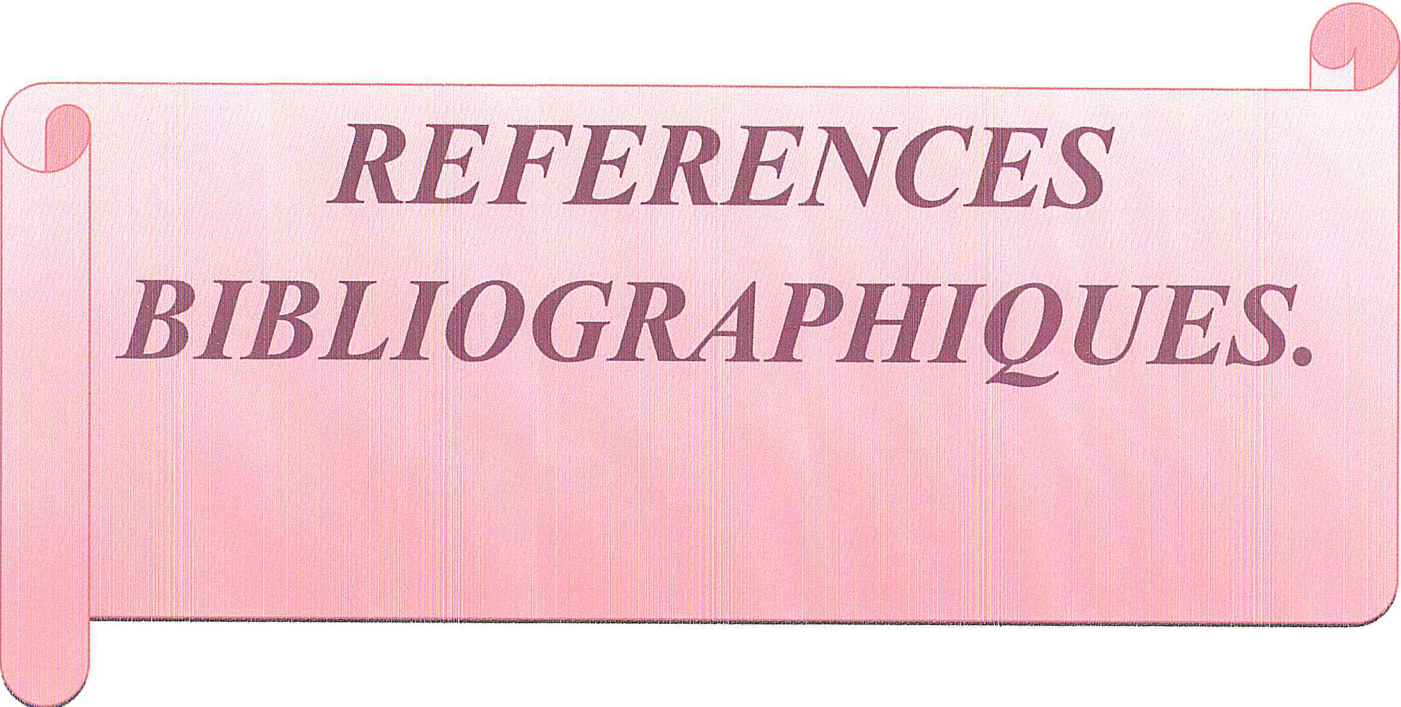
Les résultats des analyses consécutives démontrent que les modèles PLS développés sont adéquats pour la détermination simultanée des quatre analytes, en fournissant des erreurs de prédiction *RMSEP* comprises entre 0.01 et 0.2, des erreurs de calibrage *RMSEE* limitées par 0.009 et 0.09 sachant que leurs coefficients de détermination sont inclus dans le domaine entre 99.93 et 99.97 permettant d'estimer la bonne qualité de calibrage.

Les rendements obtenus varient selon la méthode d'extraction utilisée. Le meilleur rendement de 13.20%, pour une masse de 60g de clous de girofle, est enregistré pour l'extrait obtenu par la méthode d'extraction par soxhlet; suivi par l'huile essentielle, obtenue par la méthode d'hydrodistillation, avec un rendement de 9.20% pour une masse de 30g de clous de girofle.

À l'issus de tous les résultats, il faut signaler que ce travail mérite une poursuite en développant les points suivants :

- ❖ Utilisation une méthode d'extraction des acides phénoliques plus appropriée, en étudiant profondément les propriétés de ces huiles et extraits ;

- ❖ Valider les modèles développés par des moyens de caractérisations des extraits plus précis : CG-MS à titre d'exemple, et confirmer les résultats obtenus par plusieurs mesures indépendantes ;
- ❖ Trouver une modalité de valorisation ultérieure des extraits bruts ou des composés purifiés en faisant des tests de formulation puis en les incorporant dans divers produits agroalimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.



***REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES.***

Liste des références.

1. Internet 2, Phytomania (page consultée le 24 avril 2013), [En ligne], adresse URL : <http://www.phytomania.com/girofle.htm>
2. François E-1936. Giroflier et girofle. Revue de Botanique appliquée et d'agriculture tropicale, Vol.X, No.4, pp.414-448.
3. <http://www.aroma-zone.com/aroma/fichegrofle.asp>
4. Tomson, G. -1930. Le clou de girofle à Zanzibar. Revue de Botanique appliquée d'Agriculture Tropicale, Vol. 10, pp. 816-817.
5. Chevalier, A. -1926. Le giroflier à Zanzibar. Revue de Botanique appliquée d'Agriculture Tropicale, Vol. 6, pp. 174-175.
6. Srivastava, A et al. -2004. Bund and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar, pp. 51-53. In pdf.<http://www.interscience.wiley.com>
7. Marty, P. -1992. Fiches techniques d'agriculture spéciale à l'usage de l'Afrique subsaharienne : Le giroflier, pp. 1-15.
8. Rahonintsoa. -1978. Sainte-Marie de Madagascar : Insularité et économie du girofle, pp. 121-159.
9. BOTNIEAU M. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs .Paris : éd Tec&Doc ; 2010. p. 483-486.
10. Maistre J. 1964. *Les plantes à épices*, Annales de Géographie. Paris Ve, Maisonneuve & Larose, 299 p.
11. Jahiel M., 2011. *Girofle Madagascar*. 11 p.
12. Borget M., 1991. *Les plantes à épices*. Paris, Editions Maisonneuve et Larose, 182 p.
13. PERRIER DE LA BÂTHIE H. Flore de Madagascar et des Comores, 152ème famille, Myrtacées. Paris : Firmin-Didot et Cie ; 1953. p. 1-2.
14. AMSHOFF GJH. Myrtacées. Paris : MNHN ; 1966. p. 3-4 ; 16.
15. DUPONT F, GUIGNARD JL. Botanique : les familles des plantes. 15e éd. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson ; 2012. p. 16.
16. RANOARISOA KM. Evolution historique et état des lieux de la filière girofle à Madagascar [Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur Agronome]. Antananarivo : Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques ; 2012. 89 p.
17. Demangel A., 2011. *Faisabilité de la mise en place d'une Indication Géographique sur le Clou de girofle à Madagascar*. Mémoire de fin d'étude. Cergy-Pontoise, ISTOM, 104 p.

18. Pharmacopée européenne 7e édition. (dernière consultation : octobre 2013)
19. Pharmacopée française 11e édition. (dernière consultation : octobre 2013)
20. OLLIER C. L'essentiel de l'aromathérapie. Ed. Le Moniteur des pharmacies. Cahier II du n°2341, 26 février 2000, 1-16 pp.
21. Luque de Castro, M. D ; Jiménez-Carmona, M. M et Ferández-Pérez. V. Trends Anal. Chem.v1999, 18, 708.
22. Hajji, S. ; Beliveau, J. ; Simon, D. Actes-Colloq. Int. Plant. Aromat. Med. Maroc, 1985, 229-230.
23. FAUCON M., Traité d'aromathérapie scientifique et médicale. Ed. Sang de la terre et Médical, Paris, 2012, 879 pp.
24. Pellerin, P. Perfume, Flavor, 1991, 16, (07-08), 37.
25. Camel, V. Trends in Anal. Chem. 2000, Vol. 19, n°4, 229.
26. Lucchesi, M. E.; Chemat, F. Smadja, J. Journal of Chromathography A 2004, 1043, 323-327.
27. Kimbaris, A.C.; Siatis, N.G.; Daferera, D.J.; Tarantilis, P.A; Pappas, C.S ; Pollision, M.G. Ultrasonics Sonochem. 2006, 13, 54-60.
28. W. W. Coblenz: Investigations of Infrared Spectra, Carnegie Institution, Washington 1905, re-published, The Coblenz Society, Norwalk 1962.
29. Günzler, H. and Gremlich, H.-U., "IR Spectroscopy: An Introduction", Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002.
30. H-U. Gremlich, "Infrared and Raman Spectroscopy", Handbook of Analytical Techniques, Edited by. H. Günzler, A. Williams ; Copyright OWILEY-VCH Verlag GmbH, 2001.
31. https://fr.wikipedia.org/wiki/Spectroscopie_infrarouge
32. Steele, D., "Infrared Spectroscopy: Theory", in Handbook of Vibrational Spectroscopy, Vol. 1, Chalmers, J. M. and Griffiths, P. R. (Eds), Wiley, Chichester, UK, 2002, pp. 44–70.
33. Griffiths, P. R. and de Haseth, J. A., Fourier Transform Infrared Spectrometry, Wiley, New York, 1986.
34. https://www.google.fr/search?q=michelson+interferometer&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjqrNDQ4_7SAhXCuhQKHaeYCI4Q_AUIBigB&biw=1280&bih=933#imgrc=-BtCCxwKn404IM:
35. Stuart, B., Modern Infrared Spectroscopy, ACOL Series, Wiley, Chichester, UK, 1996. University of Greenwich.
36. Available from Harrick Scientific Corporation, 88 Broadway, Ossining, NY 10562.

37. U. P. Fringeli in F. M. Mirabella (ed.): "Internal Reflection Spectroscopy: Theory and Application", Marcel Dekker, New York 1992, p. 255.
38. P. S. Wilson and W. O. George, H. A. Willis (eds.): Computer Methods in UV, Visible and IR Spectroscopy, The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1990, p. 143.
39. Steve Gillet, D. Sc, Cours de « Chimie Analytique et caractérisation des matériaux », 1^{ère} année Master Sciences de l'Ingénieur Industriel, Haute école Charlemagne.
40. N. B. Colthup, L. H. Daly, S. E. Wiberley: Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, 3rd ed., Academic Press, San Diego 1990.
41. J. Coates in W. O. George, H. A. Willis (eds.): Computer Methods in UV, Visible and IR Spectroscopy, The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1990, p. 95.
42. N. Benoudjit, E. Cools, M. Meurens, M. Verleysen, « Calibrage chimiométrique des spectrophotomètres : sélection et validation des variables par modèles non-linéaires », Université catholique de Louvain.
43. R. Henrion, G. Henrion, « Chemometrics », Handbook of Analytical Techniques, Edited by. H. Günzler, A. Williams ; Copyright OWILEY-VCH Verlag GmbH, 2001.
44. D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, S. N. Demmig, Y. Michotte, L. Kaufman: Data Handling in Science and Technology 2: Chemometrics: Textbook, Elsevier, Amsterdam 1988.
45. E. R. Malinowski, D. G. Howery : Factor Analysis in Chemistry, Wiley, New York 1980.
46. D. Desbois, « Introduction à la régression des moindres carrés partiels avec la procédure PLS de SAS », Institut national de la recherche agronomique – Economie et sociologie rurales (INRA-ESR, Nancy).
47. https://fr.wikipedia.org/wiki/R%C3%A9gression_des_moindres_carr%C3%A9s_partiels
48. M. Tennenhaus, « La régression PLS, théorie et pratique », ed : Technip, Paris.
49. J. el-haddad, « Chimiométrie appliquée à la spectroscopie de Plasma induit par Laser (LIBS) et à la spectroscopie Téràhertz », Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1 ; 2013.
50. M.D. King, W.D. Buchanan, T.M. Korter, Identification and Quantification of Polymorphism in the Pharmaceutical Compound Diclofenac Acid by Terahertz Spectroscopy and Solid-State Density Functional Theory, Analytical Chemistry, 83 (2011) 3786-3792.
51. H. Martens, T. Naes, « Multivariate Calibration », Wiley, 1991.
52. I.S. Helland, On the structure of partial least squares regression, Communications in Statistics - Simulation and Computation, 17 (1988) 581-607.
53. Metcalf, R.L. Plant volatiles as insect attractants. CRC Crit. Rev. Plant Sci.1987, 5, 251-301.

54. Ralston, L.; Subramanian, S.; Matsuno, M.; Yu, O. Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases. *Plant Physiol.* 2005, 137, 1375-1388.
55. Dixon, R.A. Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2004, 55, 225-261.
56. Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., 2000. American Society of Plant Physiologists, chapitre 24, pp 1250-1318.
57. Lobstein, A., 2010. Substances naturelles et pharmacognosie, les alcaloïdes, pp 3-25.
58. Seabra, R.M.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Fernandes, E.; Carvalho, F.; Bastos, M.L. In *Biomaterials from Aquatic and Terrestrial organisms*; Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Eds.; Science Publishers: Enfield, NH, USA, 2006; pp. 115-174.
59. W. Ghnimi, « Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées: *Ricinus communis* et *Jatropha curcas*. Evaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase », Thèse de doctorat, Université de Lorraine, 2015.

