

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université BLIDA 1



Faculté des Sciences
Département de Chimie

Mémoire présenté par
FEKHAR Mohamed

En vue d'obtenir le diplôme de Master

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



Titre

**Estimation d'un modèle de calibration multivariée
 appliquée au dosage de métabolites secondaires dans
 des produits naturels**

Soutenu publiquement le 03 Juillet 2017 devant le jury composé de :

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

Promotion 2016-2017

Remerciements

Tout d'abord nous tiendrons à remercier Allah le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Toute ma gratitude revient à Dr. Bouzidi N., pour sa compétence, ses encouragements, sa patience et ses conseils bénéfiques.

Mes plus vifs remerciements vont à Prof. Daghbouche Y., qui a su, par sa disponibilité, son dynamisme, sa rigueur scientifique, son aide précieuse, a apporté autant de richesse à ce travail. C'est une chance inouïe d'avoir eu l'occasion de travailler sous sa direction.

Mes remerciements vont particulièrement au président et membres de jury qui nous font l'honneur de juger ce travail.

Je suis très reconnaissant envers le directeur de laboratoire de recherche Chimie des Substances Naturelles et des Molécules Bioactives Prof. El-Hattab M. et la directrice de laboratoire de département à l'université de Blida M^{me}. Chibi S. qui nos ont accueillies au sein de leur laboratoire, où ce travail a été effectué, nous ont avoir facilité nos travaux et mettre à notre disposition les moyens nécessaires.

J'exprime également mes remerciements à Dr. Touafek O., responsable du Master Chimie des Produits Naturels, pour son accueil, sa sympathie, ses conseils, sa confiance qu'elle m'a accordée et surtout pour l'ensemble de son (excellent) enseignement au cours de mes études.

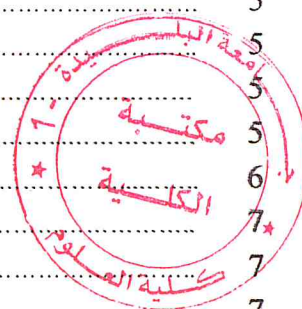
Je remercie très chaleureusement M^{lle}. Bounâas K. et M^{lle}. Bensemane N. pour leurs aides et leurs soutiens.

J'exprime ma profonde gratitude à tous les enseignants du département de chimie de la faculté des sciences de l'université Saad Dahlab de Blida qui ont participé à notre formation.

Je remercie enfin toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Table des matières

	Page
Résumés (arabe, anglais, français)	i
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	v
Liste des abréviations	vi
Introduction générale	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique sur les truffes du désert	
I.1. Que sont les truffes de désert ?	3
I.2. L'histoire des truffes	4
I.3. Géographie	5
I.3. a) Répartition dans le monde	5
I.3. b) Répartition en Algérie	5
I.4. Paramètres climatiques	5
I.5. Plantes symbiotiques	6
I.6. Description et caractéristiques des truffes	7
I.6. a) Forme végétative	7
I.6. b) Forme sexuée	7
I.7. Taxonomique du Terfez	10
I.8. Cycle de reproduction	11
I.9. Propriétés biologiques	11
I.10. Composition chimique des truffes désertiques	11
I.10. 1) Valeurs nutritionnelle	11
I.10. 2) Glucides et fibres alimentaires	12
I.10. 3) Acides aminés	12
I.10. 4) Acides gras	12
I.10. 5) Contenu des minéraux	13
I.10. 6) Composés volatils	14
I.10. 7) Composés phénoliques	15
I.10. 8) Anthocyanines	17
I.10. 9) Acide ascorbique	17
I.10. 10) Vitamines	17
I.11. Activité antioxydante	18
Chapitre II : Application de la chimiométrie à la spectroscopie IRTF	
II.1. Spectroscopie infrarouge	19
II.2. Principe de fonctionnement des spectromètres infrarouges à transformée de Fourier	20
II.2. a) Interféromètre de Michelson	20
II.2. b) Sources et détecteurs	21



II.3. Méthodes d'analyse	21
II.3. a) Méthodes de transmission	21
II.3. b) Méthodes de réflectance	22
II.4. Analyse spectrale	22
II.5. Loi de Beer-Lambert et concentration	22
II.6. Principe de l'analyse quantitative	23
II.7. Méthodes de calibrage chimométrique des spectrophotomètres	23
II.8. Analyse par régression aux moindres carrés partiels	24
II.9. Généralités sur les composés phénoliques	27
II.10. Quelques composés phénoliques existants chez les truffes de désert	28
II.10. a) Flavonoïdes	28
II.10. b) Acides phénoliques	29
II.10. c) Anthocyanines	30
Chapitre III : Étude expérimentale	
III.1. Appareillages et réactifs	33
III.1. a) Spectrophotomètre Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	33
III.1. b) Réactifs et produits chimiques	35
III.1. c) Choix des étalons et du solvant	35
III.2. Calibration PLS multicomposante	37
III.2. 1. Définition de la méthode Quant 2	37
III.2. 2. Optimisation des modèles PLS (Quant 2)	38
III.2.1. a) Préparation de la matrice de calibration	39
III.2.1. b) Préparation de la matrice de validation de méthode	40
III.2. 3. Étapes de la création d'une méthode Quant 2	41
III.2. 4. Paramètres analytiques fournis par le logiciel	43
III.2. 5. Paramètres d'optimisation des modèles mathématiques	47
III.2. 6. Détermination des concentrations des mélanges synthétiques par calibration interne (Test du set de validation)	55
III.3. Matériel fongique et préparation des extraits	62
III.3. a) Origine et identification de l'espèce de <i>Terfez</i>	62
III.3. b) Préparation des extraits de <i>Tirmania nivea</i>	63
III.4. Analyse des extraits par PLS-FTIR	65
III.4. 1. Détermination des acides phénoliques dans les extraits	65
III.4.1. a) Dilution et analyse par calibration externe	65
III.4.1. b) Résultats d'analyse et interprétation	65
III.4. 2. Détermination des acides phénoliques dans les extraits enrichis	70
III.4.2. a) Addition standard et préparation des extraits enrichis	70
III.4.2. b) Résultats d'analyse et interprétation	70
Conclusion générale	78
Références bibliographiques	80

ملخص

الهدف المرجو من هذا العمل كان تنفيذ وتطوير، وللمرة الأولى ضمن فريق أبحاثنا، طريقة معايرة متعددة المكونات PLS باستعمال مطيافية الـ FTIR من أجل التحديد المتزامن للأحماض الفينولية (مشتقات حمض البنزويك وحمض السيناميك) في أربع مستخلصات مختلفة لكمأة الصحراء *Tirmania nivea* من خلال استغلال إعدادات البرنامج المدمج "Quant 2" لـ OPUS 6.5، ما يتيح معالجة نطاقات ما تحت حمراء متداخلة.

لأجل بناء نماذج المعايرة متعددة المكونات، استخدم ستة عشر محلولا قياسيا عند مستويين من التراكيز تحوي التحليلات الأربع وهي حمض الم-هيدروكسيبنزويك، حمض الفانيليك، حمض مفروق-السيناميك وحمض الفيريبوليك. تم دراسة مختلف عوامل التحسين خلال النمذجة، وتتمثل في نطاقات التحسين، خيار المعالجة المسبقة للأطياف، المجالات الطيفية ورتبها.

وكشفت نتائج التنبؤ بأن نماذج الـ PLS-FTIR كانت ملائمة من أجل التحديد المتزامن للتحليلات الأربع بتقديم أخطاء تحليلية $RMSEP$ و $RMSEE$ أقل من 0.1 مع معاملات تحديد مناسبة ($R^2 > 98.87$).

كما أظهر تحليل العينات الفعلية بواسطة الـ PLS-FTIR قبل وبعد الإغناء قيم متنبأة مقبولة عموما ومماثلة للقيم النظرية مع نسبة استرداد تتراوح بين 92 و 107%، حيث حصل مستخلص الميثانول أعلى عائد بالتراكيز المولية 32.16، 11.74، 62.33 و 7.33 مغ/غ من المستخلص الموافقة لحمض الم-هيدروكسيبنزويك، حمض الفانيليك، حمض السيناميك وحمض الفيريبوليك على التوالي، تلاه مستخلص الإيثانول ثم مستخلص إيثر البترول فمستخلص الكلوروفورم.

الكلمات المفتاحية: كمأة الصحراء، *Tirmania nivea*، إندثار المربعات الصغرى الجزئية، PLS-FTIR، أحماض فينولية، حمض م-هيدروكسيبنزويك، حمض الفانيليك، حمض السيناميك، حمض الفيريبوليك.

Abstract

The aim of this work was to carry out and develop, for the first time within our research team, a multicomponent calibration method PLS applied to FTIR spectroscopy for the simultaneous determination of phenolic acids (benzoic acid and cinnamic acid derivatives) in four different extracts of the desert truffle *Tirmania nivea* using the parameters of the “Quant 2” integrated software of OPUS 6.5, allowing the treatment of overlapping infrared bands.

To build the multicomponent calibration models, sixteen standard solutions containing the four analytes, namely: *para*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, *trans*-cinnamic acid, and ferulic acid, at two levels of concentrations were used.

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

Prediction results revealed that PLS-FTIR models were adequate for the simultaneous determination of the four analytes by providing analytical errors *RMSEP* and *RMSEE* lower than 0.1 with convenient coefficients of determination ($R^2 > 98.87$).

Analysis of the actual samples by PLS-FTIR before and after enrichment showed overall acceptable predicted values comparable to the theoretical contents with a recovery percentage ranging from 92 to 107%. The methanolic extract reached the highest yield with the concentrations of 32.16, 11.74, 62.33, and 7.33 mg/g extract corresponding to *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, cinnamic acid, and ferulic acid, respectively, followed by the ethanolic extract, and the extract of petroleum ether then the chloroform extract.

Keywords: Desert truffle, *Tirmania nivea*, Partial least squares regression, PLS-FTIR, phenolic acids, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, cinnamic acid, ferulic acid.

Résumé

L'objectif assigné à ce travail était de réaliser et de développer, pour la première fois au sein de notre équipe de recherche, une méthode de calibration multicomposante PLS appliquée à la spectroscopie IRTF pour la détermination simultanée des acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique) dans quatre extraits différents de truffe du désert *Tirmania nivea* 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 multicomposante, seize solutions étalons contenant les quatre analytes à savoir l'acide *para*-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide *trans*-cinnamique et l'acide férulique, à deux niveaux de concentrations ont été utilisés.

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

Les résultats de la prédiction ont révélé que les modèles PLS-FTIR étaient adéquats pour la détermination simultanée de quatre analytes en fournissant des erreurs analytiques *RMSEP* et *RMSEE* inférieures à 0.1 avec de bons coefficients de détermination ($R^2 > 98.87$).

L'analyse des échantillons réels par PLS-FTIR avant et après l'enrichissement a montré globalement des valeurs prédites acceptables et comparables aux teneurs théoriques avec un pourcentage de récupération qui oscille entre 92 et 107%. L'extrait méthanolique a abouti au rendement le plus élevé avec des concentrations de 32.16, 11.74, 62.33 et 7.33 mg/g d'extrait correspondantes à l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide cinnamique et l'acide férulique, respectivement, suivi de l'extrait éthanolique, de l'extrait d'éther de pétrole puis l'extrait chloroformique.

Mots-clés : Truffe du désert, *Tirmania nivea*, Régression des moindres carrés partiels, PLS-FTIR, acides phénoliques, acide *p*-hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide cinnamique, acide férulique.

Liste des tableaux

	Page
Tableau I.1 : Quelques régions en Algérie où on trouve les terfez	5
Tableau I.2 : Quelques critères distinctifs entre deux genres de Terfez	8
Tableau I.3 : Aspects macroscopiques et microscopiques de quelques truffes du désert	9
Tableau I.4 : Classification systématique des genres <i>Terfezia</i> et <i>Tirmania</i>	10
Tableau I.5 : Composition de l'ascocarpe de <i>Terfezia boudieri</i> en acides aminés	12
Tableau I.6 : Composition des acides gras de <i>Terfezia</i> et <i>Picoa</i> obtenue par divers auteurs	13
Tableau I.7 : Composés volatiles majeurs des ascocarpes de <i>Tirmania pinoyi</i>	14
Tableau I.8 : Composés volatiles présents dans l'ascocarpes de <i>Terfezia boudieri</i>	14
Tableau I.9 : Compositions chimiques principales de <i>Terfezia claveryi</i>	15
Tableau I.10 : Les moyennes, les écart-types et les pourcentages de différents antioxydants trouvés chez <i>Tirmania nivea</i>	15
Tableau I.11 : Quelques composés phénoliques de <i>Terfezia boudieri</i>	16
Tableau I.12 : Concentrations des phénols trouvées dans <i>Terfezia boudieri</i>	16
Tableau I.13 : Contenu des flavonoïdes dans <i>Terfezia boudieri</i>	16
Tableau I.14 : Acides phénoliques trouvés chez <i>Tirmania pinoyi</i> (moyenne ± écart-type)	17
Tableau II.1 : Principaux acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque	29
Tableau II.2 : Principaux acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique	29
Tableau III.1 : Produits chimiques utilisés	35
Tableau III.2 : Solubilité des phénols en fonction de proportion CH ₂ Cl ₂ /EtOH (v/v)	35
Tableau III.3 : Composition des solutions étalons (matrice de calibration)	39
Tableau III.4 : Composition des mélanges synthétiques (matrice de validation)	40
Tableau III.5 : Rapport de validation fournit par le logiciel Quant 2	46
Tableau III.6 : Résultats d'optimisation, de calibrage et de validation de l'acide <i>para</i> -hydroxybenzoïque	48
Tableau III.7 : Résultats d'optimisation, de calibrage et de validation pour l'acide vanillique	50
Tableau III.8 : Résultats d'optimisation, de calibrage et de validation de l'acide cinnamique	52
Tableau III.9 : Résultats d'optimisation, de calibrage et de validation pour l'acide férulique	54
Tableau III.10 : Résultats de calibrage pour l'acide <i>para</i> -hydroxybenzoïque	56
Tableau III.11 : Résultats de calibrage pour l'acide vanillique	56
Tableau III.12 : Résultats de calibrage pour l'acide <i>trans</i> -cinnamique	57
Tableau III.13 : Résultats de calibrage pour l'acide férulique	57
Tableau III.14 : Rendement d'extraction des solvants de différentes polarités	65
Tableau III.15 : Résultats de prédiction des quatre phénols et de la fraction phénolique dans les extraits	67
Tableau III.16 : Valeurs moyennes de concentration des quatre acides et de la fraction phénolique des extraits avant et après l'enrichissement	72
Tableau III.17 : Valeurs de concentrations calculées des quatre acides et de la fraction phénolique avant et après l'enrichissement pour 1 g d'extrait	76

Liste des figures

	Page
Figure I.1 : Truffe du désert sous sol	4
Figure I.2 : Espèces du genre <i>Helianthemum</i> abondantes en Algérie a) <i>Helianthemum ovatum</i> , b) <i>Helianthemum almeriense</i> et c) <i>Helianthemum guttatum</i>	6
Figure I.3 : Forme végétative de la truffe « mycélium »	7
Figure I.4 : Schéma représentatif de la forme sexuée de la truffe de désert	7
Figure II.1 : Composants de base d'un spectromètre IRTF	20
Figure II.2 : Schéma d'un interféromètre de Michelson	20
Figure II.3 : Modèle d'interférence enregistré avec une cellule vide	22
Figure II.4 : Structure chimique et classe de quelques flavonoïdes	28
Figure II.5 : Structure chimique de la cyanidine (anthocyanidine)	30
Figure III.1 : Schéma du montage IRTF utilisé pour l'analyse en phase liquide	34
Figure III.2 : Spectre IRTF en phase liquide des étalons préparés dans CH ₂ Cl ₂ /EtOH (90/10)	36
Figure III.3 : Fenêtre du modèle Quant 2 d'OPUS 6.5	38
Figure III.4 : Mélanges étalons (A) et mélanges synthétiques (B) préparés	40
Figure III.5 : Étapes de travail numérotées suivies dans la fenêtre de configuration	41
Figure III.6 : Étapes à suivre, avec numérotation, lors de l'optimisation	42
Figure III.7 : Exemple de représentations graphiques des paramètres analytiques d'un composé chimique en fonction de <i>RMSECV</i>	44
Figure III.8 : Exemple des paramètres analytiques d'une composante en fonction de <i>RMSEP</i>	45
Figure III.9 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'acide <i>para</i> -hydroxybenzoïque	58
Figure III.10 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'acide vanillique	59
Figure III.11 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'acide cinnamique	60
Figure III.12 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'acide férulique	61
Figure III.13 : Aspect macroscopique de l'espèce <i>Tirmania nivea</i>	62
Figure III.14 : Aspect microscopique des ascospores du <i>Tirmania nivea</i>	63
Figure III.15 : Protocole d'extraction et de préparation des extraits à partir de la truffe de désert <i>Tirmania nivea</i>	64
Figure III.16 : Spectres IRTF des quatre extraits dilués dans le CH ₂ Cl ₂ /EtOH	66
Figure III.17 : Représentations graphiques des paramètres analytiques d'acides phénoliques étudiés dans les quatre extraits	68
Figure III.18 : Spectres IRTF des quatre extraits « concentrés et enrichis » dilués dans le CH ₂ Cl ₂ /EtOH	71
Figure III.19 : Représentations graphiques des paramètres analytiques d'acides étudiés dans les quatre extraits après l'enrichissement	74
Figure III.20 : Proportions des analytes dans 1 g de chaque extrait obtenu	77

Liste des abréviations

- ATR** Attenuated Total Reflectance (Réflectance totale atténuée).
- CH₂Cl₂/EtOH (v/v)** Dichlorométhane/Éthanol (volume/volume).
- CLS** Classical Least-Squares (Moindres carrés classique).
- DTGS** Deuterium Tryglycine Sulfate (Sulfate triglycine deutéré).
- Ec-t** Écart-type.
- FTIR** Fourier-Transform Infrared (Infrarouge à transformée de Fourier).
- GC-MS** Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Chromatographie gazeuse-Spectrométrie de masse).
- HPLC-DAD** High-Performance Liquid Chromatography-Diode-Array Detection (Chromatographie liquide à haute performance-Détection photodiode).
- ILS** Inverse Least-Squares (Moindres carrés inverse).
- LC-MS** Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (Chromatographie liquide-Spectrométrie de masse).
- Méthode F.C.** Méthode de Folin-Ciocalteu.
- MS** Matière Sèche.
- PCR** Principal Component Regression (Régression du composante principale).
- PLS** Partial Least Squares (Moindres carrés partiels « MCP »).
- PS** Poids sec.
- RDS** Relative Standard Deviation (Déviation standard relative).
- RMSECV** 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)
- UPLC-ESI-MS/MS** Ultra Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (Chromatographie liquide à ultra performance-Spectrométrie de masse/Spectrométrie de masse).
- UV-Vis** Ultraviolet-Visible.

INTRODUCTION

GÉNÉRALE

Introduction générale

Le développement de nouvelles méthodes analytiques en chimie dans les années 70-80, comme la spectroscopie NIR qui fut à l'origine de l'essor de la chimiométrie, s'est accompagné d'une transformation de la structure des tableaux de données en générant des matrices larges avec de très nombreux descripteurs potentiellement corrélés entre eux pour seulement un nombre limité d'observations.

L'analyse chimique par spectrophotométrie repose sur l'acquisition rapide d'un grand nombre de données spectrales (plusieurs centaines, voire plusieurs milliers) alors que le traitement de ces données se fait généralement par les méthodes chimiométriques. La chimiométrie s'intéresse à l'évaluation des données analytiques observées à l'aide des mathématiques, particulièrement les méthodes statistiques.

La régression des moindres carrés partiels (PLS), qui peut être vue comme une méthode de régularisation basée sur la réduction de la dimensionnalité, a été proposée à cette époque par Wold *et al.*, en particulier en calibration multivariée, est la méthode la plus utilisée dans le traitement des données spectroscopiques IRTF.

D'un autre côté et depuis plusieurs années, l'utilisation des plantes médicinales, des champignons ou des préparations à base de plantes connaît un succès croissant, cela est expliqué par plusieurs raisons telles que le coût élevé des produits pharmaceutiques, la nécessité de disposer d'options thérapeutiques pour les agents pathogènes résistants et l'existence des maladies pour lesquelles il n'y a pas de traitement efficace.

Les truffes du désert sont des champignons ascomycètes hypogés comestibles qui se développent dans les régions arides et semi-arides essentiellement sur le pourtour du Bassin Méditerranéen et au Moyen-Orient. Ces champignons sont recueillis non seulement pour la nourriture où elles constituent une source riche en protéines, glucides, vitamines et en acides gras, mais également pour leurs propriétés curatives où elles sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter les maladies oculaires et cutanées depuis plus de deux millénaires, sans effets nocifs ou toxiques connus sur leurs utilisateurs.

Les travaux de recherche sur les truffes du désert sont peu nombreux et les recherches existantes se divergent sur plusieurs axes relatifs à leurs diversités, bioécologie et leurs activités antimicrobiennes.

Les composés phénoliques, essentiellement les acides phénoliques, sont les principaux constituants contribuant à l'activité antioxydante, antibiotique et aux propriétés thérapeutiques à caractères anti-inflammatoires, antituberculoïdes et hepatoprotectrices des truffes des sables.

L'analyse quantitative des phénols dans les truffes a été réalisée, dans la plupart des cas, par des techniques expérimentales telles que GC-MS, HPLC, UPLC-ESI-MS/MS... ou par les méthodes semi-quantitatives (méthode F.C., méthode $AlCl_3$, ...), alors que les méthodes spectroscopiques telles que l'IRTF n'ont pas été utilisées.

Alors, nous avons fixé à travers ce travail, les objectifs suivants :

- L'application, pour la première fois au sein de notre équipe de recherche, d'un nouveau logiciel de calibration multicomposante PLS, le « Quant 2 ».
- Le développement d'une nouvelle méthode de dosage des phénols dans les extraits de truffes du désert par spectrométrie IRTF en utilisant les modèles prédictifs optimisés de la calibration PLS-FTIR.

Ce manuscrit est réparti en trois chapitres :

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique sur les truffes du désert dans laquelle, on a présenté la biologie et la chimie ainsi que les travaux antérieurs effectués sur les différentes espèces.

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 multicomposante PLS-FTIR pour le dosage des acides phénoliques (l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide *trans*-cinnamique et l'acide férulique) dans quatre extraits différents ; méthanolique, éthanolique, étherique et chloroformique de la truffe désertique *Tirmania nivea*.

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

CHAPITRE I

Synthèse bibliographique sur les truffes du désert

Introduction

La croissance démographique mondiale, les changements climatiques, la désertification et la pauvreté entraînent une demande croissante à des nouvelles sources de nourriture, particulièrement protéines. La valeur nutritive, le goût délicieux, les propriétés curatives et biologiques font les truffes du désert des bons candidats. Elles sont déjà connues et appréciées dans certains pays et par conséquent leurs prix sont montants [1].

Les truffes du désert sont une famille complexe de champignons hypogés comestibles, habituellement endémiques dans la région méditerranéenne aride et semi-aride, l'Afrique du Nord et le Moyen-Orient, contiennent principalement des espèces de genres *Terfezia*, *Tirmania* et *Picoa*. Les deux genres *Terfezia* et *Picoa* représentent les truffes désertiques les plus communes dans le monde [2-4].

Les corps fructifères des truffes sont des sources riches en protéines, graisses, vitamines, glucides, fibres et en minéraux [5-7]. En plus de leur valeur nutritive, les truffes se sont révélées être une source alternative et illimitée des composés thérapeutiques avec des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, antimicrobiennes et anti-tuberculoïdes [8-11]. La capacité antioxydante de différentes truffes peut être liée à ce qu'elles contiennent de divers constituants chimiques tels que la vitamine C, les caroténoïdes et de nombreux composés phénoliques [12, 13]. Elles présentent également un intérêt considérable pour des buts écologiques, agroforestiers, commerciaux et socio-économiques [14, 15].

Les travaux de recherche sur les truffes du désert en Algérie sont peu nombreux, voire inexistant, où elles demeurent mystérieuses. Cependant, la majorité des études portant sur la bioécologie des truffes des sables donnent des constats individuels au sujet de l'influence des facteurs écologiques sur leur occurrence et leur productivité [16-18].

I.1. Que sont les truffes de désert ?

Les truffes du désert sont un type de champignons ascomycètes ectomycorhiziens hypogés formés en association avec les racines des espèces *Helianthemum* (ou autre cistacée) et sont représentés généralement par les membres des genres *Terfezia*, *Tirmania* et *Picoa* [19].

Les truffes désertiques poussent naturellement en grandes quantités dans les terres vierges du désert après la saison des pluies. Elles sont distribuées naturellement en Afrique du Nord (Maroc, Tunisie et Egypte) vers le Moyen-Orient (Arabie Saoudite, Koweït, Bahreïn, Irak, Iran, Liban, Syrie et Jordon) [20].

La figure I.1 montre le craquèlement du sol sablonneux et l'apparition de la truffe.

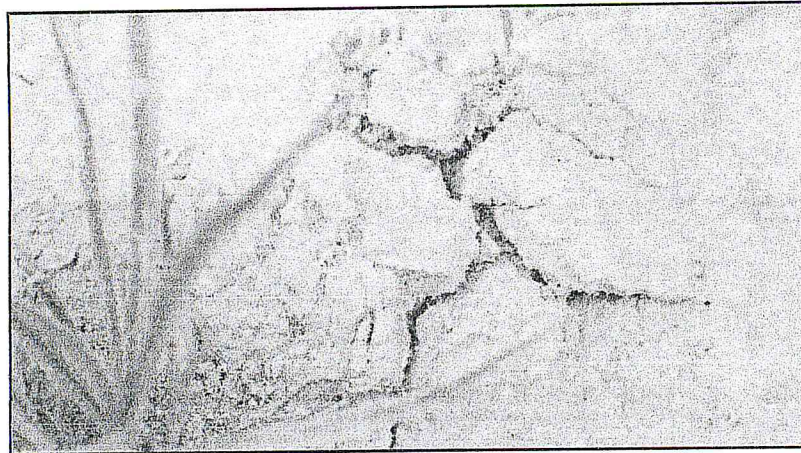


Figure I.1 : Truffe du désert sous sol [21].

Le terme «truffe» vient du latin *tubera* ou tubercule, signifiant « gonfler » qui a été appliqué aux champignons hypogées comestibles des genres *Tuber* et *Terfezia* mangé par les Grecs et les Romains [22-24].

Ces champignons hypogés portent plusieurs appellations selon les peuples. Ils sont nommés terfez ou terfass en Afrique du Nord et « Al-Fag'a » au Moyen Orient. En Arabie Saoudite, des noms régionaux « Kholeissi » et « Zubaidi » sont également employés pour les deux variétés les plus connus. D'autres noms sont également attribués aux truffes des sables comme : « Nabat Al-Ardh », « Asqal » et « Banat Ober » [25-27].

I.2. L'histoire des truffes

Au XIXe siècle, L'écrivain Alexandre Dumas devait avoir pris des truffes désertiques à l'esprit lorsqu'il disait que raconter l'histoire de la truffe était de raconter l'histoire de la civilisation [28]. Les bédouins ont la plus longue histoire enregistrée de l'utilisation de truffe du désert et ont démontré une riche culture [29, 30].

Les populations autochtones ont utilisé les truffes où qu'elles poussent, mais la plupart de ces cultures étaient strictement orales et n'ont pas laissé des documents écrits. C'est le cas avec les indigènes du Kalahari africain et les aborigènes de l'Australie. Malgré de leur long histoire d'utilisation, on sait peu de choses sur les truffes ou sur la manière dont elles ont été utilisées par les indigènes de deux continents [31, 32].

Les truffes des sables sont traditionnellement recueillies non seulement pour la nourriture, mais également pour leurs propriétés curatives et aphrodisiaques. Le jus des Terfez, principalement de *Tirmania nivea*, *Terfezia claveryi* et de *Terfezia boudieri*, a été utilisé au Moyen-Orient pour traiter les maladies oculaire et cutanée [19].

I. 3. Géographie

I.3. a) Répartition dans le monde

Les pays méditerranéens, particulièrement en Afrique du Nord et au Moyen-Orient, sont renommés pour leurs grands rendements de truffes désertiques. Les espèces suivantes ont été rapportées en Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Libye, Tunisie et Egypte) par plusieurs auteurs : *Terfezia boudieri*, *T. leptoderma* et *T. arenaria*, *T. leonis*, *T. claveryi* ("Terfass rouge" de Tafilalet), *Tirmania nivea* et *T. pinoyi* ("Terfass blanc" ou "Zoubaïdi"), *Picoa juniperi* et *P. carthusiana* [33-38].

Certaines espèces de truffes des sables sont trouvées en dehors de l'Afrique du Nord, au Moyen-Orient (Arabie Saoudite, Irak, Iran, Koweït, Syrie, Palestine, etc...) ainsi que dans les pays européens du bassin méditerranéen (le sud de l'Italie, de l'Espagne et de la France, Portugal, Grèce) [39-48].

Les truffes des sables sont également trouvées en Hongrie, Turquie, les îles canaries, Inde, Chine, Afrique du Sud, Amérique du Nord, Amérique du Sud, Allemagne, désert de Chihuahua au Mexique et dans la péninsule balkanique [49-50].

I.3. b) Répartition en Algérie

Les terfez d'Algérie sont répartis dans trois zones bioclimatiques comme il est représenté dans le tableau I.1.

Tableau I.1 : Quelques régions en Algérie où on trouve les terfez.

Zone bioclimatique	Wilaya
Régions semi-arides du littoral	Mostaganem, Annaba, Taref
Régions semi-arides steppiques	Tiaret, Saïda, Djelfa, Tlemcen, El-Bayadh, Naama, Batna, Boussâda, M'sila, Sétif et en Kabylie
Régions arides sahariennes	Béchar, Tindouf, Biskra, Ghardaïa, Laghouat, Timimoun, Ourgla, Touggourt, Tamanrasset

I.4. Paramètres climatiques

Le développement et la croissance des Terfez exigent certaines conditions écologiques particulières. Trois paramètres sont importants pour la production de ces champignons : le climat (chaleur et pluviométrie), le sol (sablonneuses bien aérées) et la plante hôte [51].

I.5. Plantes symbiotiques

Les truffes du désert sont recueillies sous des plantes herbacées phanérogames telles que les *Cistus* (les espèces rapportées sont *Cistus halimifolius*, *C. ladaniferus* var. *halimioides*, *C. salicifolius*, *C. monspeliensis* et *C. salvifolius*) et de *Helianthemum* ou de Pins [52, 53].

Cependant, la truffe *Terfezia leptoderma*, une espèce plutôt commune dans le sud de l'Europe et en Afrique du Nord, a été recueillie sous *Pinus radiata* ; à San Leonardo, en Italie, sous *Pinus canariensis* ; aux îles Canaries et sous *Pinus pinaster* var. *Atlantica* ; dans la forêt de « Mamora » au Maroc [18, 52].

Mais les plantes hôtes les plus communes des Terfez sont souvent les herbacées annuelles ou vivaces des espèces *Helianthemum*. Les espèces rapportées sont les suivantes : *Helianthemum tuberaria*, *H. guttatum* (L. Foureau), *H. salicifolium* (L.) Mill., *H. ledifolium* (L.) Mill., *H. salicifolium*, *H. almeriense* et *H. sessiliflorum* [14, 25, 33-35].

En Algérie sont surtout avec les espèces *Helianthemum guttatum*, *Helianthemum almeriense* et avec *Helianthemum ovatum* [53] (Figure I.2).



Figure I.2 : Espèces du genre *Helianthemum* abondantes en Algérie a) *Helianthemum ovatum* [55], b) *Helianthemum almeriense* [56] et c) *Helianthemum guttatum* [57].

I.6. Description et caractéristiques des truffes

Le terfez est constitué de deux parties : une partie végétative et l'autre reproductive.

I.6. a) *Forme végétative*

Elle est très discrète et composée du mycélium, mycorhizes et des stromas ; ces divers constituants sont reliés d'une manière complexe entre eux et avec les racines de certaines plantes vasculaires (Figure I.3) [58].

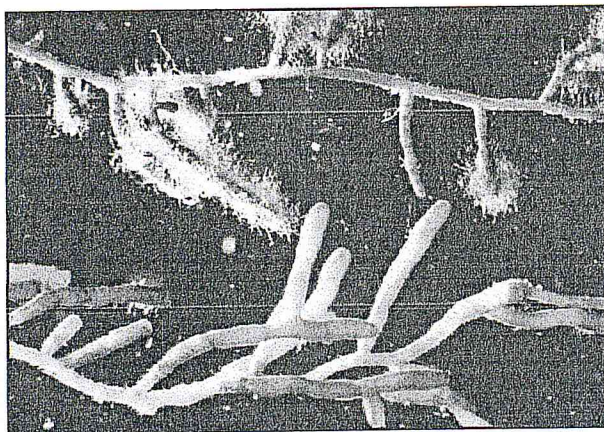


Figure I.3 : Forme végétative de la truffe « mycélium » [59].

I.6. b) *Forme sexuée*

Les terfez possèdent des fructifications souterraines appelées ascocarpes ou ascomes. Ces derniers sont constitués d'une partie centrale gléba (chair) contenant des petits sacs appelés asques qui renferment de nombreuses spores « les ascospores » et elle est souvent protégée par une enveloppe rigide ou un cortex appelé périidium [60]. La figure I.4 montre la forme sexuée de la truffe du désert.

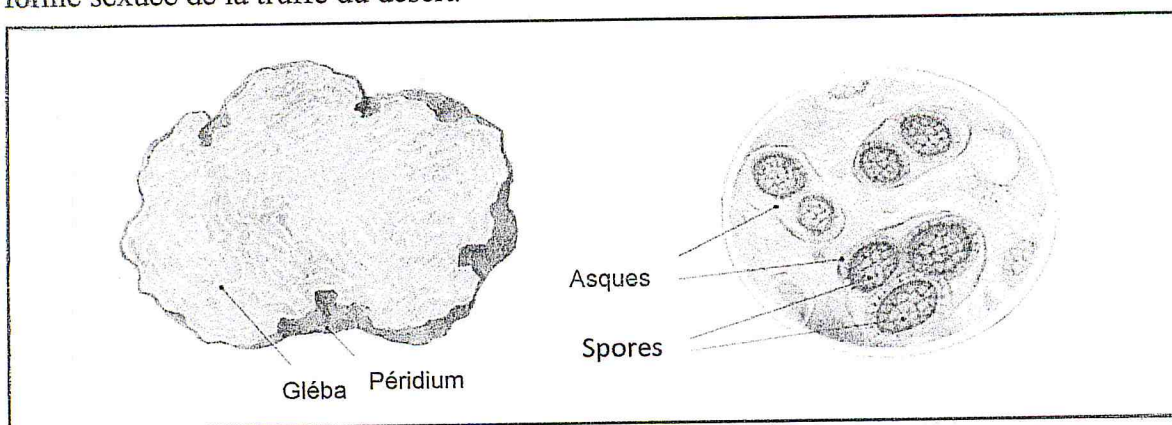


Figure I.4 : Schéma représentatif de la forme sexuée de la truffe de désert [61].


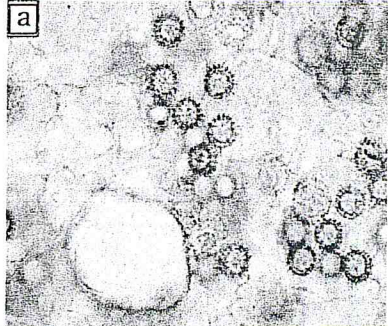

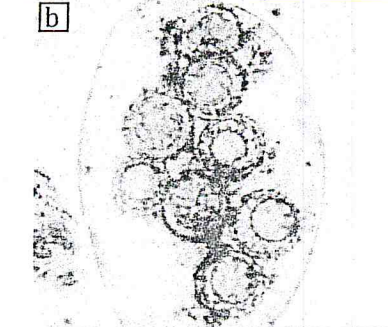
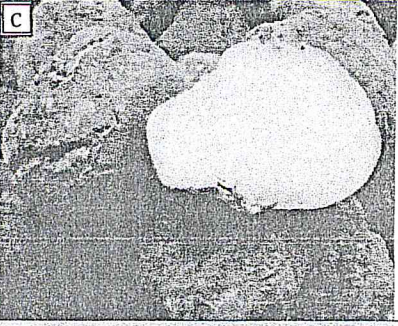
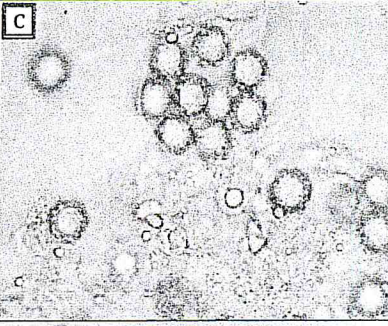

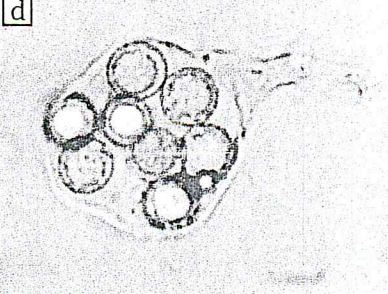
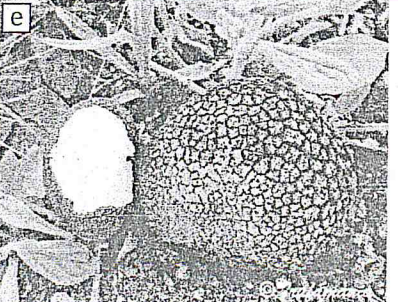
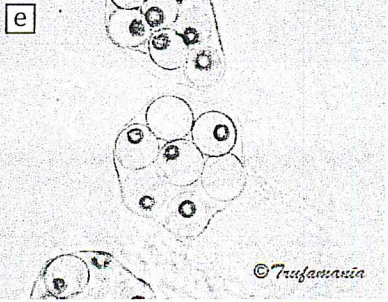
Le tableau I.2 représente les critères distinctifs entre les deux genres *Terfezia* et *Tirmania* [24] :

Tableau I.2 : Quelques critères distinctifs entre deux genres de Terfez.

	Critères	Genres	
		<i>Terfezia</i>	<i>Tirmania</i>
Morphologie de l'ascocarpe	Forme	Subglobuleuse à turbinée ou irrégulière	Subglobuleuse à turbinée ou lobée
	Diamètre	2 à 10 cm	>14 cm
	Configuration de la surface	Lisse, glabre	Lisse, glabre, ridée ou craquelée
	Couleur externe	Jaune-brunâtre à brun ou brun-noir	blanc-jaunâtre à marron claire
	Structure de la gléba	Solide comportant un réseau de veines stériles blanches délimitant les nodules fertiles jaunâtres à brunâtres	Solide comportant un réseau de veines stériles blanches délimitant les nodules fertiles blancs à jaune claire ou ochracés
Péridium	Présence ou non	Présence	Présence
	Cuticule externe	hyphes entrelacées ou mêlées à des cellules isodiamétriques	hyphes entrelacées ou parallèles
Asques	Forme	Globuleuse ou en sac	Ellipsoïde
	Nombre de spores par asque à maturité	4-8	8
	Arrangement des spores dans l'asque	Irrégulièrement groupées	Irrégulièrement groupées
	Réaction iodée avec le réactif de Melzer	Jaune à orange (non amyloïde).	Bleu (amyloïde)
	Arrangement des asques	Indéhiscents, répartis au hasard dans les tissus	Indéhiscents, répartis au hasard dans les tissus
	Couleur avec KOH	Hyaline	Hyaline
Spores	Ornementation à maturité	Sphériques avec des épines, papilles libres ou incluses dans un mucilage ou avec un réseau	Ellipsoïdes ou sphériques lisses ou si elles sont rugueuses, incluses dans une épispore lisse et hyaline
	Couleur à maturité	Jaune-pale à brune	Hyaline
	Nombre d'espèces	12	2
	Plantes associées	Hélianthème	Hélianthème

Le tableau I.3 montre l'aspect macroscopique de quelques truffes du désert qui existent en Algérie et l'aspect microscopique de leurs ascospores [62].

Tableau 1.3 : Aspects macroscopiques et microscopiques de quelques truffes désertiques d'Algérie.

Espèce	Aspect macroscopique	Aspect microscopiques des ascospores
<i>Terfezia fanfani</i>	 <p>Figure a: A large, white, spherical truffle with a smooth surface, growing on the ground in a natural setting.</p>	 <p>Figure a: Microscopic view showing several circular ascospores with distinct cell walls and internal structures.</p>
<i>Terfezia leptoderma</i>	 <p>Figure b: Multiple truffles of varying sizes, some showing a cracked or textured surface, growing in a natural environment.</p>	 <p>Figure b: Microscopic view of a single, elongated ascospore containing several smaller, circular spores.</p>
<i>Terfezia claveryi</i>	 <p>Figure c: A large, white, spherical truffle with a smooth surface, growing on the ground.</p>	 <p>Figure c: Microscopic view showing several circular ascospores with distinct cell walls and internal structures.</p>
<i>Tirmania pinoyi</i>	 <p>Figure d: Two truffles with a cracked, textured surface, growing in a natural setting.</p>	 <p>Figure d: Microscopic view of a single, large, circular ascospore containing several smaller, circular spores.</p>
<i>Picoa juniperi</i>	 <p>Figure e: A large, spherical truffle with a highly textured, cracked surface, growing on the ground.</p>	 <p>Figure e: Microscopic view showing several circular ascospores with distinct cell walls and internal structures.</p>

I.7. Taxonomique du Terfez

Les clés de la classification taxonomique classique des Terfez sont basées essentiellement sur les caractères morphologiques c'est-à-dire les caractéristiques du péridium (aspect, couleur, forme des hyphes) et sur celles des spores (nombre, forme, ornementation) et des caractères complémentaires (forme ou taille des corps fructifères, coloration de la gléba, disposition des veines, odeur...). Le tableau I.4 représente la systématique des genres *Terfezia* et *Tirmania* [24].

Tableau I.4 : Classification systématique des genres *Terfezia* et *Tirmania*.

Règne	<i>Fungi</i>
Embranchement	<i>Septomycota</i>
Sous-embranchement	<i>Ascomycotina</i>
Classe	<i>Euascomycetes</i>
Sous-classe	<i>Discomycetidae</i>
Ordre	<i>Tubérales</i>
Famille	<i>Terfeziaceae</i>
Genre	<i>Terfezia</i> ou <i>Tirmania</i>

L'ordre *Tubérales* a été, cependant, abandonné et ses membres ont été déplacés dans de l'ordre des *Pézizales*. Les deux genres *Terfezia* et *Tirmania* ont été placés dans la famille de *Pezizaceae* dans cet ordre [24].

Les espèces de la truffe du désert sont réparties sur trois genres : *Terfezia*, *Tirmania* et *Picoa*. Selon Trappe (1979), le genre *Terfezia* regroupe douze (12) espèces, celui de *Tirmania* est représenté par deux (02) espèces et *Picoa* trois (03) espèces [24].

Le genre *Terfezia*

1. *Terfezia claveryi* (Chatin).
2. *Terfezia spinosa* (Hark).
3. *Terfezia longii* (Gilkey).
4. *Terfezia arenaria* (Moris).
5. *Terfezia leptoderma* (Tul.).
6. *Terfezia gigantea* (Imai).
7. *Terfezia boudieri* (Chatin).
8. *Terfezia pfeilii* (Henn).
9. *Terfezia austroafricana* (Marasas et Trappe).
10. *Terfezia erimita* (Malençon).
11. *Terfezia decaryi* (Heim).
12. *Terfezia terfezioides* (Fischer et Trappe).

Le genre *Tirmania*

1. *Tirmania nivea* (Desf) Trappe.
2. *Tirmania pinoyi* (Maire) Malençon

Le genre *Picoa*

1. *Picoa lefebvrei*
2. *Picoa carthusiana*
3. *Picoa juniperi*

I.8. Cycle de reproduction

Les stades du cycle biologique des truffes des sables sont partiellement connus ou très complexes et les hypothèses proposées sur certaines étapes restent encore obscures [5, 25].

Dans les conditions défavorables, nous avons la disparition de l'ensemble des hyphes et la formation d'un mycélium primaire. Afin qu'une reproduction aura lieu, il faut que ce mycélium rencontre un autre mycélium primaire de sexe opposée pour former un mycélium secondaire hétérocaryotique, ce dernier s'associe aux racines de la plante hôte (cistacée ou autre) et crée un mycorhize permettant au champignon de se nourrir. L'initiation fructifère débute par la formation du primordium à proximité des racines, chaque peloton évolue en ascome terfezien qui produit à sa base, à partir d'agrégats d'hyphes lâches présents dans le sol, un pédicule de 2 à 15 cm [63, 65].

I.9. Propriétés biologiques

Une grande partie de l'histoire des utilisations médicinales des truffes du désert autour du monde a été perdue. Cependant, la continuité de l'utilisation ces champignons dans la médecine traditionnelle a mené à la recherche scientifique moderne sur les propriétés médicinales de ces derniers. La recherche concernant les propriétés antioxydantes des truffes du désert démontre qu'elles contiennent une variété d'antioxydants et soulève la question de savoir si les truffes peuvent être utilisées comme aliment fonctionnel qui pourrait potentiellement jouer un rôle dans l'entretien de santé et la prévention des maladies [65].

Plusieurs travaux ont étudié l'activité antibactérienne des truffes des sables. Différentes espèces de *Terfezia* et de *Tirmania* ont été évaluées contre une grande variété d'espèces bactériennes et ont montré une activité antimicrobienne élevée à modérée [64].

En outre, les truffes du désert se sont avérées pour être une source de composés thérapeutiques ayant des propriétés anti-inflammatoires, antituberculeuses, anti-angiogéniques et hépatoprotectrices [8-11].

Ces données révèlent que les truffes des sables possèdent une activité biologique importante contre une large gamme d'agents pathogènes humains et ont le potentiel d'être utilisées en tant qu'agents thérapeutiques.

I.10. Composition chimique des truffes désertiques

I.10. 1) Valeurs nutritionnelles

Kagan-Zur *et al.* (2008) ont examiné la composition chimique des truffes du désert, constatant que la matière sèche (MS) était constituée de 20 - 27% de protéines, dont 85% sont digestes par les humains, 3 - 7.5% de matières grasses (acides gras insaturés et saturés)

et environ 60% de glucides avec 7 - 13% de fibres brutes, mettant en évidence ses 2 - 5 mg/100 g d'acide ascorbique [5].

I.10. 2) Glucides et fibres alimentaires

La teneur en glucides pour l'espèce *Terfezia claveryi* était égale à 64.55% avec 8.32% de fibres brutes et 4.25% de cendre. Ces résultats étaient en accord avec les données indiquées par Ahmed *et al.* (1981) pour *Terfezia boudieri* (Libye) avec les valeurs suivantes : 6.4 à 59.63% d'hydrate de carbone, 3.80 % de fibres brutes et 12.88% de cendre [66].

Nutritionnellement, les glucides digestibles et non digestibles font à *Tirmania nivea* un aliment très sain fournissant l'énergie et les fibres qui sont essentielles pour la fonction de la voie intestinale [66].

I.10. 3) Acides aminés

Pour la première fois, Sawaya *et al.* (1985) ont démontré que tous les acides aminés essentiels étaient présents dans les trois espèces de truffe d'Arabie saoudite, y compris les acides aminés contenant du soufre (méthionine, cystine), en plus de bons niveaux de tryptophane et de lysine, qui sont généralement les acides aminés limitants dans de nombreux aliments d'origine végétale. Ces acides aminés contenant du soufre étaient présents en des quantités de 1.2 - 5.9 g pour 100 g de protéine, bien à l'intérieur de limites respectables [67].

L'ascocarpe de *Terfezia boudieri* renferme les acides aminés suivant (tableau I.5) [68] :

Tableau I.5 : Composition de l'ascocarpe de *Terfezia boudieri* en acides aminés.

Acide aminé	g/100 g de PS	Acide aminé	g/100 g PS
Alanine	1.11	Lysine	0.56
Arginine	0.44	Méthionine	0.33
Acide aspartique	1.56	Phénylalanine	0.67
Cystine	0.28	Proline	0.98
Acide glutamique	2.25	Sérine	0.94
Glycine	0.77	Thréonine	1.10
Isoleucine	0.75	Tyrosine	0.50
Leucine	1.11	Valine	0.84

PS : poids sec

I.10. 4) Acides gras

Le profil et la composition des acides gras obtenus par plusieurs auteurs sont comparés au tableau I.6, qui montre les différents niveaux d'acides gras. Les acides gras linoléiques (C18: 2), oléique (C18: 1), palmitique (16: 0) et stéarique (C18: 0) ont été les quatre principaux acides gras détectés pour *Terfezia* et *Picoa* (Tableau I.6). Les données

obtenues par Murcia *et al.* (2003) sont similaires aux résultats indiqués par Bokhary *et al.* (1989), bien qu'ils aient détecté un pic inconnu (5.3%) lié à un acide gras à chaîne plus longue. Murcia *et al.* (2003) ont observé un signal représentant 3.9% du total en tant qu'acide gras 24:0 et ceci a été vérifié par GC-MS [69].

Tableau I.6 : Composition des acides gras de *Terfezia* et *Picoa* obtenue par divers auteurs.

Acide gras	Pourcentage (%)	
	<i>Terfezia claveryi</i> (Arabie saoudite)	<i>Picoa juniperi</i> (Espagne)
C14:0	4	1.2
C15:0	2	0.4
C16:0	16	8.0
C16:1	7	2.5
C17:0	18	0.9
C18:0	7	2.2
C18:1	5	23.5
C18:2	3	53.3
C18:3	-	2.1
C19:0	11	-
C20:0	5	2.1
C21:0	1	NI
C22:0	1	0.8
C22:1	8	2.0
C24:0	-	1.5

NI non-identifié

C14:0 Acide myristique

C15:0 Acide pentadecanoïque

C16:0 Acide palmitique

C16:1 Acide palmitoleïque

C17:0 Acide margarique

C18:0 Acide stearique

C18:1 Acide oleïque

C18:2 Acide linoléique

C18:3 Acide linoléique

C19:0 Acide nonadecanoïque

C20:0 Acide arachidique

C21:0 Acide heneicosanoïque

C22:0 Acide docosanoïque

C22:1 Acide erucique

C24:0 Acide lignocérique

1.10. 5) Contenu des minéraux

Une grande variance dans les minéraux présents (Si, K, Na, Ca, Mg, Mn, Fe, Al, P, S, Cu et Zn) et leurs quantités ont été trouvés dans les truffes fraîches [193]. Les compositions minérales obtenues pour *Terfezia boudieri* étaient comme suit : Ca 68.0 mg, Na 29.0 mg, K 996.0 mg, Fe 17.0 mg, Mn 2.2 mg, Cu 8.3 mg et Zn 13.0 mg (exprimé/100 g de MS) [68].

D'autre part, Sawaya *et al.* (1985) ont observé pour *Terfezia claveryi* et *Tirmania nivea* des quantités élevées de K 730 mg et P 756 mg et des niveaux équitables de Ca 129 mg, Na 199 mg, Mg 104 mg, Fe 10.68 mg, Cu 1.69 mg, Zn 5.10 mg et Mn 0.48 mg (exprimé / 100 g de MS) [67].

1.10. 6) Composés volatils

En 1995, Chellal a permis d'identifier 20 composés volatils dans les ascocarpes de *Tirmania pinoyi* d'Algérie (tableau I.7) parmi lesquels le phényléthanol (38% de l'extrait volatil total) et quelques dérivés de pyrazines (un total de 4.8 % pour le 2,5-diméthyl pyrazine, le triméthyl pyrazine, le 3-éthyl-2,5-diméthyl pyrazine et le 2-éthyl 3,5,6 triméthylpyrazine) [195, 196] et il a identifié 17 composés volatils majeurs chez *Terfezia boudieri* (tableau I.8) contiennent 12 % d'acide octanoïque et aucun dérivé des pyrazines [70, 71].

Tableau I.7 : Composés volatils majeurs des ascocarpes de *Tirmania pinoyi*.

Composés volatils	Pourcentage (%)
Acide butyrique	11.0
Isovaléraldéhyde	0.7
4-hydroxy, 4-méthyl-2-pentanone	4.0
Acide valérique	11.0
Hexanoate de méthyle	10.0
2,5-diméthyl pyrazine	0.5
Triméthyl pyrazine	0.9
Phényléthanal	0.3
4,7-diméthyl-1,6-diène-4-ol	0.5
3-éthyl-2,5-diméthyl pyrazine	2.5
Phényléthanol	38.0
Acétate de phénéthyle	1.0
2-éthyl-3,5,6-triméthylpyrazine	0.9
Acide phénylacétique	1.0
Acide octanoïque	0.8
N-2-phényl éthyl acétamide	1.3
4-nonyl phénol	1.2
Acide décanoïque	0.8
Acide laurique	5.0
Acide myristique	3.0

Tableau I.8 : Composés volatils présents dans l'ascocarpes de *Terfezia boudieri*.

Composés volatils	Pourcentage (%)
Isovaléraldéhyde	2.4
Valéraldéhyde	4.8
4-hydroxy, 4-méthyl-2-pentanone	7.0
Acide valérique	6.2
Hexanoate de méthyle	4.8
Nonane	1.8
Acide hexanoïque	3.8
Décane	2.4
1,8 cinéole	4.2

En 2016, Dahham *et al.* ont étudiés les propriétés biologiques et les compositions chimiques de la truffe noir d'Iraq *Terfezia claveryi* et ils ont montrés l'existence des terpènes, des stérols et autres composés volatiles représentés dans le tableau I.9 [72].

Tableau I.9 : Compositions chimiques principales de *Terfezia claveryi*.

Composés	Pourcentage (%)
Acide hexadécanoïque	2.89
Acide octadécanoïque	4.98
Acide oléique	4.86
Acide ascorbique	1.85
Squalene	10.09
Campestanol	2.56
Stigmastérol	31.10
β -Sitostérol	15.73
Lupéol	6.42

I.10. 7) Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont les principaux constituants contribuant à l'activité antioxydante des truffes du désert. Les données disponibles indiquent la présence des phénols libres et liés, y compris les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (tableau I.10).

Tableau I.10 : Les moyennes, les écart-types et les pourcentages de différents antioxydants trouvés chez *Tirmania nivea*.

Composés antioxydants		mg/100 g (MS) \pm (Ec-T)	Pourcentage (%)	Remarques
Phénols	Totaux ^a	1811.5 \pm 330.15	100	
	Liés ^a	494.67 \pm 207.77	27.3	
	Libres ^a	1316.8 \pm 176.16	72.7	
	Phénoliques non-flavonoïdes ^a	1027.0 \pm 176.16	78.8	
	Phénoliques flavonoïdes ^a	289.83 \pm 26.99	22	Estimé par la méthode AlCl ₃
	Flavanones	48.67 \pm 29.63	3.6	Estimé par la méthode DNPH
	Flavonoïdes totaux	338.50 \pm 28.31	24.8	
	Anthocyanines ^b	11.98 \pm 9.20	0.012	

^aMoyenne d'échantillons en triple provenant de six sources différentes

^bMoyenne d'échantillons en triple provenant de quatre sources différentes

En 2013, une étude de l'extrait méthanolique de l'espèce *Terfezia boudieri* de Turquie par HPLC révèle des teneurs élevées en acides phénoliques. Les résultats sont présentés dans le tableau I.11 [73].

Tableau I.11 : Quelques composés phénoliques de *Terfezia boudieri*.

Composés phénoliques	Composition (mg/g)
Acide caféique	ND
Catéchine	20
Acide cinnamique	6
Acide férulique	15
Acide gallique	ND
Acide <i>p</i> -coumarique	10
Quercetine	ND

ND non-déterminée

Özyürek *et al.* ont étudié les propriétés antioxydantes de trois champignons comestibles de Turquie. Ils ont déterminé par UPLC-ESI-MS/MS les teneurs des composés phénoliques présents ainsi dans *Terfezia boudieri* (Tableau I.12) [74].

Tableau I.12 : Concentrations des phénols trouvés dans *Terfezia boudieri*.

Phénol	µg/g de PS
Acide gallique	0.06 ± 0.003
Acide protocatechuique	1.03 ± 0.070
Acide vanillique	6.94 ± 0.36
Acide syringique	0.66 ± 0.027
Rutine	0.072 ± 0.005
Hesperidine	0.40 ± 0.028
Acide rosmarinique	0.17 ± 0.010
Quercetine	0.25 ± 0.016
Naringenine	0.084 ± 0.004
Kaempférol	0.53 ± 0.026
Apigénine	0.40 ± 0.019

PS : poids sec

Une autre étude a été faite par l'analyse HPLC-DAD pour la même espèce afin d'évaluer les concentrations des flavonoïdes [75]. Les résultats sont représentés dans le tableau I.13.

Tableau I.13 : Contenu des flavonoïdes dans *Terfezia boudieri*.

Flavonoïdes	Teneur (µg/100g PS)
Myricetine	1.75
Kaempférol	0.25
Naringine	98.75
Naringenine	0.25
Resveratrol	2.25

PS : poids sec

Stojković *et al.* (2013) ont réussi également de quantifier deux acides phénoliques dans les corps fructifères de *Tirmania pinoyi* (tableau I.14) [76].

Tableau I.14 : Acides phénoliques trouvés chez *Tirmania pinoyi* (moyenne \pm écart-type).

Acides phénoliques	$\mu\text{g}/100\text{g PS}$
Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	300.65 ± 9.92
Acide cinnamique	8.30 ± 0.55

PS : poids sec

I.10. 8) Anthocyanines

Généralement, les champignons supérieurs ne contiennent pas d'anthocyanines et seul un nombre limité contiennent des caroténoïdes. On a signalé que *Tirmania nivea* contenait un faible taux d'anthocyanines (12 mg/100 g ou 0.012%) en utilisant un dosage différentiel du pH. Une autre preuve possible de la présence d'anthocyanines chez *Tirmania nivea* provient de l'expérience d'extraction en phase solide [8].

Les anthocyanines sont des antioxydants très puissants et leurs performances dépassent celles de l'acide ascorbique et les α -tocophérols dans de nombreux systèmes. Le rôle des anthocyanes comme protecteur contre le stress oxydatif chez les plantes a été récemment examiné. Ils agissent comme des chélateurs des métaux de transition et comme des agents de masquage optique.

I.10. 9) Acide ascorbique

La teneur moyenne en acide ascorbique de *Tirmania nivea* provenant de quatre sources différentes était de 9.63 ± 1.52 mg/100 g, ce qui représente $\sim 0,01\%$ de la matière sèche totale. Une différence significative a été observée entre les sources, avec une différence double entre le plus faible et le plus élevé [8].

À de tels niveaux bas, il est raisonnable de supposer que l'acide ascorbique, bien qu'un antioxydant puissant, n'a qu'un rôle mineur à jouer dans l'activité antioxydante de *Tirmania nivea* et d'autres truffes par rapport aux composés phénoliques. Il convient de noter cependant que des taux plus élevés d'acide ascorbique ($\sim 5\%$) ont été signalés dans certaines truffes [77].

I.10. 10) Vitamines

Dabbour et Takruri (2002) ont étudié la teneur en vitamines et ont conclu que *Terfezia claveryi* est relativement riche en thiamine et très riche en riboflavine, en niacine, en acides pantothéniques et en pyridoxine [78].

I.11. Activité antioxydante

Une attention particulière a été portée à la capacité antioxydante des truffes du désert afin d'estimer leur aptitude à l'enrichissement nutritionnel des aliments. Les effets antioxydants des trois genres *Terfezia*, *Tirmania* et *Picoa* ont été évalués et ils ont montré une excellente capacité antioxydante [8, 13, 79].

Les valeurs moyennes des activités antioxydantes de truffes des sables fraîches et séchées mesurées ont été déterminées à l'aide de plusieurs dosages en utilisant différentes méthodes. Parmi ces activités :

- i) Piégeage des radicaux pyroxylés.
- ii) Piégeage des radicaux hydroxyles.
- iii) Piégeage du peroxyde d'hydrogène.
- iv) Activité de chélation du fer.

Conclusion

Les truffes du désert sont une famille complexe de champignons ascomycètes hypogés comestibles, elles poussent en association avec les racines des plantes hôtes dans toutes les terres vierges arides et semi-arides sur tous les continents autres que l'Antarctique.

Les Terfez ont une très longue histoire d'utilisation, ils ont été traditionnellement recueillis non seulement pour la nourriture, mais également pour leurs propriétés curatives qui ont mené à la recherche scientifique moderne sur les propriétés médicinales de ces truffes. Elles ont montré des propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes, antituberculoïdes, anti-angiogéniques, hépatoprotectrices et antimicrobiennes contre une large gamme de bactéries et de levures.

Les études des substances naturelles dans les truffes de désert montrent l'existence de différents composés : des terpènes, des stérols, des acides gras, les phénols, les flavonoïdes, les anthocyanines, les caroténoïdes et les vitamines C et B. La capacité antioxydante liée à ces constituants chimiques permet à la truffe de piéger les radicaux libres tels que les pyroxyles, les hydroxyles et également le peroxyde d'hydrogène, l'oxyde nitrique et les métaux lourds.

Enfin, les méthodes et les techniques d'extraction et d'analyse des produits naturels dans les truffes sont également diversifiées et parmi les appareils habituellement utilisés, nous avons trouvé : la chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie liquide à haute performance, la spectroscopie de masse et quelques techniques spectrophotométriques.

CHAPITRE II

Application de la chimiométrie à 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 [87].

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 [88].

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 [89].

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 [89].

II.1. Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge (parfois désignée comme spectroscopie 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 [90, 91].

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 [88, 91].

Les spectromètres infrarouges à transformée de Fourier sont aujourd'hui principalement utilisés et ont amélioré radicalement l'acquisition des spectres infrarouges [91].

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 [92].

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 [92].

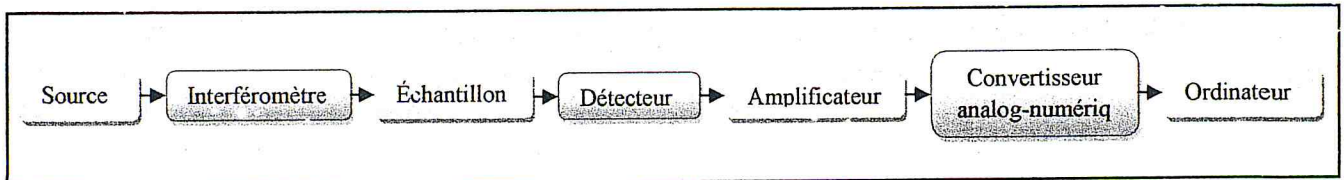


Figure II.1 : Composants de base d'un spectromètre IRTF.

II.2. a) Interféromètre de Michelson

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 [93].

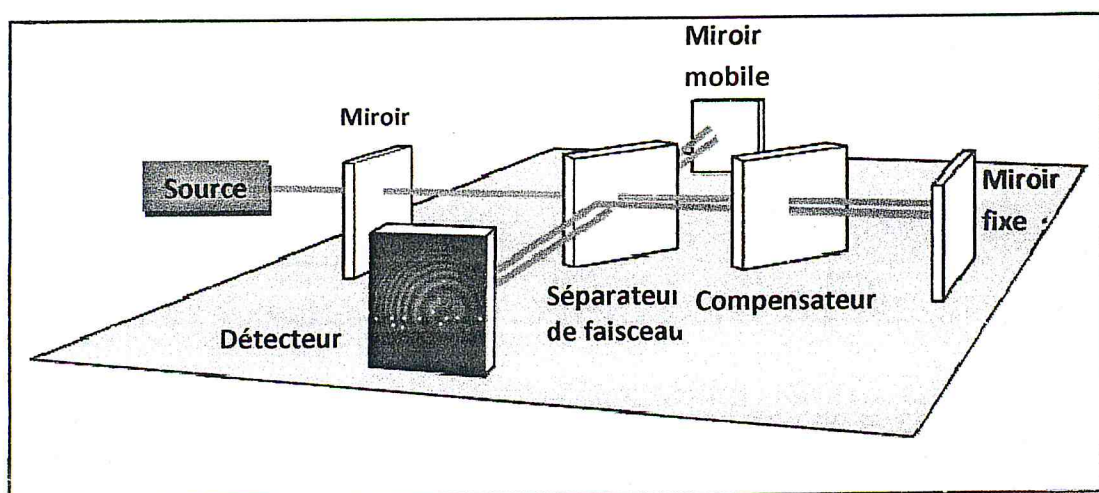


Figure II.2 : Schéma d'un interféromètre de Michelson [93].

II.2. b) Sources et détecteurs

Les spectromètres IRTF utilisent une source thermique (Globar ou Nernst Glower) pour la région de l'infrarouge moyen. Si l'on veut examiner la région de l'infrarouge lointain, on peut utiliser une lampe mercure à haute pression [92].

Et il y a deux détecteurs généralement utilisés pour la zone de l'infrarouge moyen. Le détecteur normal pour usage routinier est un dispositif pyroélectrique incorporant du sulfate triglicine deutéré (DTGS) dans une fenêtre d'halogénure alcalin résistante à la chaleur. Pour des travaux plus sensibles, le tellurure de mercure-cadmium (MCT) peut être utilisé, mais cela doit être refroidi aux températures d'azote liquide [92].

II.3. Méthodes d'analyse

II.3. a) 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 [88, 94].

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 :

$$l = \frac{n}{2(\sigma_1 - \sigma_2)} \quad \text{Eq. II.1}$$

Où n est le nombre de franges de crête à crête complètes entre deux maximums (ou minimums) à σ_1 et σ_2 . Si le spectromètre est calibré en longueurs d'onde, le n dans l'équation (2.5) peut être converti à une forme plus commode :

$$l = \frac{n(\lambda_1 \times \lambda_2)}{2(\lambda_1 - \lambda_2)} \quad \text{Eq. II.2}$$

Où les valeurs des longueurs d'onde, λ , sont exprimées en cm.

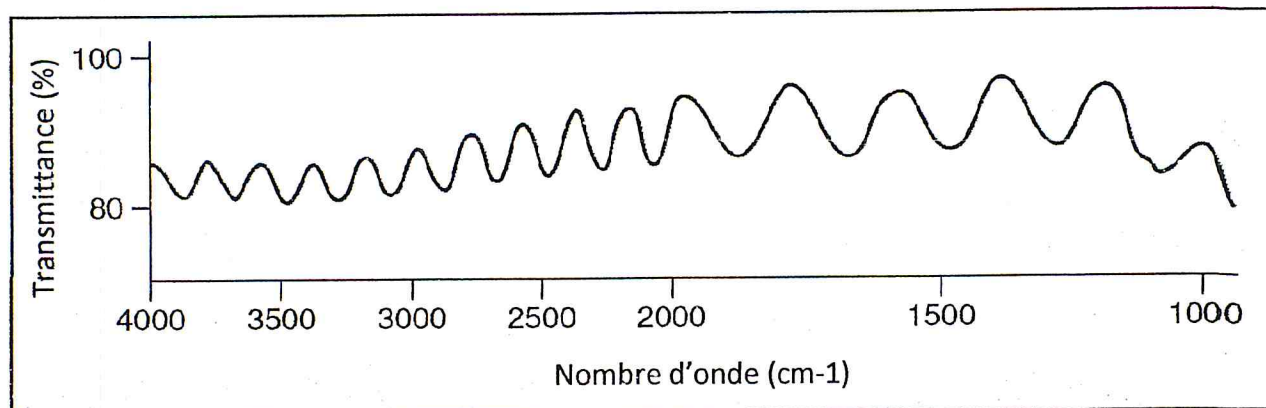


Figure II.3 : Modèle d'interférence enregistré avec une cellule vide.

II.3. b) 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 [95, 96].

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 [89, 97].

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 [98].

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 :

$$A = \epsilon l C$$

Eq. II.3

Où A est l'absorbance de la solution, C la concentration et l la longueur du trajet de l'échantillon. La constante de proportionnalité est généralement donnée par le symbole grec epsilon, ϵ , et est appelée l'absorptivité molaire [98].

L'absorbance est égale à la différence entre les logarithmes de l'intensité de la lumière entrant dans l'échantillon (I_0) et l'intensité de la lumière transmise (I) par l'échantillon :

$$A = \log I_0 - \log I = \log(I_0/I) \quad \text{Eq. II.4}$$

L'absorbance est donc sans dimension. La transmittance est définie comme suit :

$$T = I/I_0 \quad \text{Eq. II.5}$$

Alors :

$$A = -\log(I/I_0) = -\log T \quad \text{Eq. II.6}$$

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 [99, 100].

La loi de Beer-Lambert nous dit qu'une courbe d'absorbance contre 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

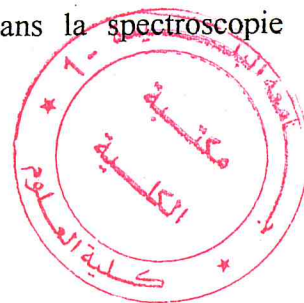
de composition chimique (sortie). L'établissement de ces équations suppose l'ajustement des paramètres affectant les valeurs d'entrée pour arriver aux valeurs de sortie les plus proches possibles de la réalité [101].

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 [102].

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 [103, 104].

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 [102].

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 [105].

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 [106].

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) [105, 107].

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 [105, 107].

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 [108]. Les chimistes se sont intéressés aux méthodes multivariées dès lors que l'approche univariée ne permettait pas de traiter des spectres complexes [109].

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 [108].

Pour fixer les notations, d'une manière générale, le modèle de la régression PLS s'écrit [110, 111] :

$$X = t_1 p_1^T + t_2 p_2^T + t_3 p_3^T + \dots + t_A p_A^T + E_A \quad \text{Eq. II.7}$$

$$y = t_1 q_1 + t_2 q_2 + t_3 q_3 + \dots + f_A \quad \text{Eq. II.8}$$

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) [108].

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 [110, 111] :

$$W_1 = E_0^T f_0 = X^T Y \quad \text{Eq. II.9}$$

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

$$t_1 = E_0 W_1 = X W_1 \quad \text{Eq. II.10}$$

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

$$p_1 = \frac{E_0^T t_1}{t_1^T t_1} \quad \text{Eq. II.11}$$

$$q_1 = \frac{f_0^T t_1}{t_1^T t_1} \quad \text{Eq. II.12}$$

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

$$E_1 = E_0 - t_1 p_1^T \quad \text{Eq. II.13}$$

$$f_1 = f_0 - t_1 q_1^T \quad \text{Eq. II.14}$$

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

$$W_2 = E_1^T f_1 \quad \text{Eq. II.15}$$

$$t_2 = E_1 W_2 \quad \text{Eq. II.16}$$

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

$$E_a = E_{a-1} - t_a p_a^T \quad \text{Eq. II.17}$$

$$f_a = f_{a-1} - t_a q_a^T \quad \text{Eq. II.18}$$

$$w_a = E_{a-1}^T f_{a-1} \quad \text{Eq. II.19}$$

$$t_a = E_{a-1} w_a \quad \text{Eq. II.20}$$

$$p_a = \frac{E_{a-1}^T t_a}{t_a^T t_a} \quad \text{Eq. II.21}$$

$$q_a = \frac{f_{a-1}^T t_a}{t_a^T t_a} \quad \text{Eq. II.22}$$

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 [108] :

$$e_0 = x_0 - \bar{X} \quad \text{Eq. II.23}$$

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

$$t_{a0} = e_{a-1} w_a \quad \text{Eq. II.24}$$

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

$$e_a = e_{a-1} - t_{a0}p_a \quad \text{Eq. II. 25}$$

Finalement, lorsqu'on fixe le nombre A de composantes, la valeur prédite pour y s'écrit [110, 111] :

$$\hat{y}_{A0} = \sum_{a=1}^A t_{a0}q_a \quad \text{Eq. II. 26}$$

II.9. Généralités 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 [112, 113].

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 » [114].

Dans la littérature il existe deux propositions pour définir les polyphénols. La première les définit comme étant une structure moléculaire qui porte plusieurs groupements 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 [115, 116].

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] [117, 118].

II.10. Quelques composés phénoliques existants chez les truffes du désert

D'après les travaux de recherche antérieurs réalisés sur les Terfez, les composés phénoliques majoritaires dans ces champignons étaient surtout des acides phénoliques (acide *p*-hydroxybenzoïque, acide férulique, acide cinnamique, acide vanillique et l'acide *p*-coumarique) suivi par des flavonoïdes et des flavanones (Naringine, Resveratrol, Myricetine, Kaempférol, Apigénine,...) puis par les anthocyanines (Cyanidine).

II.10. a) Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la plus vaste classe de composés phénoliques. A présent plus de 4000 composés ont été identifiés soit environ 50% des polyphénols [116].

Les flavonoïdes sont caractérisés par une structure chimique de phénylbenzopyrane. La structure générale comprend un squelette C₁₅ (C₆-C₃-C₆) lié à un cycle chromane (groupe benzopyrane). Le noyau benzopyrane hétérocyclique est connu sous le nom de cycle C, le cycle aromatique fusionné comme le cycle A et le groupement phényle comme cycle B [119].

Selon la position du cycle aromatique sur la partie benzopyrane, les flavonoïdes peuvent être groupés en quatre classes : flavonoïdes majeurs (2-phénylbenzopyranes), isoflavonoïdes (3-benzopyranes), néoflavonoïdes (4-benzopyranes) et flavonoïdes mineurs [119]. Quelques structures des flavonoïdes avec des exemples sont représentées sur la figure II.4.

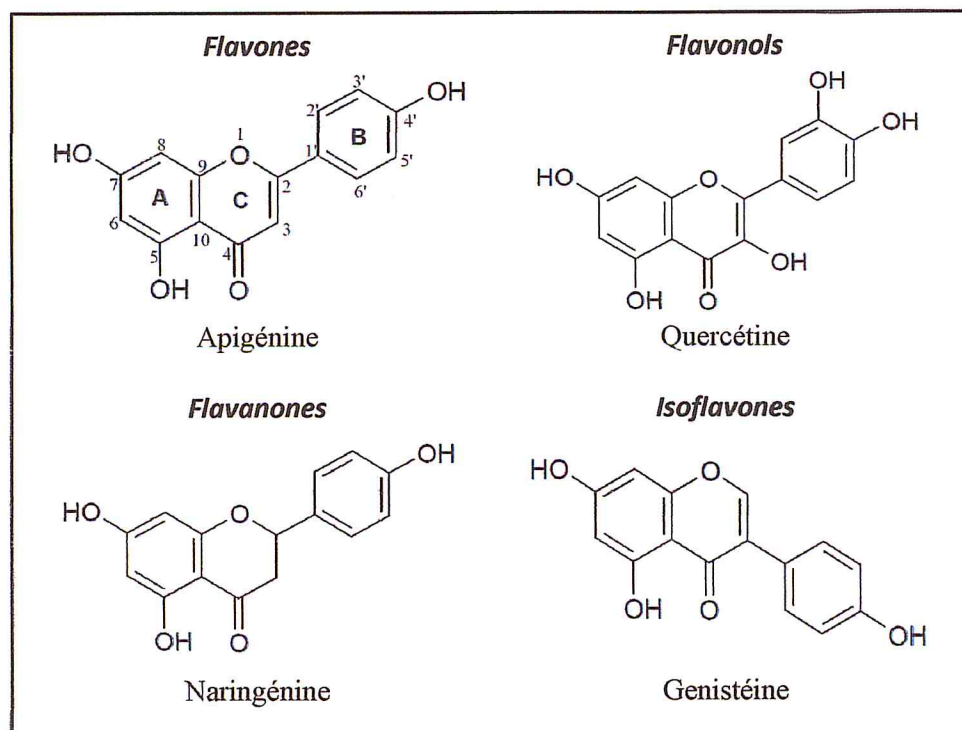


Figure II.4 : Structure chimique et classe de quelques flavonoïdes.

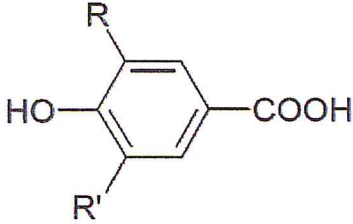
Les techniques d'identification et de quantification des flavonoïdes, telles que HPLC-DAD ou LC-MS, sont diverses et certaines d'entre elles explorent leurs propriétés d'absorption UV, qui permettent habituellement de distinguer les différentes classes [120].

De plus en plus, les flavonoïdes font l'objet de recherches médicales. Ils ont été rapportés que ces composés possèdent plusieurs propriétés utiles, y compris les activités anti-inflammatoire, oestrogénique, inhibition enzymatique, anti-microbienne, antiallergique, antitumorale vasculaire et cytotoxique, mais l'activité antioxydante est, sans aucun doute, la plus étudiée attribuée aux flavonoïdes. Cette activité antioxydante bien établie des flavonoïdes est également responsable d'autres activités biologiques dans lesquelles la prévention du stress oxydatif [119, 121].

II.10. b) Acides phénoliques

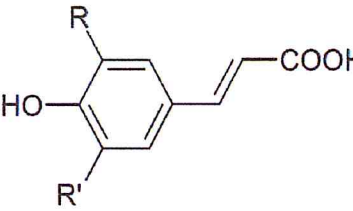
Les acides phénoliques sont rares dans la nature. Ces composés sont formés de deux catégories : la première catégorie contient les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque qui par monohydroxylation et/ou polyhydroxylation forme des acides phénoliques et des acides polyphénoliques respectivement l'acide gallique et l'acide protocatéchique (Tableau II.1) [118, 122].

Tableau II.1 : Principaux acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque.

Structure chimique	R	R'	Acide phénolique
	H	H	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque
	OH	H	Acide protocatéchique
	OCH ₃	H	Acide vanillique
	OH	OH	Acide gallique
	OCH ₃	OCH ₃	Acide syringique

La deuxième catégorie regroupe les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique. De même avec l'acide cinnamique, l'hydroxylation conduit à l'acide *p*-coumarique et à l'acide caféique (Tableau II.2) [118, 122].

Tableau II.2 : Principaux acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique.

Structure chimique	R	R'	Acide phénolique
	H	H	Acide <i>p</i> -coumarique
	OH	H	Acide caféique
	OCH ₃	H	Acide férulique
	OCH ₃	OCH ₃	Acide sinapique

La L-phénylalanine et la L-tyrosine, en tant que constituants C6-C3, sont des précurseurs d'une large gamme de produits naturels. Dans les plantes, une première étape fréquente est l'élimination de l'ammoniac de la chaîne latérale pour produire l'acide *trans*-(*E*)-cinnamique approprié. Dans le cas de la phénylalanine, cela donnerait de l'acide cinnamique, tandis que la tyrosine pourrait donner de l'acide *p*-coumarique [117, 119, 123].

Tandis que les flavonoïdes présentent plusieurs propriétés physiques, qui ont rendu la détection sur le réseau de photodiodes une approche très utile, les acides phénoliques, bien qu'ils puissent être identifiés par HPLC-DAD et LC-MS, mieux que sont analysés par GC-MS, compte tenu de leur volatilité [119].

La plupart des acides phénoliques présentent des propriétés antioxydantes fortes qui sont liées au nombre et à la position des groupements hydroxyles dans la molécule. Cette activité peut s'exprimer de plusieurs façons. Par exemple, l'acide 1,5-dicaffeoylquinique s'est révélé être un hépatoprotecteur lorsqu'il est contesté par le tétrachlorure de carbone, mécanisme qui implique, entre autres, le piégeage des radicaux [124].

II.10. c) Anthocyanines

Les anthocyanines sont des pigments végétaux hydrosolubles, généralement de poids moléculaires allant de 400 à 1200, responsables des couleurs bleue, violette et rouge de nombreux tissus végétaux [115, 125]. Ces composés sont des dérivés polyhydroxy- et polyméthoxy-glycosylés des sels de 2-phénylbenzopyrylium (flavylium). Les sucres les plus communs sont le glucose, le galactose, le rhamnose et l'arabinose. Ces sucres sont habituellement liés à la position 3 du cycle C ou aux positions 5 et 7 du cycle B, et se présentant sous formes de mono-, di- ou tri-saccharide [126].

Malgré la connaissance d'environ 17 anthocyanidines (anthocyanines aglycones), seules six d'entre elles sont répandues dans la nature : la cyanidine (figure II.5), la delphinidine, la pétonidine, la pélagonidine et la malvidine [119].

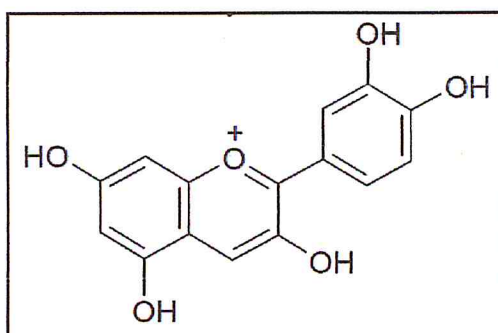


Figure II.5 : Structure chimique de la cyanidine (anthocyanidine).

À l'exception des 3-désoxyanthocyanidines et de leurs dérivés, il existe toujours un groupement glycosyle en C-3, ce qui signifie que les aglycones sont rarement trouvés dans la nature. La partie glucidique peut être acylée par des acides aromatiques, principalement des acides hydroxycinnamiques (acides caféique, férulique, *p*-coumarique ou sinapique) et parfois par des acides aliphatiques, à savoir les acides malonique et acétique. Ces groupements acyle sont habituellement liés au sucre en C-3 [127].

Les possibilités multiples concernant l'identité et la position des sucres et des parties d'acyle, ainsi que la position et le nombre des groupements hydroxy- et méthoxy- sur le squelette anthocyanidique, donnent naissance à un grand nombre de composés, dont plus de 600 anthocyanines sont connues aujourd'hui [128].

Au cours des dernières années, plus d'attention a été donnée à l'étude des adduits entre les anthocyanines et plusieurs autres composés, tels que les acides organiques, d'origine naturelle ou synthétique. Récemment, des propriétés anti-cancéreuses importantes de certaines anthocyanines contre une gamme de lignées cellulaires ont été décrites [129].

Conclusion

La spectroscopie infrarouge est une technique qui exploite l'interaction des rayonnements de la région infrarouge du spectre électromagnétique et de la matière qui provoque des vibrations et des rotations de molécules. Elle recouvre une large gamme de techniques, la plus commune étant un type de spectroscopie d'absorption.

La région infrarouge du spectre comprend la région de nombre d'onde comprise entre 13,000 et 10 cm^{-1} divisée en trois zones principales : infrarouge lointain ($< 400 \text{ cm}^{-1}$), infrarouge moyen (4000 - 400 cm^{-1}) et infrarouge proche (13,000 - 4000 cm^{-1}). Notons également dès à présent que la zone la plus intéressante sur le plan analytique est l'infrarouge moyen.

La spectroscopie IRTF repose sur l'idée de l'interférence du rayonnement entre deux faisceaux pour produire un interférogramme. Les deux domaines de distance et de fréquence sont interconvertibles par la transformation de Fourier. Ceci est réalisable pratiquement à l'aide de l'interféromètre, plus souvent, de Michelson.

Il est facile d'obtenir des spectres d'échantillons dans l'IRTf en solution ou dans les états liquide, solide ou gazeux. Pour les échantillons qui sont difficiles à analyser par ces méthodes, la mesure de réflectance interne peut être effectuée en utilisant une cellule ATR.

Le développement en informatique associée à la spectroscopie IRTF a conduit à l'expansion de la spectroscopie infrarouge quantitative. Cette dernière peut fournir certains avantages par rapport aux autres techniques analytiques non seulement l'analyse sur des systèmes simples (échantillons liquides et solides), mais elle peut aussi être appliquée à des systèmes multicomposantes multivariées.

L'application des méthodes mathématiques statistiques à l'évaluation des données analytiques expérimentales est connue sous le nom de « chimiométrie ». Parmi les méthodes d'analyse chimiométriques utilisées dans la spectroscopie infrarouge, nous avons : CLS, ILS, PCR et PLS. Où la PLS est la méthode la plus utilisée par les chimistes car elle leur permet de traiter des spectres complexes.

La régression par moindres carrés partiels est une méthode analytique quantitative statistique permettant de construire des modèles prédictifs lorsque les variables explicatives sont nombreuses et très corrélées. Le but de la régression PLS est d'extraire des « composantes » 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 (absorbances) pour estimer des composantes U qui permettront de calculer les réponses (concentrations).

CHAPITRE III

Étude expérimentale

Introduction

Les truffes forment une source riche en métabolites primaires (protéines, graisses, glucides, ...). En plus de leur valeur nutritive, elles se sont révélées être une source illimitée de composés avec des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes importantes. Ces propriétés sont liées à ce qu'elles contiennent de divers métabolites secondaires (phénols, terpènes, vitamines et caroténoïdes).

Les travaux de recherche réalisés sur les différentes espèces des truffes du désert montrent une teneur élevée en composés phénoliques, où les acides phénoliques représentent la classe majeure dans ces champignons. 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 « couteux » 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 acides phénoliques majoritaires (l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide cinnamique et l'acide férulique respectivement) chez l'espèce de truffe désertique *Tirmania nivea* par la spectroscopie IRTF en exploitant les principes de la chimiométrie à la calibration multicomposante de la méthode de régression par 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 et au laboratoire des plantes médicinales et aromatiques du département d'agronomie, faculté d'agrovétérinaire, Université de Blida 1.

III.1. Appareillages et réactifs

III.1. a) Spectrophotomètre Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de marque Bruker type Tensor 27, équipé d'un détecteur sulfate triglicine deutéré DTGS à température ambiante, d'une source infrarouge moyen ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$), d'un rayonnement de laser et un diviseur de faisceau KBr a été utilisé. 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 qui a été construite à partir de logiciel intégré Quant 2 d'OPUS pour faire la calibration multicomposante.

La figure III.1 représente un schéma de l'instrumentation utilisée pour l'analyse.

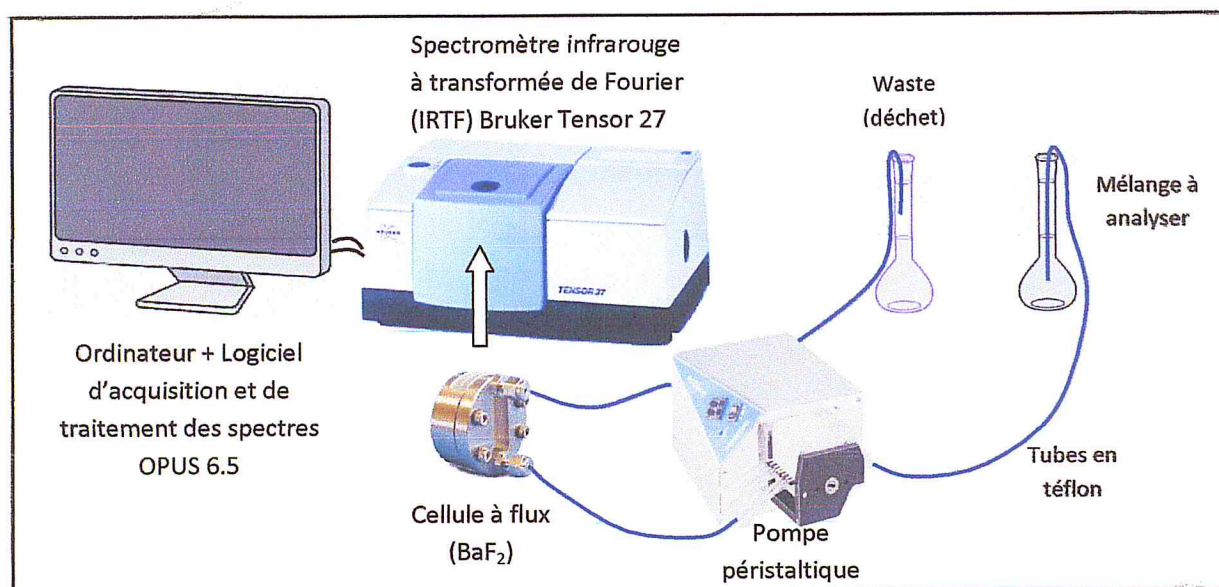


Figure III.1 : Schéma du montage IRTF utilisé pour l'analyse en phase liquide.

III.1. b) Réactifs et produits chimiques

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

Tableau III.1 : Produits chimiques utilisés.

Produit	Pureté (%)	Fournisseur	Pays
Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	99	Aldrich-chemistry	E.U
Acide vanillique	97	Aldrich-chemistry	E.U
Acide <i>trans</i> -cinnamique	97	Aldrich-chemistry	E.U
Acide férulique	/	/	/
Dichlorométhane	≥ 99	Sigma-Aldrich	France
Éthanol absolu	99.9	Sigma-Aldrich	Allemagne
Méthanol	99.7	Sigma-Aldrich	E.U
Chloroforme	99.2	Sigma-Aldrich	Allemagne
Éther de pétrole	/	/	/

III.1. c) Choix des étalons et du solvant

Pour développer un modèle de calibration multicomposante on a choisi une série de quatre (04) phénols qui sont présents dans les truffes à savoir l'acide *para*-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide *trans*-cinnamique et l'acide férulique.

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 que la majorité des acides phénoliques ne sont solubles que dans les alcools, donc on était obligé de tester la solubilité de ces étalons dans un mélange de dichlorométhane et d'éthanol (avec des faibles proportions).

Nous avons fait des modifications de la polarité du dichlorométhane (stabilisé avec l'amylène) en utilisant un mélange CH₂Cl₂/EtOH (v/v) pour favoriser la solubilité des phénols présents dans la truffe. Les résultats sont représentés dans le tableau III.2.

Tableau III.2 : Solubilité des acides phénoliques en fonction de proportion CH₂Cl₂/EtOH (v/v).

Solvant \ Concentration	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	Acide vanillique	Acide cinnamique	Acide férulique
	10 mg/ml	15 mg/ml	10 mg/ml	5 mg/ml
CH ₂ Cl ₂ /EtOH: 100/0 (%)	Insoluble	Insoluble	Soluble	Insoluble
CH ₂ Cl ₂ /EtOH: 95/5 (%)	Insoluble	Insoluble	Soluble	Insoluble
CH ₂ Cl ₂ /EtOH: 92.5/7.5 (%)	Insoluble	Insoluble	Soluble	Soluble
CH ₂ Cl ₂ /EtOH: 90/10 (%)	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble

La Figure III.2 montre des spectres IRTF d'absorbance comparatifs des quatre étalons utilisés à des concentrations équivalentes ($10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) préparés séparément dans le solvant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (90/10) dans le domaine spectral compris entre 4000 et 400 cm^{-1} .

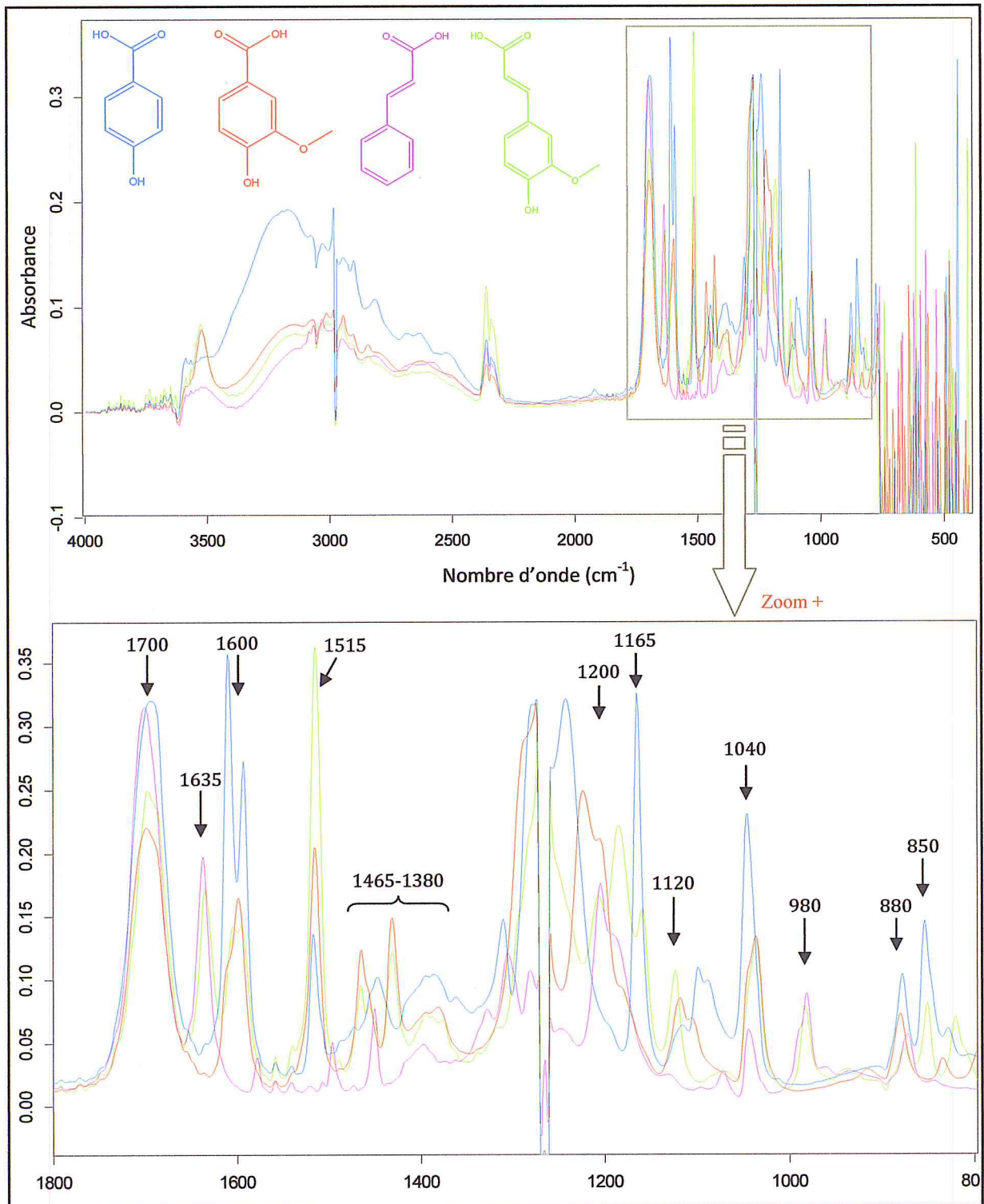


Figure III.2 : Spectres IRTF en phase liquide de l'acide *para*-hydroxybenzoïque (en bleu), l'acide vanillique (en rouge), l'acide *trans*-cinnamique (en rose) et l'acide férulique (en vert).

On constate que le spectre des étalons montre une forte bande à 1700 cm^{-1} qui représente l'élongation du groupement $\text{C}=\text{O}$ des quatre acides phénoliques. Il présente une bande à 1635 cm^{-1} relative à l'élongation du groupement $\text{C}=\text{C}$ d'un alcène caractéristique de l'acide cinnamique et l'acide férulique 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 à la déformation des groupes CH , CH_2 et CH_3 et aux cycles des composés aromatiques.

Les pics intenses à environ $1160 - 1240$ et à 1040 cm^{-1} correspondent à l'élongation de la liaison $\text{C}-\text{O}$ pour les quatre phénols et ensuite à 1120 cm^{-1} nous avons l'élongation de la liaison $\text{C}-\text{O}$ d'un éther spécifique des deux acides vanillique et férulique.

La bande moyenne à 980 cm^{-1} apparaît seulement dans le spectre d'acide cinnamique et d'acide férulique 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 modèle PLS-1 (monovariable) par opposition au modèle PLS-2 (multivariable) 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 échantillons réels après un calibrage préalable avec des solutions étalons.

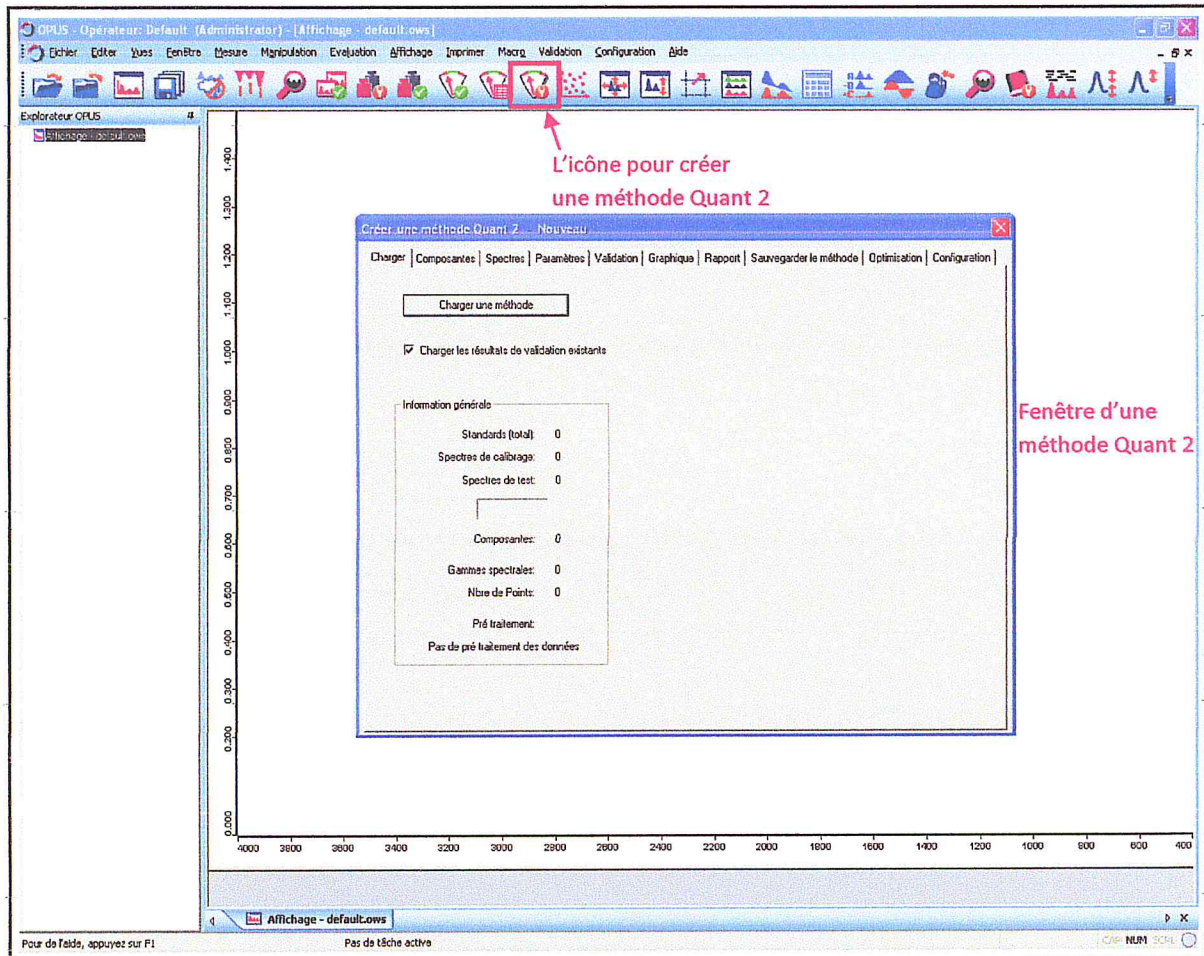


Figure III.3 : Fenêtre du modèle Quant 2 d'OPUS 6.5

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.

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

Pour construire le modèle de calibrage, quatre (4) phénols majoritaires ont été choisis, deux limites inférieures et supérieures des concentrations considérées ont été sélectionnées par rapport à la teneur des acides phénoliques dans la truffe et en respectant la limite de détection infrarouge.

Nous avons considéré le domaine de concentration pour l'acide *p*-hydroxybenzoïque compris entre 0.4 et 4 mg.ml⁻¹, l'acide vanillique entre 0.3 et 3 mg.ml⁻¹, l'acide cinnamique 0.2 - 2 mg.ml⁻¹ et l'acide férulique 0.1 - 1 mg.ml⁻¹.

En parallèle, selon la formule 2ⁿ, 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 à des concentrations suivantes : l'acide *p*-hydroxybenzoïque 10 mg.ml⁻¹, l'acide vanillique 15 mg.ml⁻¹, l'acide cinnamique 10 mg.ml⁻¹ et l'acide férulique 5 mg.ml⁻¹.

Les compositions des seize solutions étalon, en termes de concentrations, sont regroupées dans le tableau III.3.

Tableau III.3 : Composition des solutions étalons (matrice de calibration).

Étalon Solution étalon	Acide <i>p</i> - hydroxybenzoïque		Acide vanillique		Acide cinnamique		Acide férulique	
	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	0.4	0.2	0.3	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
M 02	0.4	0.2	0.3	0.1	0.2	0.1	1	1
M 03	0.4	0.2	0.3	0.1	2	1	0.1	0.1
M 04	0.4	0.2	3	1	0.2	0.1	0.1	0.1
M 05	4	2	0.3	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
M 06	0.4	0.2	0.3	0.1	2	1	1	1
M 07	0.4	0.2	3	1	0.2	0.1	1	1
M 08	0.4	0.2	3	1	2	1	0.1	0.1
M 09	4	2	0.3	0.1	2	1	0.1	0.1
M 10	4	2	0.3	0.1	0.2	0.1	1	1
M 11	4	2	3	1	0.2	0.1	0.1	0.1
M 12	0.4	0.2	3	1	2	1	1	1
M 13	4	2	0.3	0.1	2	1	1	1
M 14	4	2	3	1	0.2	0.1	1	1
M 15	4	2	3	1	2	1	0.1	0.1
M 16	4	2	3	1	2	1	1	1

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.4).

Tableau III.4 : Composition des mélanges synthétiques (matrice de validation).

Étalon Mélange synth.	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque		Acide vanillique		Acide cinnamique		Acide férulique	
	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)
MS 01	1.10	0.55	1.20	0.40	0.50	0.25	0.20	0.20
MS 02	1.60	0.80	1.95	0.65	0.90	0.45	0.30	0.30
MS 03	2.30	1.15	2.70	0.90	1.20	0.60	0.40	0.40
MS 04	2.90	1.45	3.45	1.15	1.40	0.70	0.60	0.60
MS 05	3.60	1.80	4.05	1.35	1.70	0.85	0.70	0.70

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).

La figure III.4 représente les solutions étalons préparées pour l'analyse IRTF.

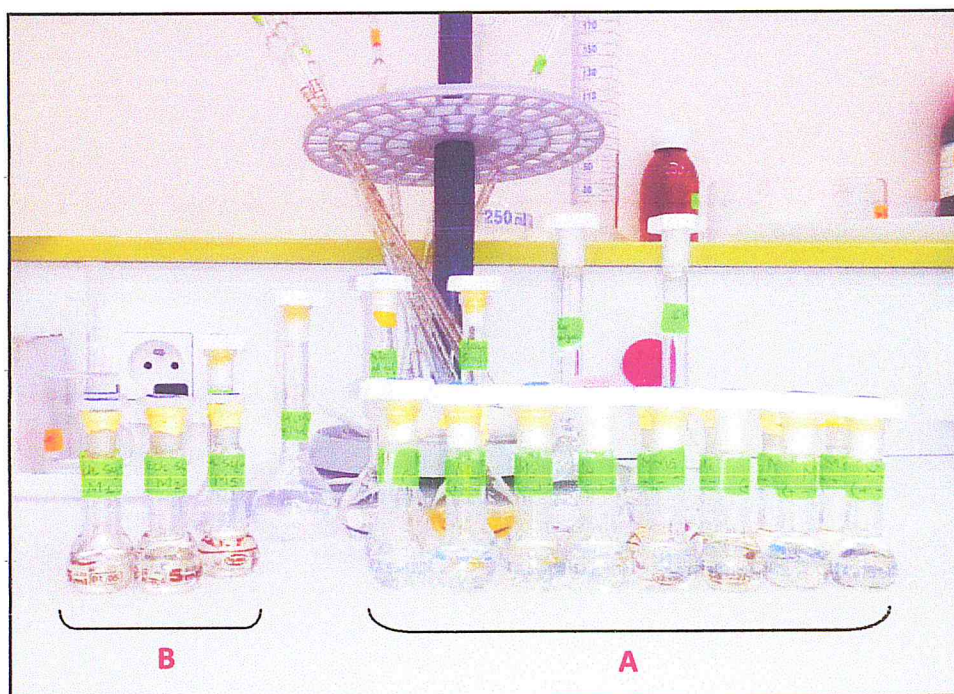


Figure III.4 : Mélanges étalons (A) et mélanges synthétiques (B) préparés.

N.B.

Pour chaque mélange de la matrice de calibration et de validation nous avons réalisé 7 analyses IRTF dépendantes parmi lesquelles seulement 5 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 faciles et 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.5 explique avec numérotation les étapes suivies lors de la configuration.

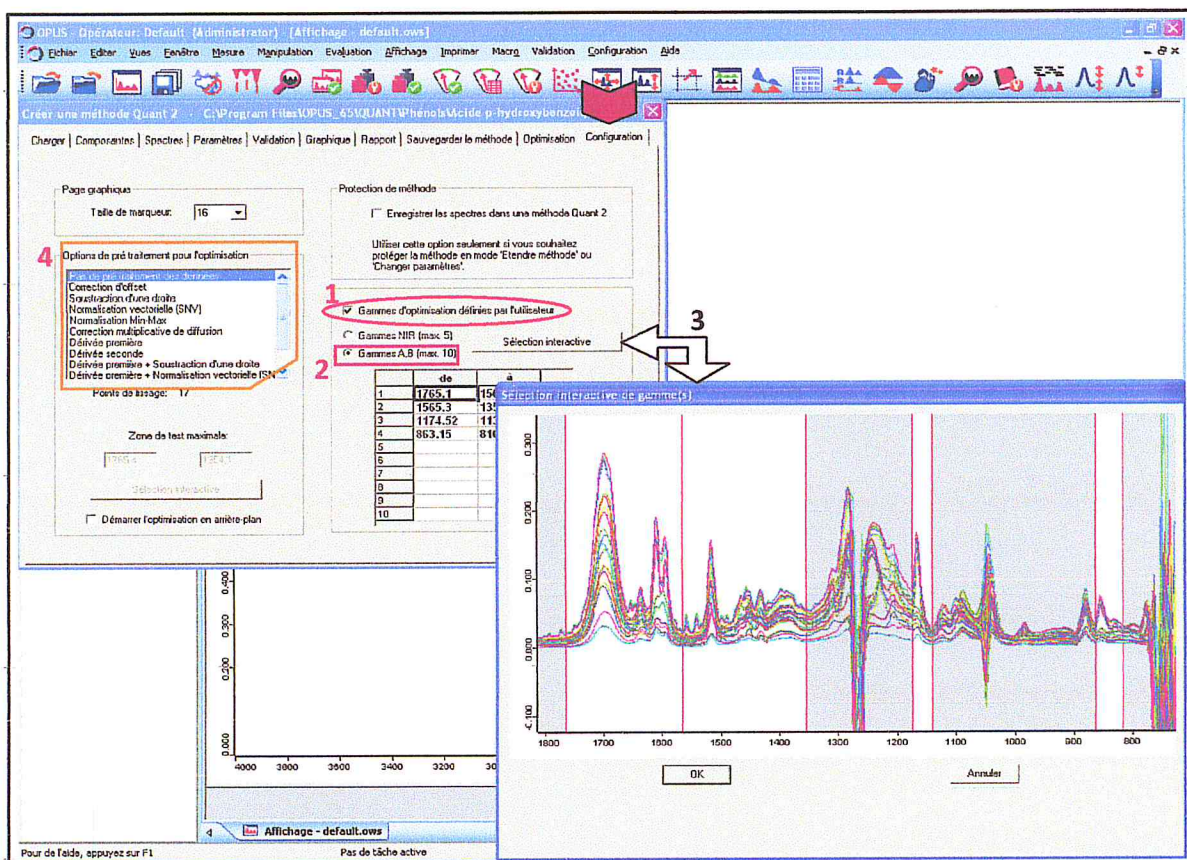


Figure III.5 : Étapes de travail numérotées suivies dans la fenêtre de configuration.

- 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.6).

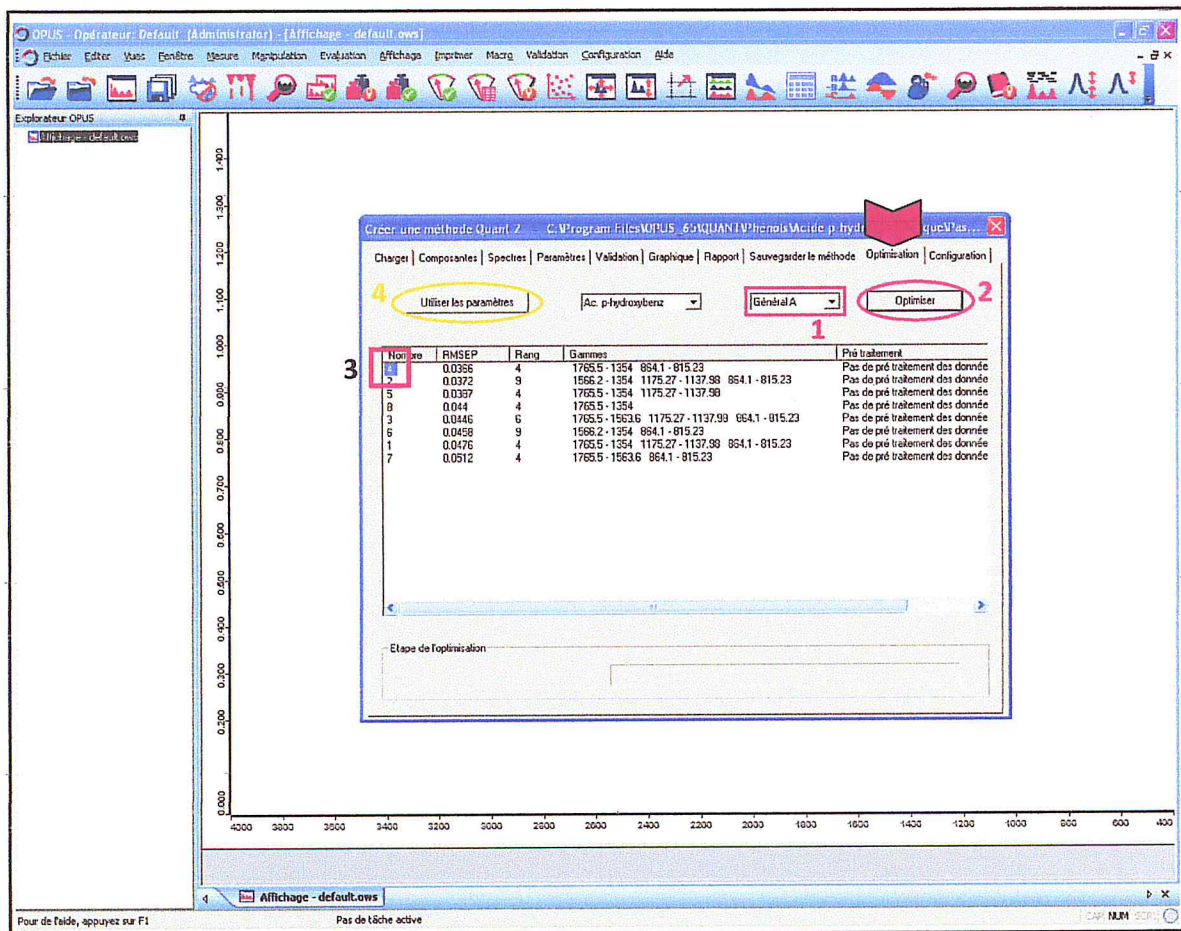


Figure III.6 : Étapes à suivre, avec numérotation, lors de l'optimisation.

- 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.7 montre un exemple de représentations graphiques des paramètres analytiques en considérant le *RMSECV* comme paramètre principal. Les diagrammes (A) illustre l'adaptation aux valeurs paramétrées, c.à.d. la corrélation entre la valeur prédite et 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. Alors que la figure III.8 montre le même exemple de représentations graphiques des paramètres en remplaçant le *RMSECV* par le *RMSEP*.

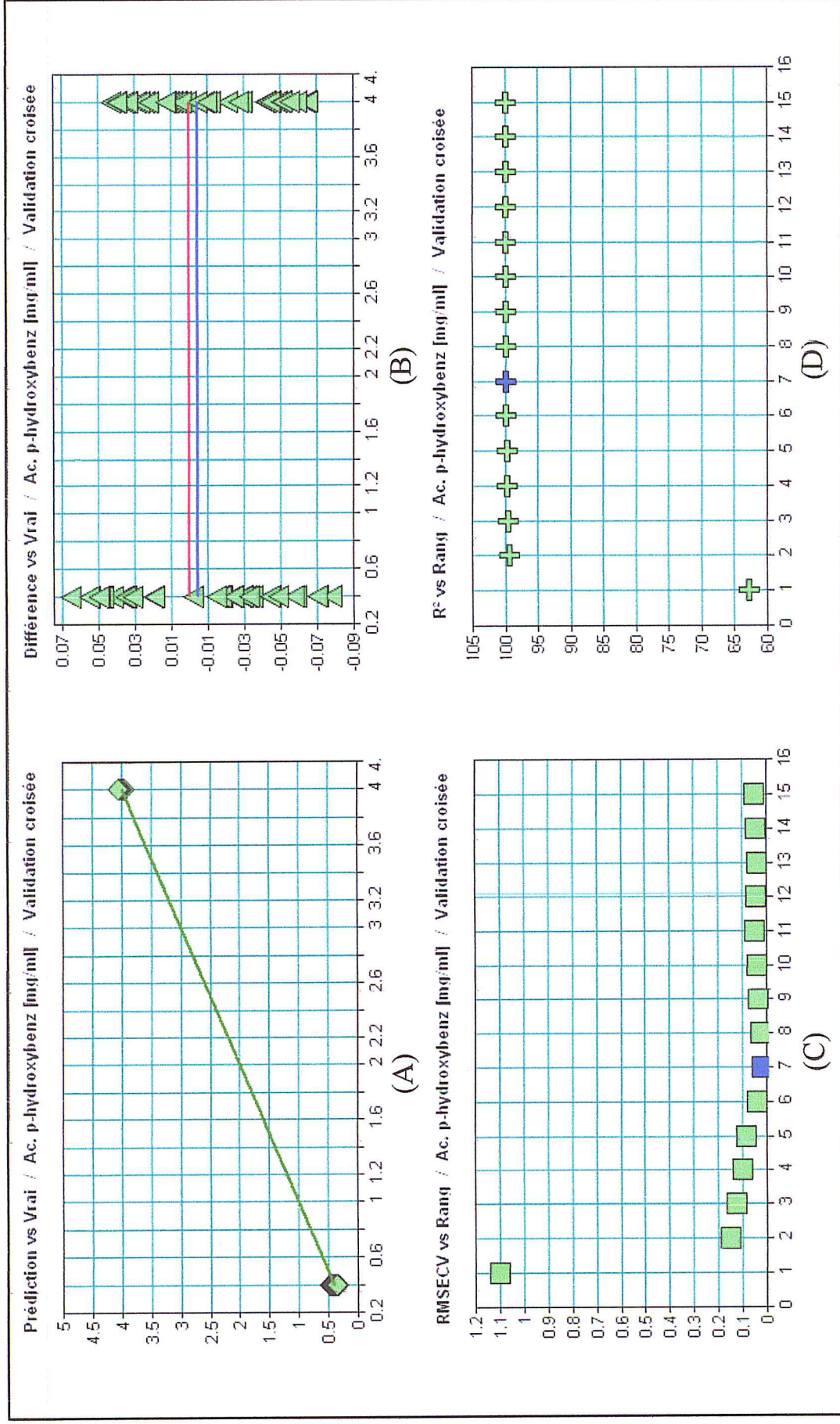


Figure III.7 : Exemple de représentations graphiques des paramètres analytiques d'un composé chimique en fonction de *RMSECV*.

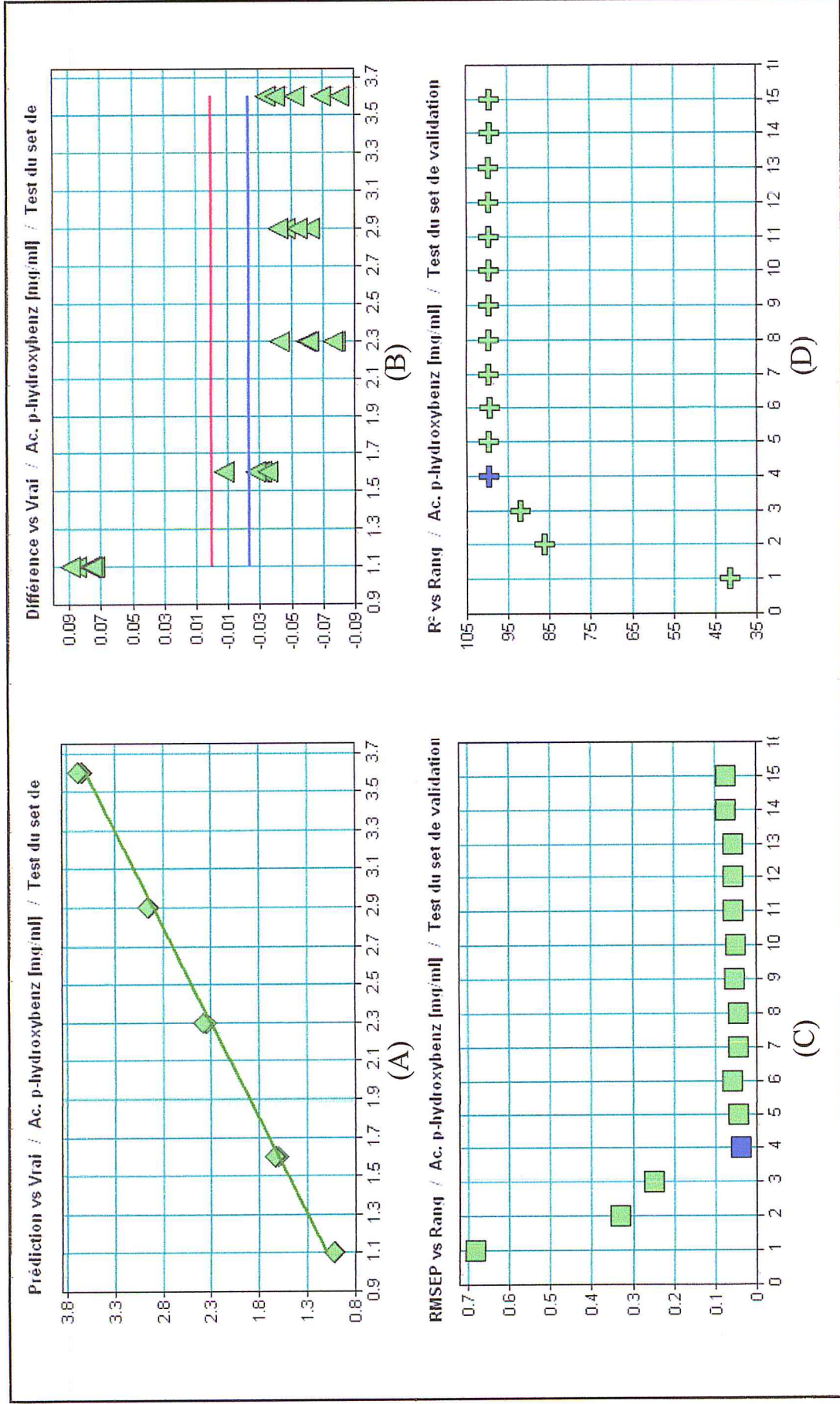


Figure III.8 : Exemple des paramètres analytiques d'une composante en fonction de RMSEP.

Le tableau III.5 fournit par le logiciel, suite à un simple clic, 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.5 : Rapport de validation fourni par le logiciel Quant 2.

Rapport de validation				
Information générale				
Fichier méthode:	Région 4-5-1.q2			
Standards (total):	105			
Spectres de calibrage:	80			
Spectres de test:	25			
Bloc de données:	AB			
Composantes (total):	4			
Gammes spectrales:	2			
Points utilisés:	351			
Centrage moyen:	Oui			
Pré traitement:	Pas de pré traitement des données			
Gammes spectrales:				
de	à			
1765.5	1354			
1175.27	1137.98			
Ac. p-hydroxybenz				
Gamme de concentration:	1.1 - 3.6			
Unités:	mg/ml			
Type de validation:	Test du set de validation			
Erreur de prédiction moyenne				
Rang	R²	RMSEP	Rang recom	
1	41.39	0.683		
2	86.28	0.33		
3	92.14	0.25		
4	99.81	0.0387		+
5	99.76	0.0439		
6	99.55	0.0595		
7	99.76	0.0434		
8	99.75	0.0447		
9	99.67	0.0515		
10	99.67	0.051		
11	99.62	0.0547		
12	99.61	0.0559		
13	99.63	0.0542		
14	99.35	0.0718		
15	99.3	0.0745		
Valeurs de composantes				
Rang utilisé:	6			
Fichier	Vrai	Prédiction	Différence	litrus possibl
msynth1.1	1.1	1.026	0.0739	
msynth1.2	1.1	1.014	0.0856	
msynth1.3	1.1	1.011	0.089	
msynth1.5	1.1	1.023	0.0772	
msynth1.6	1.1	1.024	0.0756	
msynth2.1	1.6	1.607	-0.00747	
msynth2.2	1.6	1.629	-0.0294	
msynth2.3	1.6	1.631	-0.0312	
msynth2.4	1.6	1.627	-0.0274	
msynth2.5	1.6	1.635	-0.0352	
msynth3.1	2.3	2.359	-0.0591	
msynth3.2	2.3	2.361	-0.0612	
msynth3.3	2.3	2.377	-0.0774	
msynth3.4	2.3	2.343	-0.043	
msynth3.6	2.3	2.377	-0.0766	
msynth4.1	2.9	2.947	-0.0467	
msynth4.2	2.9	2.962	-0.0615	
msynth4.3	2.9	2.942	-0.042	
msynth4.4	2.9	2.961	-0.0614	
msynth4.6	2.9	2.954	-0.054	
msynth5.1	3.6	3.634	-0.0344	
msynth5.2	3.6	3.641	-0.0408	
msynth5.3	3.6	3.653	-0.0529	
msynth5.5	3.6	3.669	-0.0691	
msynth5.6	3.6	3.681	-0.0806	

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

Le Quant 2 permet à l'utilisateur 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.
- **Dérivée seconde** : similaire à la première dérivée, mais avec un résultat plus précis.

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 para-hydroxybenzoïque*

Tableau III.6 : Résultats d'optimisation, de calibrage et de validation de l'acide *para*-hydroxybenzoïque.

Traitement spectral	Région spectrale	Rang	<i>RMSEP</i>	R^2	<i>RMSEE</i>	R^2	<i>RMSE-CV</i>	R^2
Pas de prétraitement	1765.5-1354 1175.27-1137.98 864.1-815	4	0.0476	99.72	0.0422	99.95	0.1040	99.67
		5	0.0423	99.78	0.0309	99.97	0.0792	99.81
		6	0.0580	99.58	0.0285	99.98	0.0421	99.95
	1765.5-1354 864.1-815	4	0.0366	99.83	0.0542	99.91	0.1100	99.63
		5	0.0578	99.58	0.0429	99.95	0.1050	99.66
		6	0.0570	99.59	0.0151	99.99	0.0680	99.86
	1765.5-1354 1175.27-1137.98	4	0.0387	99.81	0.0392	99.96	0.0996	99.69
		5	0.0439	99.79	0.0291	99.98	0.0835	99.78
		6	0.0595	99.55	0.0252	99.98	0.0395	99.95
Correction d'offset	1765.5-1354 1175.27-1137.98 864.1-815	4	0.0576	99.58	0.0419	99.97	0.1050	99.66
		5	0.0411	99.79	0.0238	99.98	0.0523	99.92
		6	0.0343	99.85	0.0217	99.99	0.0320	99.97
	1765.5-1354 864.1-815	4	0.0480	99.71	0.0483	99.93	0.1070	99.65
		5	0.0322	99.87	0.0309	99.97	0.0939	99.73
		6	0.0501	99.68	0.0275	99.98	0.0436	99.94
	1765.5-1354 1175.27-1137.98	4	0.0431	99.77	0.0360	99.96	0.0984	99.70
		5	0.0320	99.87	0.0221	99.99	0.0794	99.81
		6	0.0367	99.83	0.0216	99.99	0.0331	99.97
Soustraction d'une droite	1765.5-1354 1175.27-1137.98 864.1-815	4	0.0942	98.88	0.0328	99.97	0.0663	99.86
		5	0.0796	99.20	0.0232	99.98	0.0539	99.91
		6	0.0365	99.83	0.0181	99.99	0.0285	99.97
	1765.5-1354 864.1-815	4	0.1260	97.99	0.0459	99.94	0.0849	99.78
		5	0.1040	98.64	0.0316	99.97	0.0714	99.84
		6	0.0396	99.80	0.0247	99.98	0.0396	99.95
	1765.5-1354 1175.27-1137.98	4	0.0959	98.84	0.0351	99.96	0.0668	99.86
		5	0.0806	99.18	0.0245	99.98	0.0550	99.91
		6	0.0364	99.83	0.0194	99.99	0.0306	99.97

Suite

Dérivée première	1765.5-1354	4	0.0418	98.78	0.0214	99.99	0.0319	99.97
	1175.27-1137.98	5	0.0439	99.76	0.0112	100	0.0228	99.98
	864.1-815	6	0.0430	99.77	0.0110	100	0.0253	99.98
	1765.5-1354	4	0.0511	99.67	0.0369	99.96	0.0543	99.91
	864.1-815	5	0.0433	99.76	0.0139	99.99	0.0356	99.96
		6	0.0397	99.80	0.0130	100	0.0278	99.98
	1765.5-1354	4	0.0427	99.77	0.0236	99.98	0.0347	99.96
	1175.27-1137.98	5	0.0441	99.76	0.0114	100	0.0220	99.99
		6	0.0435	99.76	0.0108	100	0.0266	99.98
Dérivée seconde	1765.5-1354	4	0.0535	99.64	0.0141	99.99	0.0180	99.99
	1175.27-1137.98	5	0.0491	99.70	0.0120	100	0.0244	99.98
	864.1-815	6	0.0470	99.72	0.0112	100	0.0297	99.97
	1765.5-1354	4	0.0581	99.58	0.0184	99.99	0.0227	99.98
	864.1-815	5	0.0495	99.69	0.0131	100	0.0281	99.98
		6	0.0468	99.73	0.0114	100	0.0316	99.97
	1765.5-1354	4	0.0512	99.67	0.0130	100	0.0172	99.99
	1175.27-1137.98	5	0.0485	99.70	0.0118	100	0.0237	99.98
		6	0.0469	99.72	0.0113	100	0.0298	99.97
Dérivée première + Soustraction d'une droite	1765.5-1354	4	0.0403	99.80	0.0269	99.98	0.0396	99.95
	1175.27-1137.98	5	0.0426	99.77	0.0122	100	0.0259	99.98
	864.1-815	6	0.0430	99.77	0.0119	100	0.0283	99.98
	1765.5-1354	4	0.0442	99.75	0.0388	99.96	0.0572	99.90
	864.1-815	5	0.0411	99.79	0.0138	99.99	0.0347	99.96
		6	0.0416	99.78	0.0132	100	0.0287	99.97
	1765.5-1354	4	0.0456	99.74	0.0292	99.98	0.0427	99.94
	1175.27-1137.98	5	0.0444	99.75	0.0131	100	0.0261	99.98
		6	0.0420	99.78	0.0115	100	0.0285	99.97

B) Acide vanillique

Tableau III.7 : Résultats d'optimisation, de calibrage et de validation pour l'acide vanillique.

Traitement spectral	Région spectrale	Rang	<i>RMSEP</i>	R^2	<i>RMSEE</i>	R^2	<i>RMSE-CV</i>	R^2	
Pas de prétraitement	1765.5-1354 1175.27-1137.98 864.1-815	4	0.1380	98.16	0.0978	99.51	0.1580	98.64	
		5	0.0915	99.19	0.0589	99.82	0.1460	98.83	
		6	0.0641	99.60	0.0541	99.85	0.1520	98.73	
	1765.5-1354 864.1-815	4	0.1210	98.60	0.1020	99.47	0.1590	98.61	
		5	0.1260	98.46	0.0812	99.67	0.1480	98.80	
		6	0.0909	99.20	0.0739	99.73	0.2030	97.73	
	1765.5-1354 1175.27-1137.98	4	0.1490	97.86	0.0917	99.57	0.1500	98.77	
		5	0.0912	99.20	0.0579	99.83	0.1390	98.95	
		6	0.0738	99.48	0.0539	99.85	0.1560	98.67	
	Correction d'offset	1765.5-1354 1175.27-1137.98 864.1-815	4	0.1400	98.11	0.0981	99.51	0.1490	98.78
			5	0.1090	98.85	0.0461	99.89	0.1270	99.12
			6	0.0753	99.45	0.0441	99.90	0.0962	99.49
1765.5-1354 864.1-815		4	0.1370	98.19	0.0981	99.51	0.1490	98.78	
		5	0.1120	98.79	0.0711	99.74	0.1260	99.12	
		6	0.1070	98.90	0.0662	99.78	0.1600	98.59	
1765.5-1354 1175.27-1137.98		4	0.1460	97.95	0.0912	99.57	0.1410	98.91	
		5	0.1070	98.90	0.0489	99.88	0.1190	99.22	
		6	0.0784	99.41	0.0468	99.89	0.1200	99.21	
Soustraction d'une droite	1765.5-1354 1175.27-1137.98 864.1-815	4	0.1350	98.23	0.0701	99.75	0.0941	99.51	
		5	0.0910	99.20	0.0600	99.82	0.0968	99.49	
		6	0.1280	98.42	0.0518	99.87	0.1170	99.25	
	1765.5-1354 864.1-815	4	0.1730	97.12	0.0855	99.62	0.1120	99.32	
		5	0.1220	98.56	0.0723	99.73	0.1160	99.26	
		6	0.1340	98.27	0.0628	99.80	0.1420	99.89	
	1765.5-1354 1175.27-1137.98	4	0.1460	97.95	0.0749	99.71	0.1010	99.44	
		5	0.0968	99.10	0.0643	99.79	0.1030	99.41	
		6	0.1330	98.29	0.0558	99.84	0.1270	99.12	

Suite

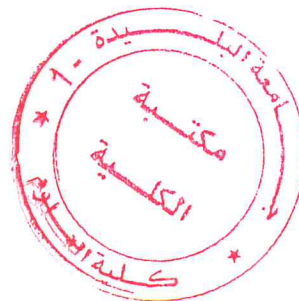
Dérivée première	1765.5-1354	4	0.0828	99.34	0.0387	99.92	0.0478	99.87
	1175.27-1137.98	5	0.0866	99.28	0.0279	99.96	0.0481	99.87
	864.1-815	6	0.1130	98.77	0.0253	99.97	0.0648	99.77
	1765.5-1354	4	0.1020	99.00	0.0543	99.85	0.0669	99.75
	864.1-815	5	0.0954	99.12	0.0341	99.94	0.0757	99.69
		6	0.1300	98.37	0.0302	99.95	0.0754	99.69
	1765.5-1354	4	0.1130	98.78	0.0424	99.91	0.0539	99.84
	1175.27-1137.98	5	0.1070	98.89	0.0308	99.95	0.0598	99.80
		6	0.1270	98.44	0.0250	99.97	0.0696	99.73
Dérivée seconde	1765.5-1354	4	0.1600	99.52	0.1150	99.32	0.1450	98.85
	1175.27-1137.98	5	0.0980	99.08	0.0277	99.96	0.0585	99.81
	864.1-815	6	0.1050	98.94	0.0233	99.97	0.0552	99.83
	1765.5-1354	4	0.1690	97.25	0.1210	99.25	0.1520	98.73
	864.1-815	5	0.1050	98.94	0.0299	99.95	0.0512	99.86
		6	0.1220	98.57	0.0262	99.97	0.0577	99.82
	1765.5-1354	4	0.1710	97.18	0.1310	99.12	0.1660	98.49
	1175.27-1137.98	5	0.1090	98.85	0.0307	99.95	0.0551	99.83
		6	0.1100	98.83	0.0248	99.97	0.0667	99.76
Dérivée première + Soustraction d'une droite	1765.5-1354	4	0.0975	99.08	0.0433	99.90	0.0539	99.84
	1175.27-1137.98	5	0.0949	99.13	0.0303	99.95	0.0675	99.75
	864.1-815	6	0.1240	98.52	0.0261	99.97	0.0583	99.81
	1765.5-1354	4	0.1110	98.81	0.0546	99.85	0.0677	99.75
	864.1-815	5	0.1030	98.97	0.0342	99.94	0.0604	99.80
		6	0.1360	98.21	0.0294	99.96	0.0752	99.69
	1765.5-1354	4	0.1330	98.29	0.0499	99.87	0.0639	99.78
	1175.27-1137.98	5	0.1200	98.62	0.0344	99.94	0.0546	99.84
		6	0.1200	98.61	0.0238	99.97	0.0756	99.69

C) Acide *trans*-cinnamique**Tableau III.8** : Résultats d'optimisation, de calibrage et de validation de l'acide cinnamique.

Traitement spectral	Région spectrale	Rang	<i>RMSEP</i>	R^2	<i>RMSEE</i>	R^2	<i>RMSE-CV</i>	R^2
Pas de prétraitement	1765.5-1354 1175.27-1137.98 864.1-815	4	0.0370	99.19	0.0245	99.93	0.0474	99.72
		5	0.0297	99.48	0.0141	99.98	0.0380	99.82
		6	0.0359	99.24	0.0127	99.98	0.0284	99.90
	1765.5-1354 864.1-815	4	0.0471	98.70	0.0249	99.93	0.0450	99.75
		5	0.0338	99.33	0.015	99.97	0.0400	99.80
		6	0.0337	99.33	0.0146	99.98	0.0376	99.83
	1765.5-1354 1175.27-1137.98	4	0.0418	98.98	0.0228	99.94	0.0430	99.77
		5	0.0341	99.32	0.0131	99.98	0.0361	99.84
		6	0.0357	99.25	0.0128	99.98	0.0376	99.89
Correction d'offset	1765.5-1354 1175.27-1137.98 864.1-815	4	0.0327	99.37	0.0257	99.92	0.0484	99.71
		5	0.0290	99.51	0.0152	99.97	0.0355	99.84
		6	0.0386	99.13	0.0123	99.98	0.0224	99.94
	1765.5-1354 864.1-815	4	0.0439	98.87	0.0245	99.93	0.0435	99.77
		5	0.0364	99.22	0.0145	99.98	0.0367	99.83
		6	0.0386	99.13	0.0136	99.98	0.0286	99.90
	1765.5-1354 1175.27-1137.98	4	0.0369	99.20	0.0230	99.94	0.0424	99.78
		5	0.0317	99.41	0.0143	99.98	0.0342	99.86
		6	0.0376	99.17	0.0125	99.98	0.0218	99.94
Soustraction d'une droite	1765.5-1354 1175.27-1137.98 864.1-815	4	0.1220	91.21	0.0349	99.86	0.0611	99.54
		5	0.0374	99.18	0.0148	99.98	0.0561	99.61
		6	0.0380	99.15	0.0144	99.98	0.0329	99.87
	1765.5-1354 864.1-815	4	0.1330	89.69	0.0371	99.84	0.0637	99.50
		5	0.0393	99.10	0.0162	99.97	0.0601	99.55
		6	0.0409	99.02	0.0157	99.97	0.0369	99.83
	1765.5-1354 1175.27-1137.98	4	0.1200	91.54	0.0344	99.86	0.0611	99.54
		5	0.0377	99.17	0.0150	99.97	0.0563	99.61
		6	0.0386	99.18	0.0146	99.98	0.0338	99.86

Suite

Dérivée première	1765.5-1354	4	0.0799	96.26	0.0314	99.89	0.0433	99.77
	1175.27-1137.98	5	0.0519	98.42	0.0164	99.97	0.0376	99.83
	864.1-815	6	0.0470	98.70	0.0147	99.98	0.0406	99.80
	1765.5-1354	4	0.0896	95.29	0.0349	99.86	0.0479	99.72
	864.1-815	5	0.0515	98.45	0.0180	99.96	0.0434	99.77
		6	0.0566	98.12	0.0168	99.97	0.0449	99.75
	1765.5-1354	4	0.0684	97.26	0.0296	99.90	0.0403	99.80
	1175.27-1137.98	5	0.0511	98.47	0.0171	99.97	0.0380	99.82
		6	0.0558	98.17	0.0160	99.97	0.0426	99.78
Dérivée seconde	1765.5-1354	4	0.0116	92.07	0.0405	99.81	0.0729	99.34
	1175.27-1137.98	5	0.0908	95.17	0.0351	99.86	0.0890	99.02
	864.1-815	6	0.0381	99.15	0.0132	99.98	0.0356	99.84
	1765.5-1354	4	0.1020	93.83	0.0369	99.84	0.0756	99.29
	864.1-815	5	0.0737	96.81	0.0338	99.87	0.0899	99
		6	0.0420	98.97	0.0133	99.98	0.0357	99.84
	1765.5-1354	4	0.0995	94.19	0.0362	99.85	0.0726	99.35
	1175.27-1137.98	5	0.0808	96.17	0.0335	99.87	0.0868	99.07
		6	0.0377	99.17	0.0129	99.98	0.0358	99.84
Dérivée première + Soustraction d'une droite	1765.5-1354	4	0.0793	96.31	0.0321	99.88	0.0438	99.76
	1175.27-1137.98	5	0.0499	98.54	0.0174	99.97	0.0405	99.80
	864.1-815	6	0.0541	98.28	0.0163	99.97	0.0430	99.77
	1765.5-1354	4	0.0807	96.18	0.0333	99.87	0.0454	99.75
	864.1-815	5	0.0496	98.55	0.0183	99.96	0.0429	99.77
		6	0.0578	98.04	0.0169	99.97	0.0445	99.76
	1765.5-1354	4	0.0718	96.98	0.0313	99.89	0.0423	99.78
	1175.27-1137.98	5	0.0506	98.49	0.0182	99.96	0.0409	99.79
		6	0.0582	98.01	0.0169	99.97	0.0444	99.76



D) Acide férulique

Tableau III.9 : Résultats d'optimisation, de calibrage et de validation pour l'acide férulique.

Traitement spectral	Région spectrale	Rang	<i>RMSEP</i>	R^2	<i>RMSEE</i>	R^2	<i>RMSE-CV</i>	R^2
Pas de prétraitement	1765.5-1354 1175.27-1137.98 864.1-815	4	0.1210	57.28	0.0432	99.13	0.1240	92.38
		5	0.0212	98.69	0.0311	99.56	0.0845	96.48
		6	0.0249	98.20	0.0163	99.88	0.0441	99.04
	1765.5-1354 864.1-815	4	0.0504	92.60	0.0444	99.09	0.1490	89.02
		5	0.0542	91.46	0.0398	99.28	0.1090	94.13
		6	0.0536	91.65	0.0325	99.52	0.0629	98.05
	1765.5-1354 1175.27-1137.98	4	0.0788	81.93	0.0361	99.40	0.1220	92.65
		5	0.0242	98.30	0.0295	99.60	0.0850	96.43
		6	0.0285	97.64	0.0127	99.93	0.0435	99.07
Correction d'offset	1765.5-1354 1175.27-1137.98 864.1-815	4	0.1970	-12.65	0.0466	99	0.1240	92.38
		5	0.0281	97.71	0.0212	99.80	0.0789	96.93
		6	0.0418	94.91	0.0141	99.91	0.0319	99.50
	1765.5-1354 864.1-815	4	0.1440	40.03	0.0452	99.06	0.1470	89.33
		5	0.0306	97.28	0.0332	99.50	0.1140	93.53
		6	0.0382	95.76	0.0307	99.58	0.0566	98.42
	1765.5-1354 1175.27-1137.98	4	0.1560	29.34	0.0387	99.31	0.1220	92.69
		5	0.0277	97.78	0.0214	99.79	0.0840	96.51
		6	0.0323	96.97	0.0166	99.88	0.0322	99.49
Soustraction d'une droite	1765.5-1354 1175.27-1137.98 864.1-815	4	0.0795	81.62	0.0343	99.46	0.0806	96.80
		5	0.0579	90.24	0.0304	99.58	0.0596	98.24
		6	0.0498	92.79	0.0230	99.76	0.0514	98.70
	1765.5-1354 864.1-815	4	0.0882	77.36	0.0368	99.37	0.0807	96.78
		5	0.0613	89.07	0.0333	99.49	0.0608	98.18
		6	0.0535	91.68	0.0272	99.67	0.0615	98.13
	1765.5-1354 1175.27-1137.98	4	0.0875	77.73	0.0366	99.38	0.0835	96.56
		5	0.062	88.81	0.0329	99.51	0.0621	98.09
		6	0.0525	91.97	0.0261	99.69	0.0584	98.31

Suite

Dérivée première	1765.5-1354	4	0.0362	96.19	0.0126	99.93	0.0363	99.35
	1175.27-1137.98	5	0.0373	95.95	0.0106	99.95	0.0277	99.62
	864.1-815	6	0.0205	98.78	0.0079	99.97	0.0193	99.82
	1765.5-1354 864.1-815	4	0.0481	93.27	0.0158	99.88	0.0385	99.27
		5	0.0413	95.04	0.0146	99.90	0.0291	99.58
		6	0.0227	98.50	0.0087	99.97	0.0234	99.73
	1765.5-1354 1175.27-1137.98	4	0.0588	89.94	0.0154	99.89	0.0405	99.19
		5	0.0428	94.67	0.0140	99.91	0.0260	99.67
		6	0.0273	97.83	0.0112	99.94	0.0234	99.73
Dérivée seconde	1765.5-1354	4	0.0662	87.25	0.0788	97.13	0.0962	95.43
	1175.27-1137.98	5	0.0405	95.23	0.0133	99.92	0.0266	99.65
	864.1-815	6	0.0215	98.66	0.0109	99.95	0.0179	99.84
	1765.5-1354 864.1-815	4	0.0737	84.22	0.0837	96.76	0.1030	94.80
		5	0.0454	94	0.0130	99.92	0.0198	99.81
		6	0.0259	98.05	0.0113	99.94	0.0207	99.79
	1765.5-1354 1175.27-1137.98	4	0.0736	84.25	0.0893	96.31	0.1090	94.14
		5	0.0496	92.84	0.0151	99.90	0.0292	99.58
		6	0.0246	98.24	0.0120	99.94	0.0209	99.79
Dérivée première + Soustraction d'une droite	1765.5-1354	4	0.0487	93.10	0.0139	99.91	0.0372	99.32
	1175.27-1137.98	5	0.0333	96.78	0.0126	99.93	0.0261	99.66
	864.1-815	6	0.0236	98.38	0.0099	99.96	0.0212	99.78
	1765.5-1354 864.1-815	4	0.0526	91.95	0.0161	99.88	0.0381	99.28
		5	0.0436	94.48	0.0147	99.90	0.0269	99.64
		6	0.0226	98.52	0.0092	99.96	0.0244	99.71
	1765.5-1354 1175.27-1137.98	4	0.0748	83.74	0.0186	99.84	0.0432	99.08
		5	0.0522	92.09	0.0157	99.89	0.0258	99.67
		6	0.0328	96.88	0.0135	99.92	0.0280	99.61

N.B.

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 du modèle PLS développé était la détermination simultanée par la méthode de calibration interne de l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide cinnamique et l'acide férulique dans les mélanges synthétiques préparés auparavant (Tableau III.4). Les résultats sont représentés dans les tableaux de III.10 à III.13 et les figures de III.9 à III.12.

Tableau III.10 : Résultats de calibrage pour l'acide *para*-hydroxybenzoïque.

Informations générales			
Standards (total) :	105	Gammes spectrales (cm ⁻¹) :	
Spectres de calibrage :	80	de	à
Spectres de test :	25	1765.5	1354
Composantes (total) :	4	1175.27	1137.98
Points utilisés :	390	864.1	815.23
Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque			
Gamme de concentration :	1.1 - 3.6		
Unités :	mg/ml		
Type de validation :	Test du set de validation		
Erreur de prédiction moyenne			
Rang de méthode	R ²	RMSEP	
6	99.85	0.0343	
Valeurs de concentration des composantes			
Solution étalon	Vrai	Prédiction ($x \pm \delta$)	Différence* ($x \pm \delta$)
Mélange synthétique 1	1.1	1.0964 ± 0.0029	0.00 ± 0.84
Mélange synthétique 2	1.6	1.6048 ± 0.0041	0.0 ± 1.3
Mélange synthétique 3	2.3	2.3354 ± 0.0043	-0.04 ± 0.28
Mélange synthétique 4	2.9	2.9472 ± 0.0021	-0.05 ± 0.13
Mélange synthétique 5	3.6	3.6458 ± 0.0037	-0.05 ± 0.30
$(x \pm \delta)$: Valeur moyenne ± Déviation standard pour (n=5), cinq valeurs dépendantes.			
*Différence = Valeur réelle – Valeur de prédiction.			

Tableau III.11 : Résultats de calibrage pour l'acide vanillique.

Informations générales			
Standards (total) :	105	Gammes spectrales (cm ⁻¹) :	
Spectres de calibrage :	80	de	à
Spectres de test :	25	1765.5	1354
Composantes (total) :	4	1175.27	1137.98
Points utilisés :	390	864.1	815.23
Acide vanillique			
Gamme de concentration :	1.20 - 4.05		
Unités :	mg/ml		
Type de validation :	Test du set de validation		
Erreur de prédiction moyenne			
Rang de méthode	R ²	RMSEP	
5	99.08	0.0980	
Valeurs de concentration des composantes			
Solution étalon	Vrai	Prédiction ($x \pm \delta$)	Différence* ($x \pm \delta$)
Mélange synthétique 1	1.20	1.1260 ± 0.0086	0.07 ± 0.13
Mélange synthétique 2	1.95	2.0780 ± 0.0085	-0.13 ± 0.14
Mélange synthétique 3	2.70	2.838 ± 0.020	-0.14 ± 0.22
Mélange synthétique 4	3.45	3.5238 ± 0.0049	-0.07 ± 0.24
Mélange synthétique 5	4.05	4.0442 ± 0.0042	0.0 ± 2.8
$(x \pm \delta)$: Valeur moyenne ± Déviation standard pour (n=5), cinq valeurs dépendantes.			
*Différence = Valeur réelle – Valeur de prédiction.			

Tableau III.12 : Résultats de calibrage pour l'acide *trans*-cinnamique.

Informations générales			
Standards (total) :	105	Gammes spectrales (cm ⁻¹) :	
Spectres de calibrage :	80	de	à
Spectres de test :	25	1765.5	1354
Composantes (total) :	4	1175.27	1137.98
Points utilisés :	390	864.1	815.23
Acide cinnamique			
Gamme de concentration :	0.5 – 1.7		
Unités :	mg/ml		
Type de validation :	Test du set de validation		
Erreur de prédiction moyenne			
Rang de méthode	R ²	RMSEP	
5	99.51	0.0290	
Valeurs de concentration des composantes			
Solution étalon	Vrai	Prédiction ($x \pm \delta$)	Différence* ($x \pm \delta$)
Mélange synthétique 1	0.5	0.4898 ± 0.0015	0.010 ± 0.070
Mélange synthétique 2	0.9	0.9319 ± 0.0019	-0.032 ± 0.055
Mélange synthétique 3	1.2	1.2204 ± 0.0026	-0.02 ± 0.16
Mélange synthétique 4	1.4	1.4146 ± 0.0013	-0.01 ± 0.13
Mélange synthétique 5	1.7	1.651 ± 0.028	0.049 ± 0.094
$(x \pm \delta)$: Valeur moyenne ± Déviation standard pour (n=5), cinq valeurs dépendantes.			
*Différence = Valeur réelle – Valeur de prédiction.			

Tableau III.13 : Résultats de calibrage pour l'acide férulique.

Informations générales			
Standards (total) :	105	Gammes spectrales (cm ⁻¹) :	
Spectres de calibrage :	80	de	à
Spectres de test :	25	1765.5	1354
Composantes (total) :	4	1175.27	1137.98
Points utilisés :	390	864.1	815.23
Acide férulique			
Gamme de concentration :	0.2 - 0.7		
Unités :	mg/ml		
Type de validation :	Test du set de validation		
Erreur de prédiction moyenne			
Rang de méthode	R ²	RMSEP	
6	98.78	0.0205	
Valeurs de concentration des composantes			
Solution étalon	Vrai	Prédiction ($x \pm \delta$)	Différence* ($x \pm \delta$)
Mélange synthétique 1	0.2	0.2216 ± 0.0074	-0.022 ± 0.076
Mélange synthétique 2	0.3	0.271 ± 0.014	0.03 ± 0.13
Mélange synthétique 3	0.4	0.376 ± 0.019	0.02 ± 0.29
Mélange synthétique 4	0.6	0.6042 ± 0.0076	0.0 ± 1.1
Mélange synthétique 5	0.7	0.7102 ± 0.0044	-0.01 ± 0.31
$(x \pm \delta)$: Valeur moyenne ± Déviation standard pour (n=5), cinq valeurs dépendantes.			
*Différence = Valeur réelle – Valeur de prédiction.			

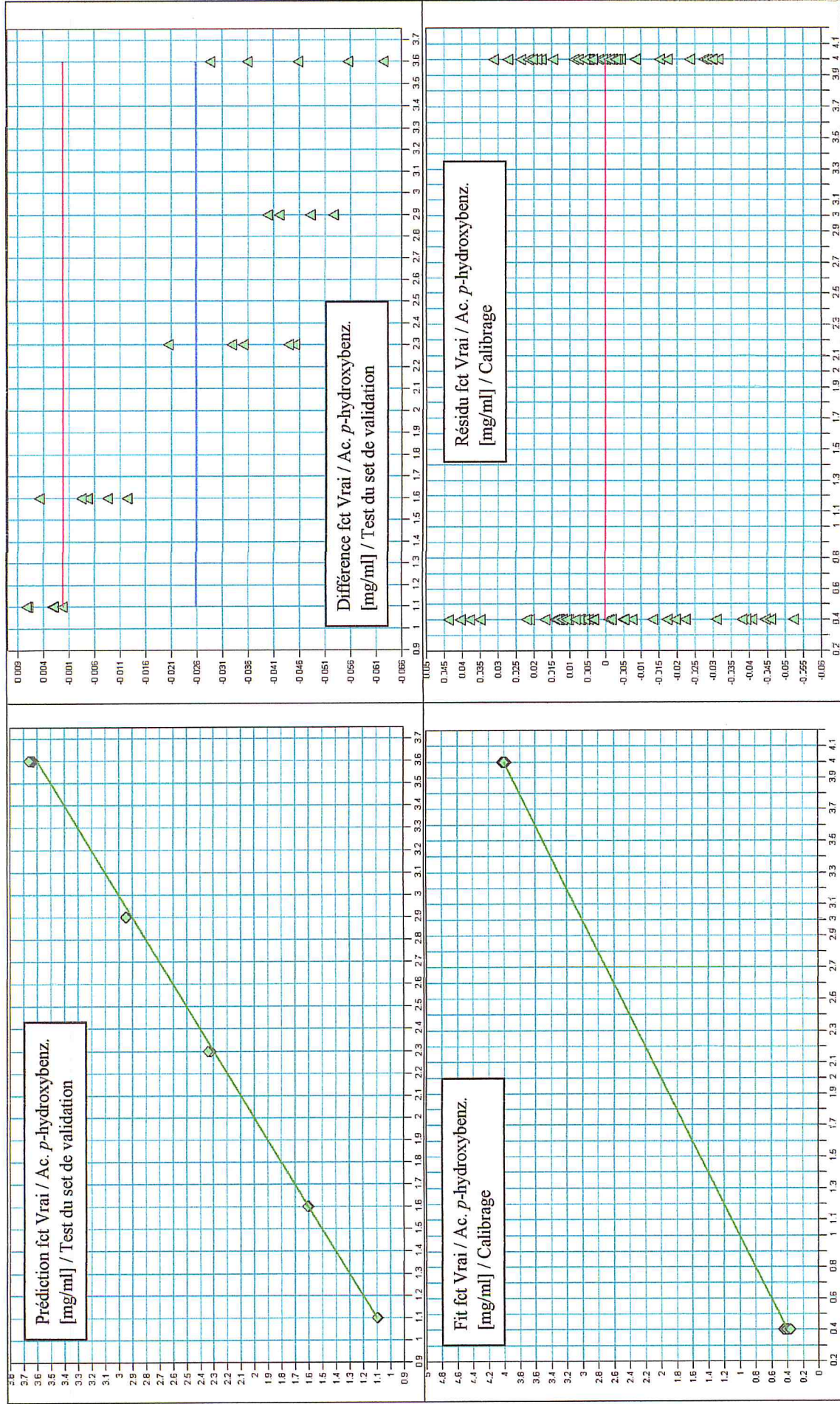


Figure III.9 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'acide *para*-hydroxybenzoïque.

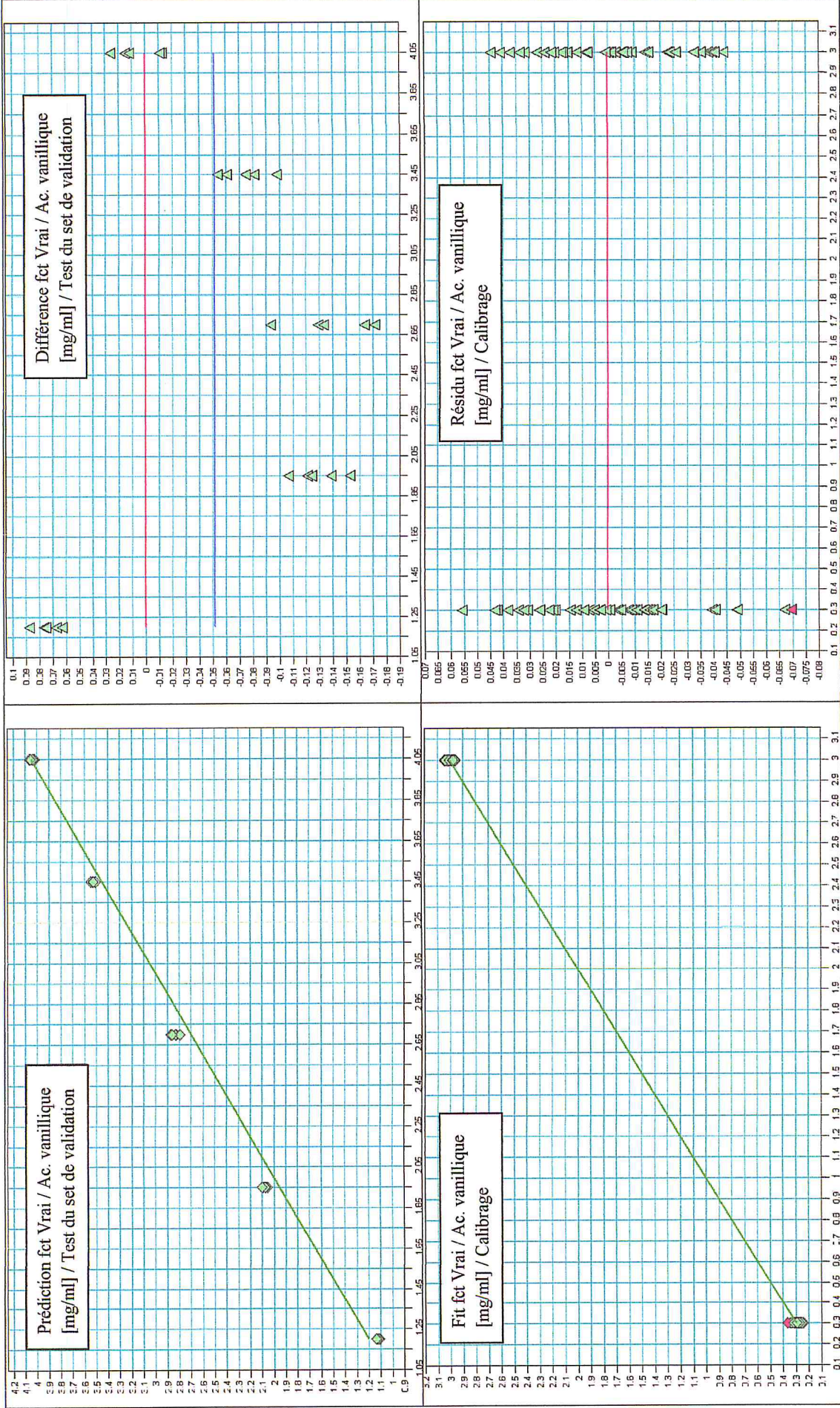


Figure III.10 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'acide vanillique.

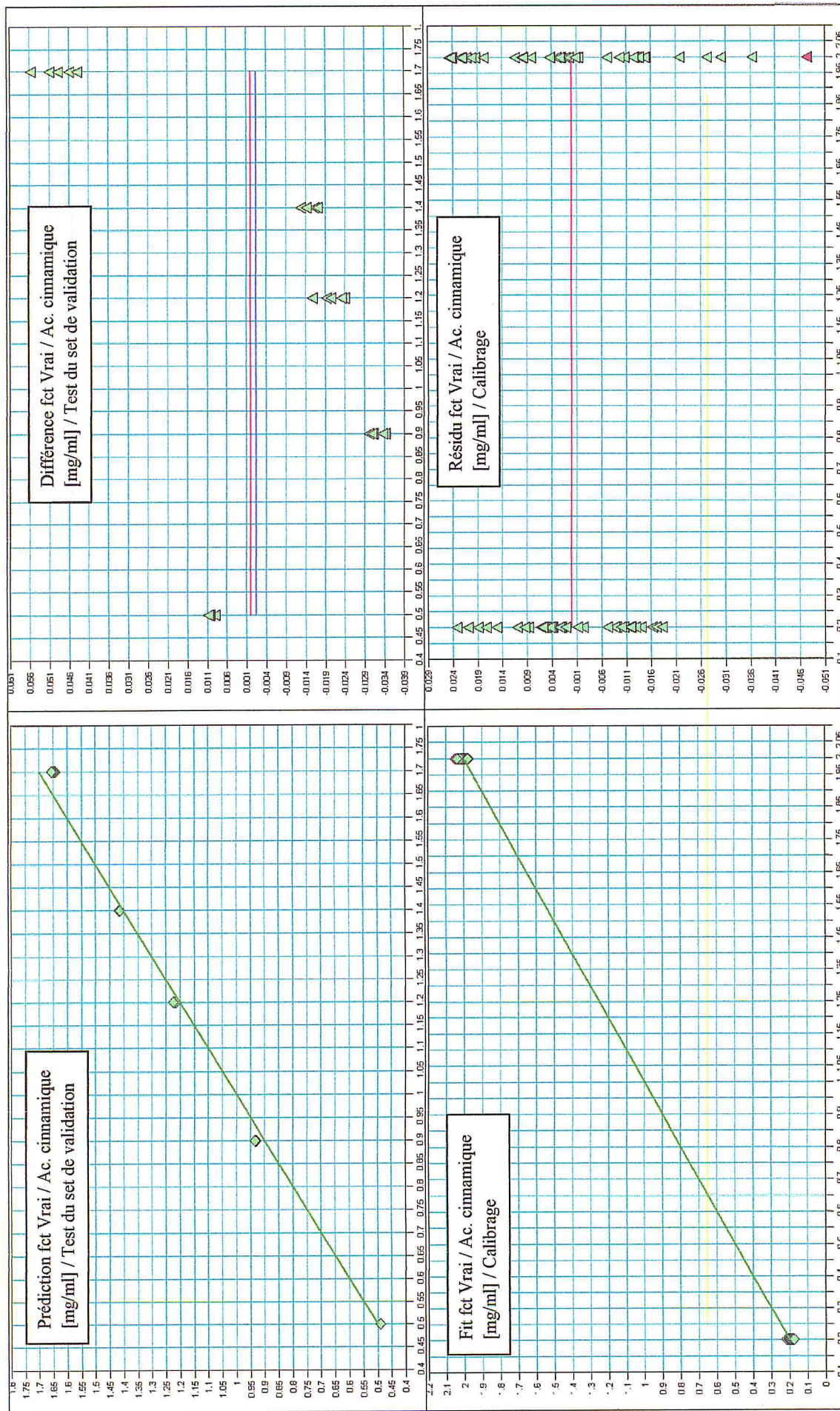


Figure III.11 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'acide cinnamique.

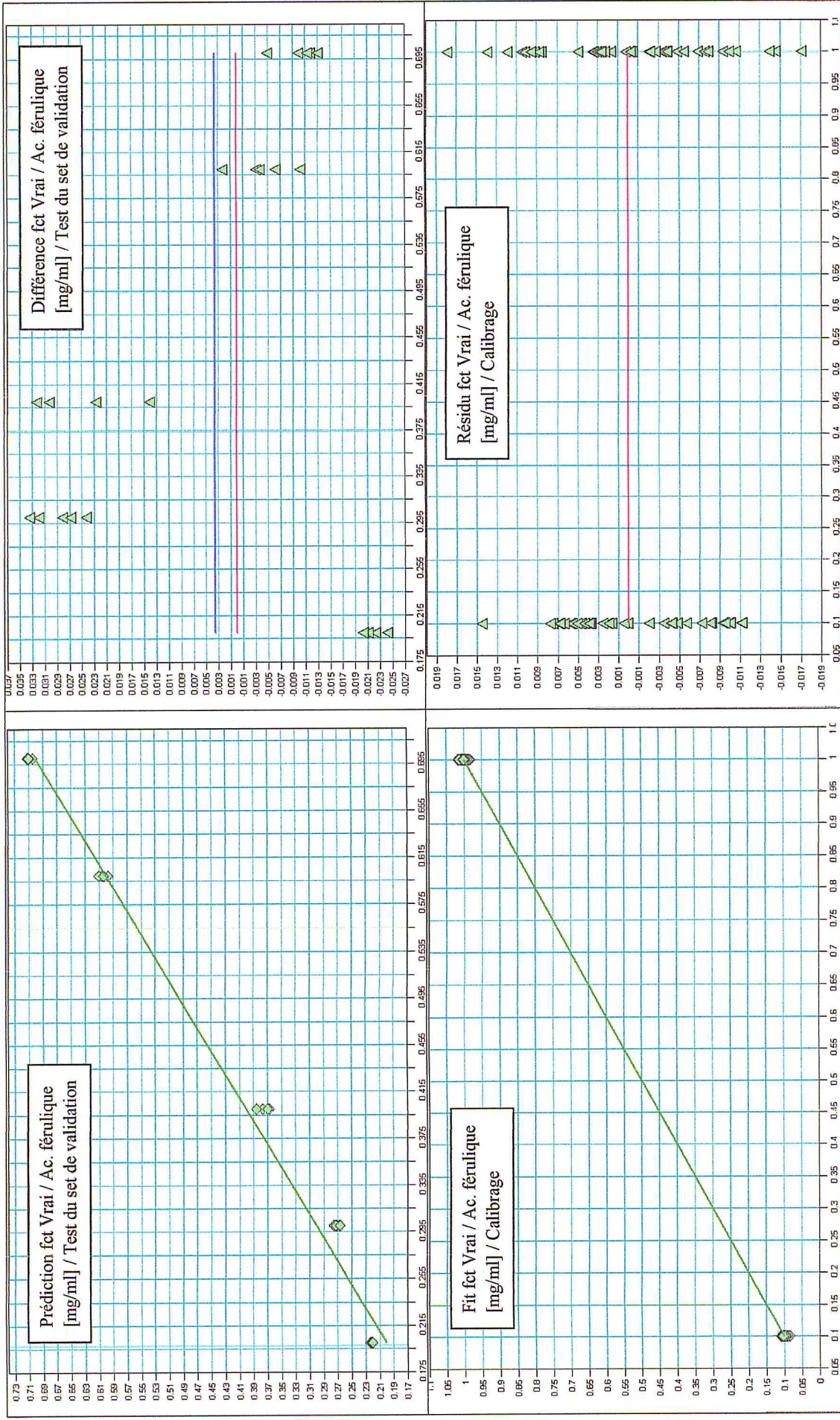


Figure III.12 : Représentations graphiques des paramètres analytiques pour l'acide férulique.

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 ($R^2 > 98$) et des erreurs *RMSEP* inférieurs à 0.1 permettant d'estimer la bonne qualité du calibrage.

Les meilleurs paramètres analytiques sont obtenus pour l'acide *p*-hydroxybenzoïque dû probablement à sa concentration relativement élevée par rapport aux autres étalons.

III.3. Matériel fongique et préparation des extraits

III.3. a) Origine et identification de l'espèce de Terfez

L'espèce de truffe du désert utilisée pour l'étude quantitative des acides phénoliques majoritaires par la spectroscopie IRTF est *Tirmania nivea* (Trappe, 1971). Ses ascomes proviennent de la région du sud-ouest algérien (Béchar). Ils ont une forme sphérique subglobuleuse, un périidium coloré en blanc lacté et jaunissant devenant plus foncé avec l'âge, mat lisse, il peut être turbiné, lobé ou bosselé et une gléba homogène, charnue et légèrement spongieuse de couleur blanchâtre ou jaunâtre (Figure III.13).

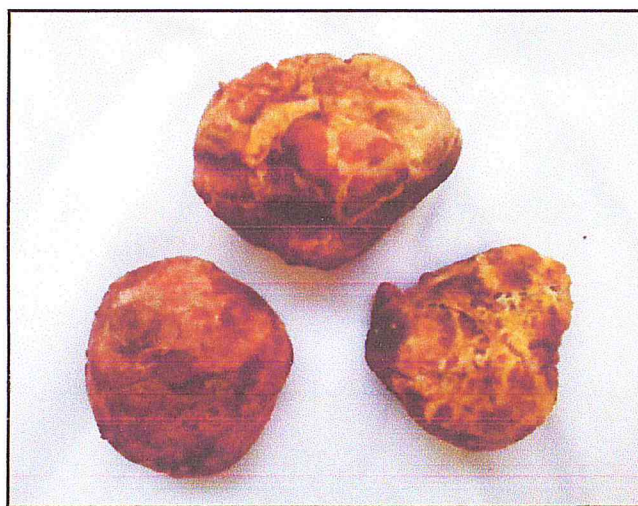


Figure III.13 : Aspect macroscopique de l'espèce *Tirmania nivea*.

L'observation au microscope optique a mis en évidence la forme ovoïde, piriforme à base courte des asques avec une dimension de : 80 x 35 μm et un nombre de spores égale à 5-8. Ainsi la forme ellipsoïde lisse ou sublisse hyaline des ascospores à membrane peu épaisse et des dimensions de : 18 x 13 μm , confirmait leur identité comme l'ont signalé dans les références [25, 130].

La figure III.14 représente les asques et les ascospores du Terfez étudié *Tirmania nivea* observés directement et après coloration avec le bleu de méthylène sous microscope optique à grossissement x1000 (échelle 10 μm).

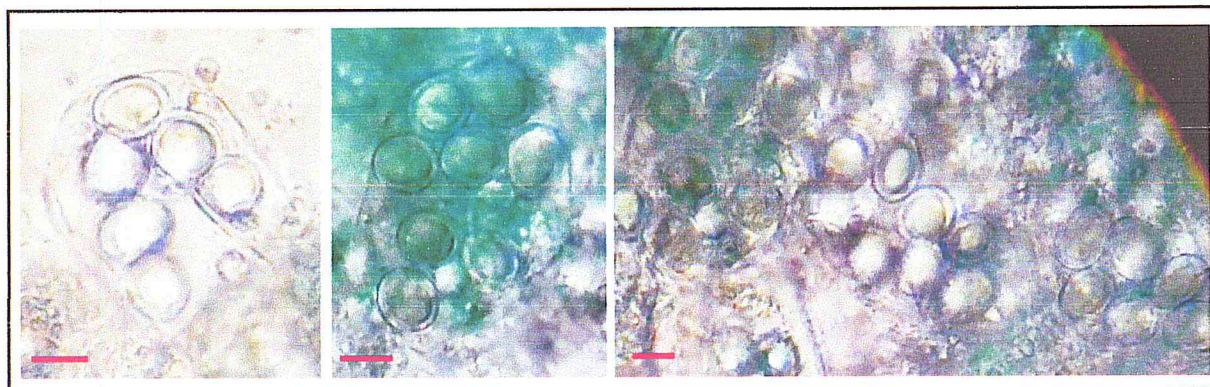


Figure III.14 : Aspect microscopique des ascospores du *Tirmania nivea*.

III.3. b) Préparation des extraits de *Tirmania nivea*

Les ascomes des truffes fraîches ont été séchées à l'ombre pendant 20 jours, puis broyées en poudre fine et stockées à température ambiante dans un endroit sec et à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation.

La poudre de truffe séchée (40 g pour chaque extrait) a été macérée séparément à température ambiante pendant 5 jours dans quatre solvants de polarité croissante : éther de pétrole, chloroforme, éthanol et méthanol. Le volume de chaque solvant utilisé était 250 ml.

Ensuite, le macérat a été filtré sur du papier filtre. Le même procédé répété deux fois puis le filtrat a été évaporé sous vide en utilisant un évaporateur rotatif.

Les extraits obtenus ont subi une extraction liquide-liquide avec le même mélange de solvants $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (90/10) utilisé pour la préparation des étalons ensuite, ils ont été évaporés à sec.

Finalement, les extraits sont gardés dans un réfrigérateur à $+4^\circ\text{C}$ jusqu'à l'analyse.

Les étapes d'extraction suivies sont résumées dans la figure III.15.

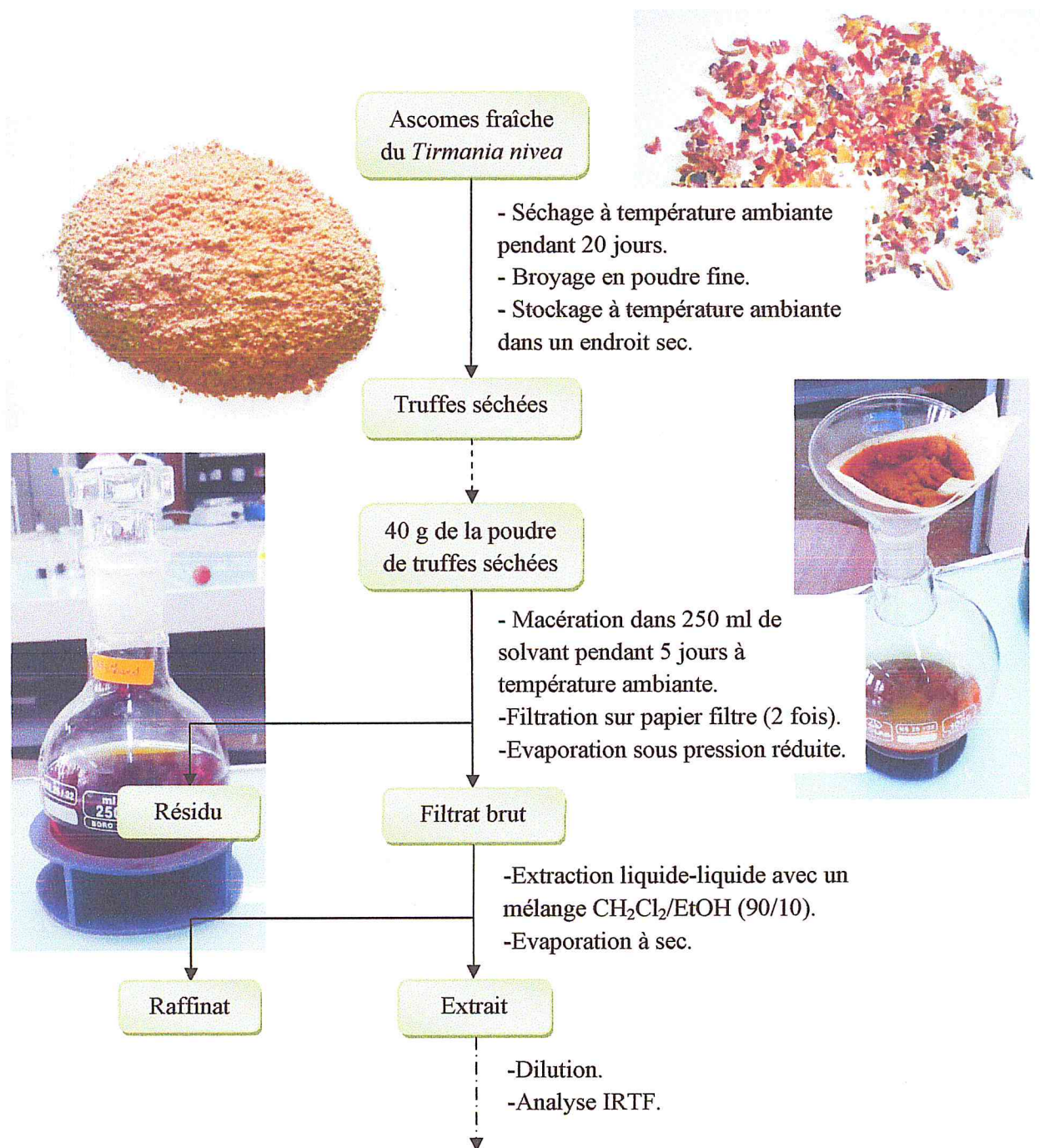


Figure III.15 : Protocole d'extraction et de préparation des extraits à partir de la truffe du désert *Tirmania nivea*.

Le tableau III.14 représente les rendements d'extraction des quatre solvants utilisés (méthanol, éthanol, éther de pétrole et chloroforme) pour 40 g du poids sec de la truffe du désert utilisée.

Tableau III.14 : Rendement d'extraction des solvants de différentes polarités.

Solvant utilisé	Rendement d'extraction (%)
Méthanol	3.80
Éthanol	3.38
Éther de pétrole	3.03
Chloroforme	2.66

III.4. Analyse des extraits par PLS-FTIR

III.4.1. Détermination des acides phénoliques dans les extraits

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 phénols (l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide cinnamique et l'acide férulique) dans les extraits méthanolique, éthanolique, chloroformique et l'extrait d'éther de pétrole de la truffe désertique *Tirmania nivea* par PLS-FTIR sans traitement préalable.

Une masse bien précise (150 mg) de chaque extrait a été diluée dans 5 ml du solvant CH₂Cl₂/EtOH (90/10).

Les solutions des extraits ont été préparées en se basant sur les données de la littérature (HPLC-DAD et méthode de Folin-Ciocalteu) [76, 80] et analysées par la combinaison de la PLS-FTIR.

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 click sur « Analyser » on peut accéder au tableau des résultats ainsi que tous les graphes et les statistiques de calibrage effectué.

La figure III.16 présente les spectres IRTF comparatifs d'absorbance des quatre extraits dilués dans CH₂Cl₂/EtOH (90/10) dans le domaine spectral compris entre 4000 et 400 cm⁻¹.

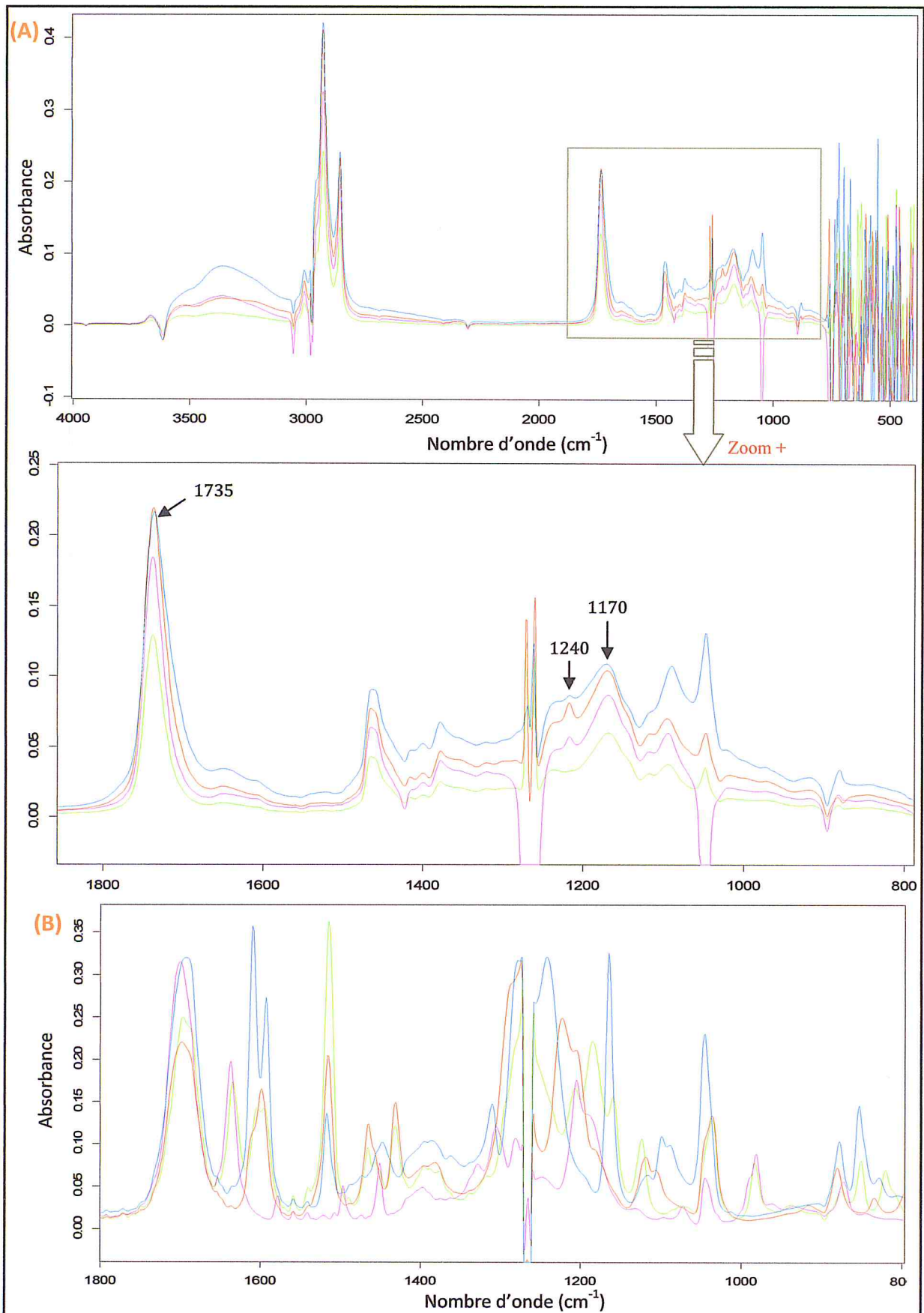


Figure III.15 : Spectres IRTF des quatre extraits dilués dans le $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (90/10), avec l'extrait méthanolique en bleu, l'extrait éthanolique en rouge, l'extrait d'éther de pétrole en rose et l'extrait chloroformique en vert (A) et spectres des étalons (B) voir figure III.2.

La comparaison entre les spectres des étalons et les spectres des extraits pose trois hypothèses : (1) Soit les extraits ne contiennent pas des acides phénoliques (2) Soit ils sont en dessous de limites de détection et sont masqués par les bandes intenses des autres composés chimiques (3) Ou bien ces acides ont été estérifiés avec la quantité d'éthanol dans le solvant de dilution (l'apparition d'une bande intense à 1735 cm^{-1} correspond à l'élongation de la liaison C=O d'un ester et deux autres bandes moyennes à 1240 et 1170 cm^{-1} qui représentent l'élongation des liaisons C-O-C).

La première hypothèse à négliger car les données théoriques montrent l'inverse, alors que pour vérifier si une réaction d'estérification a eu lieu, nous avons réalisé un témoin puis nous l'avons soumis aux mêmes conditions expérimentales que les extraits, le spectre IRTF du témoin était identique à celui de solution étalon donc nous avons pu constater que aucune réaction d'estérification n'y a eu lieu entre les acides phénoliques et l'éthanol.

Le tableau III.15 donne les résultats des concentrations prédites moyennes des quatre analytes et de la fraction phénolique dans les extraits dilués directement dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$.

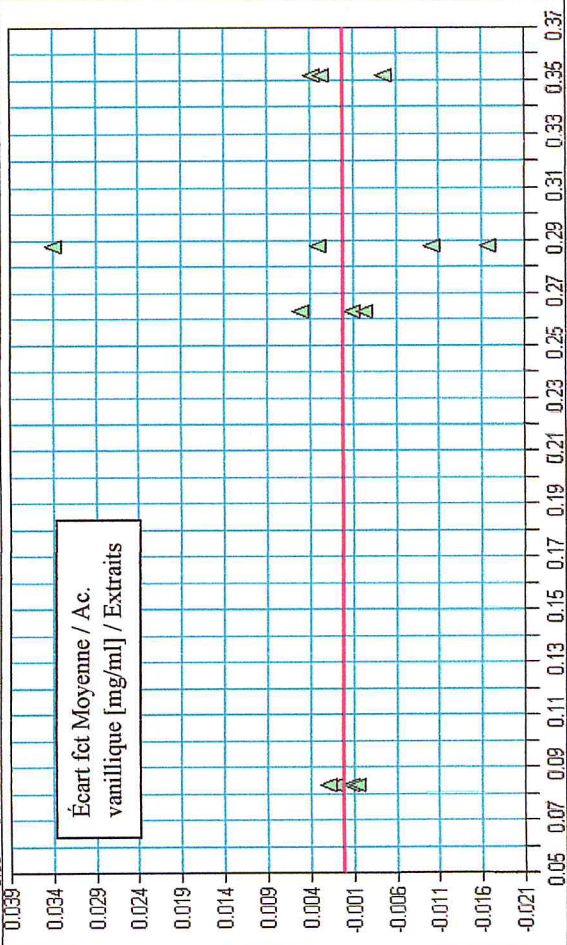
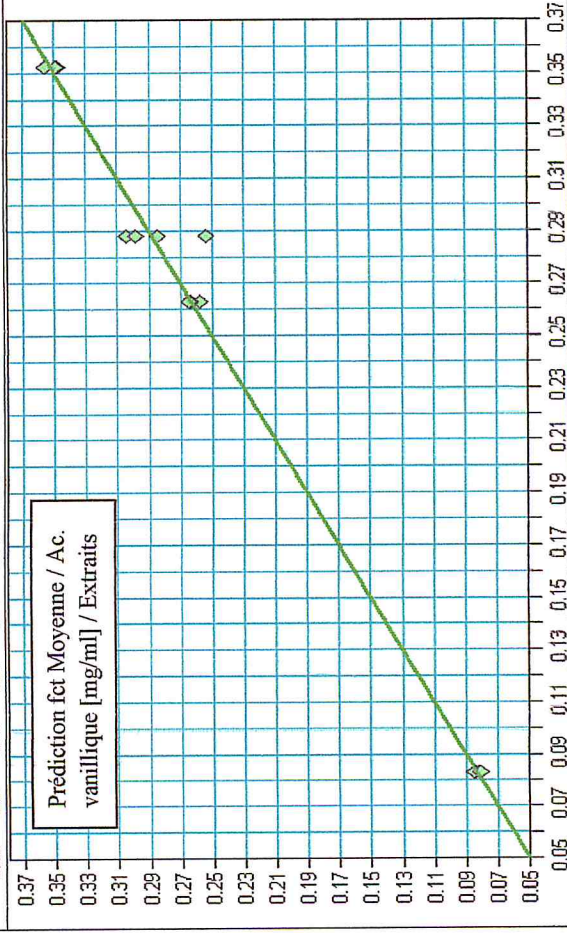
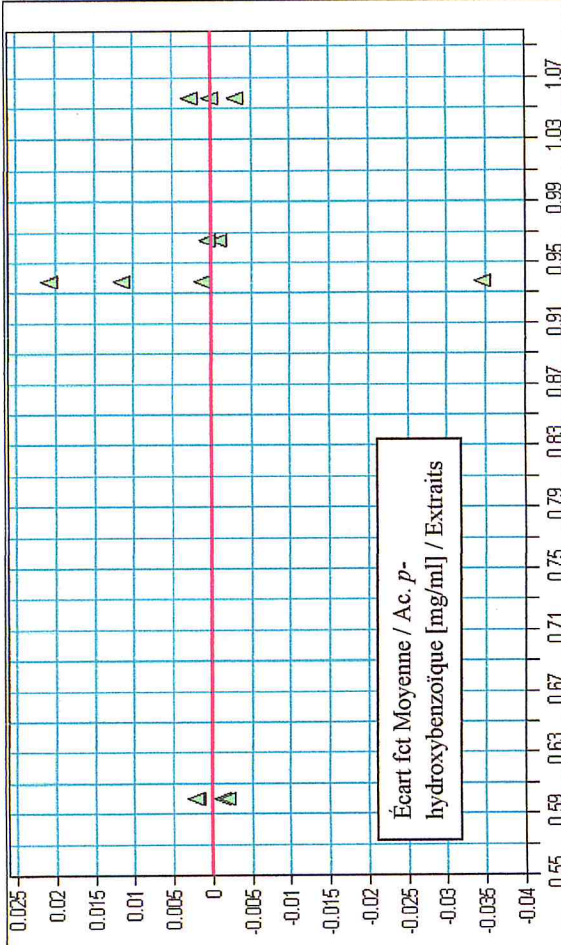
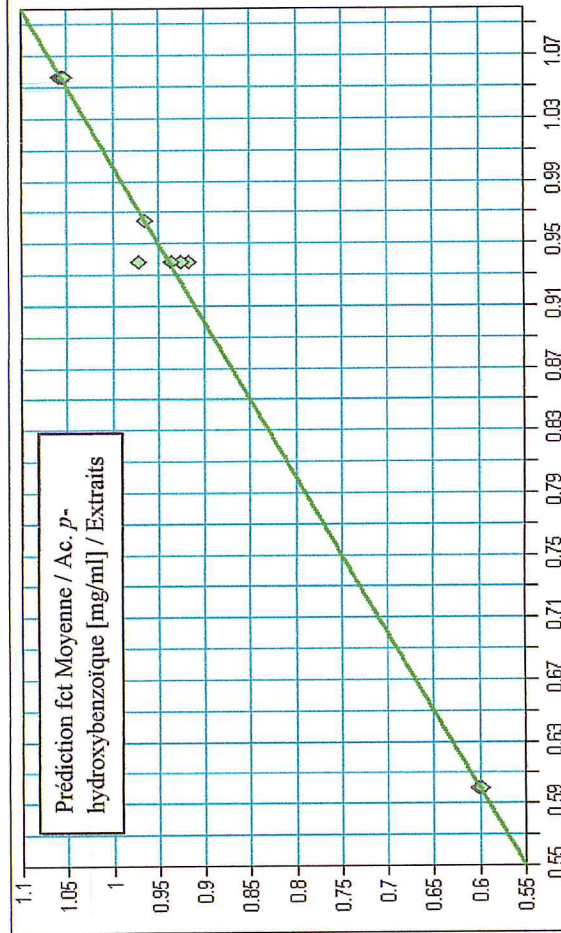
Tableau III.15 : Résultats de prédiction des quatre phénols et de la fraction phénolique dans les extraits.

Phénol Extrait	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque $C \pm \delta$ (mg.ml ⁻¹)	Acide vanillique $C \pm \delta$ (mg.ml ⁻¹)	Acide cinnamique $C \pm \delta$ (mg.ml ⁻¹)	Acide férulique $C \pm \delta$ (mg.ml ⁻¹)	Fraction phénolique $C \pm \delta$ (mg.ml ⁻¹)
Extrait méthanolique	0.96492 ± 0.00087	0.352 ± 0.012	1.86994 ± 0.00009	0.220 ± 0.011	3.407 ± 0.024
Extrait éthanolique	1.0564 ± 0.0020	0.263 ± 0.011	1.3212 ± 0.0021	0.5109 ± 0.0014	3.151 ± 0.017
Extrait d'éther de pétrole	0.938 ± 0.022	0.288 ± 0.071	0.8236 ± 0.0021	0.5403 ± 0.0092	2.59 ± 0.10
Extrait chloroformique	0.6002 ± 0.0033	0.083 ± 0.017	0.5505 ± 0.0054	0.3875 ± 0.0051	1.621 ± 0.031

$C \pm \delta$: Valeur moyenne \pm 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.

La figure III.16 illustre les représentations graphiques des paramètres analytiques des concentrations prédites et moyennes des acides phénoliques dans les extraits du méthanol, éthanol, éther de pétrole et du chloroforme.



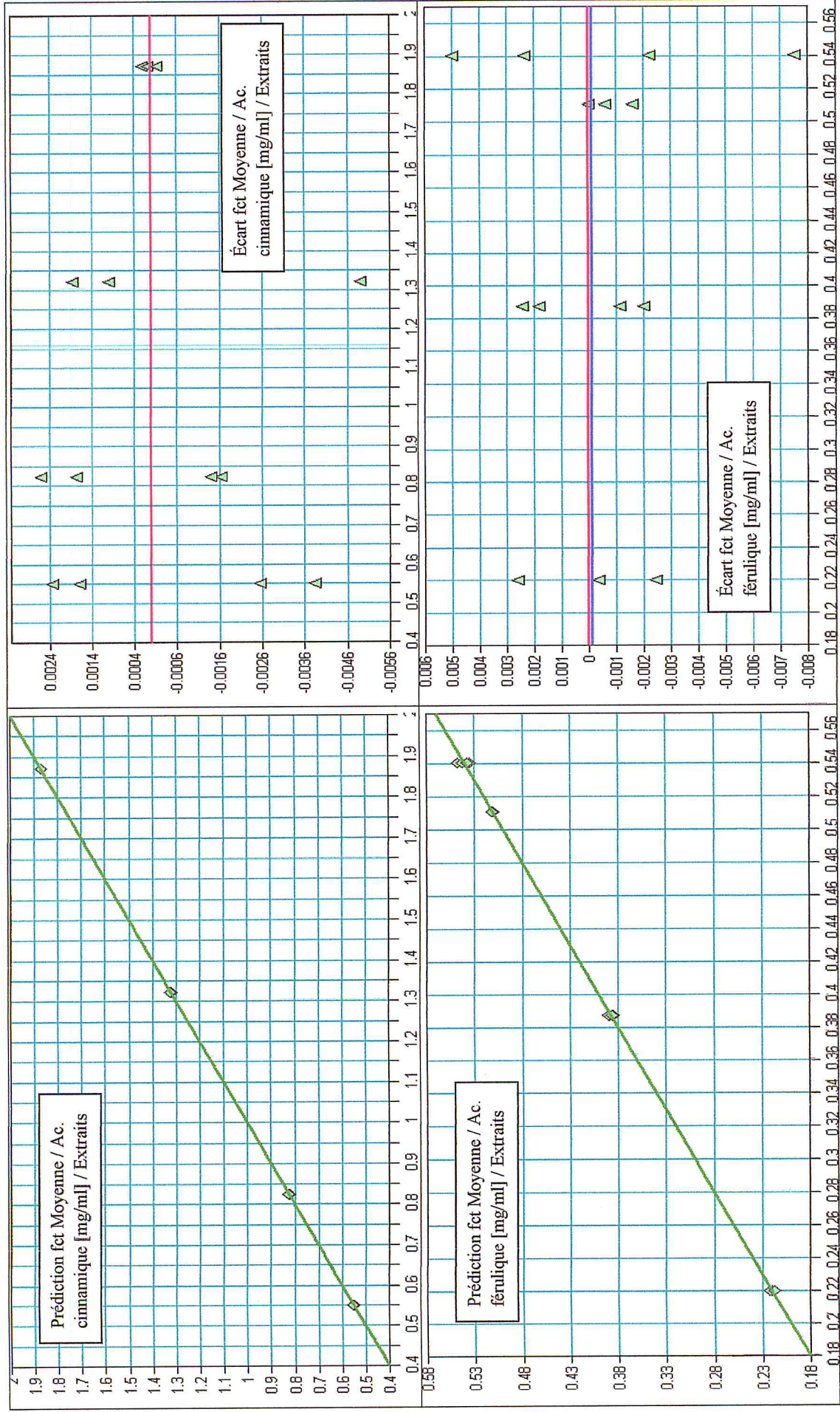


Figure III.17 : Représentations graphiques des paramètres analytiques des concentrations d'acides phénoliques étudiés dans les quatre extraits.

D'après les spectres IRTF de la figure III.16, les résultats du tableau III.15 et les représentations graphiques de la figure III.17, on remarque que :

- L'allure des spectres des extraits et des étalons n'est pas la même, ce qui révèle probablement la présence des autres composés chimiques majoritaires solubles dans notre solvant ou bien des composés phénoliques différents des étalons.
- Les concentrations prédites des analytes sont dans les limites du domaine de calibrage à l'exception de celles de l'acide vanillique qui montre des faibles concentrations dues probablement à sa faible teneur dans la matrice étudiée ou sa faible solubilité dans le solvant utilisé.
- L'acide vanillique présente également des résultats moins précis (erreurs de prédiction et de calibration et écarts) en comparaison avec les autres phénols.

III.4.2. Détermination des acides phénoliques dans les extraits enrichis

III.4.2. a) *Addition standard et préparation des extraits enrichis*

L'addition standard ou l'enrichissement peut être la méthode de choix, en raison de certaines interférences dues à la nature complexe de la matrice, ou bien lorsqu'on ne peut pas reproduire la composition de l'échantillon. Donc cette méthode permettra de réduire les erreurs de manipulation et de calculer d'une manière précise la concentration de l'analyte dans la matrice complexe.

Dans notre cas, chaque extrait du Terfez est enrichi par une quantité bien précise d'analyte. À une masse (150 mg) de chaque extrait, on a ajouté une concentration donnée de chaque étalon (voir tableau III.16). Les mélanges ont été dilués dans un volume total égal à 2 ml et ensuite ont été soumis à l'analyse par PLS-FTIR.

III.4.2. b) *Résultats d'analyse et interprétation*

La figure III.18 illustre les spectres infrarouge comparatifs d'absorbance des quatre extraits après l'enrichissement avec une dilution dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (90/10) dans le domaine spectral compris entre 4000 et 400 cm^{-1} .

Nous avons résumé les résultats de prédiction des quatre composés et ainsi la fraction phénolique des extraits méthanolique, éthanolique, étherique et chloroformique de *Tirmania nivea* avant et après l'enrichissement pour des concentrations équivalentes d'extraits dans le tableau III.16.

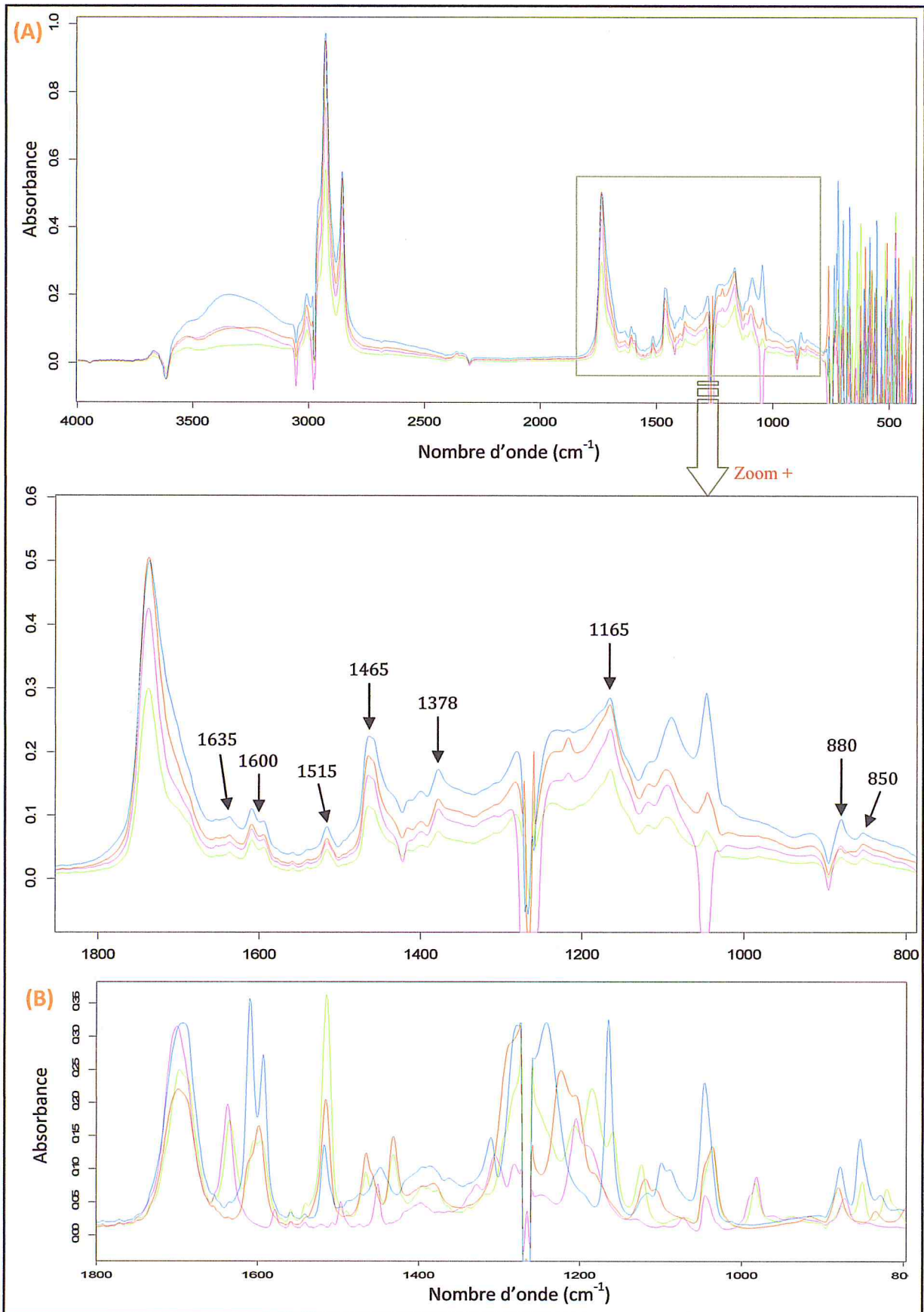


Figure III.17: Spectres IRTF des quatre extraits, concentrés et enrichis, dilués dans le $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$, l'extrait méthanolique en bleu, l'extrait éthanolique en rouge, l'extrait d'éther de pétrole en rose et l'extrait chloroformique en vert (A) et spectres des étalons (B) voir figure III.2.

Tableau III.16 : Valeurs moyennes de concentration des quatre acides et de la fraction phénolique des extraits avant et après l'enrichissement.

Extrait	Analyte	Concentration présente avant l'enrichissement $C \pm \delta$ (mg.ml ⁻¹)	Concentration ajoutée (mg.ml ⁻¹)	Concentration trouvée après l'enrichissement $C \pm \delta$ (mg.ml ⁻¹)	Pourcentage de récupération R (%)
Extrait méthanolique	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	2.41229 ± 0.00087	1.00	3.3310 ± 0.0028	97.62
	Acide vanillique	0.880 ± 0.012	0.75	1.7357 ± 0.0083	106.47
	Acide cinnamique	4.67485 ± 0.00009	0.50	4.83080 ± 0.00082	93.35
	Acide férulique	0.550 ± 0.011	0.25	0.7852 ± 0.0069	98.14
	Fraction phénolique	8.517 ± 0.024	2.50	10.683 ± 0.019	96.96
Extrait éthanolique	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	2.6411 ± 0.0020	1.00	3.5068 ± 0.0015	96.31
	Acide vanillique	0.657 ± 0.011	0.75	1.5098 ± 0.0043	107.30
	Acide cinnamique	3.303 ± 0.0021	0.50	3.5794 ± 0.0014	94.12
	Acide férulique	1.2774 ± 0.0014	0.25	1.4315 ± 0.0011	93.72
	Fraction phénolique	7.879 ± 0.017	2.50	10.0276 ± 0.0083	96.62
Extrait de l'éther de pétrole	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	2.345 ± 0.022	1.00	3.1781 ± 0.0060	95.02
	Acide vanillique	0.720 ± 0.071	0.75	1.538 ± 0.033	104.61
	Acide cinnamique	2.0590 ± 0.0021	0.50	2.4422 ± 0.0026	95.44
	Acide férulique	1.3507 ± 0.0092	0.25	1.4880 ± 0.0071	92.96
	Fraction phénolique	6.47 ± 0.10	2.50	8.646 ± 0.049	96.34
Extrait chloroformique	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	1.5004 ± 0.0033	1.00	2.3681 ± 0.0019	94.71
	Acide vanillique	0.208 ± 0.017	0.75	1.0190 ± 0.0049	106.37
	Acide cinnamique	1.3763 ± 0.0054	0.50	1.7877 ± 0.0051	95.28
	Acide férulique	0.9687 ± 0.0051	0.25	1.1251 ± 0.0031	92.32
	Fraction phénolique	4.053 ± 0.031	2.50	6.300 ± 0.015	96.13

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

Il existe de nombreuses similitudes entre les spectres IRTF des quatre extraits enrichis et les spectres des étalons, où on a l'apparition des bandes moyennes à environ 1635, 1600, 1515 et 850 cm^{-1} et une augmentation de l'intensité des pics à 1465, 1378, 1165 et 880 cm^{-1} par rapport les spectres des extraits avant l'enrichissement.

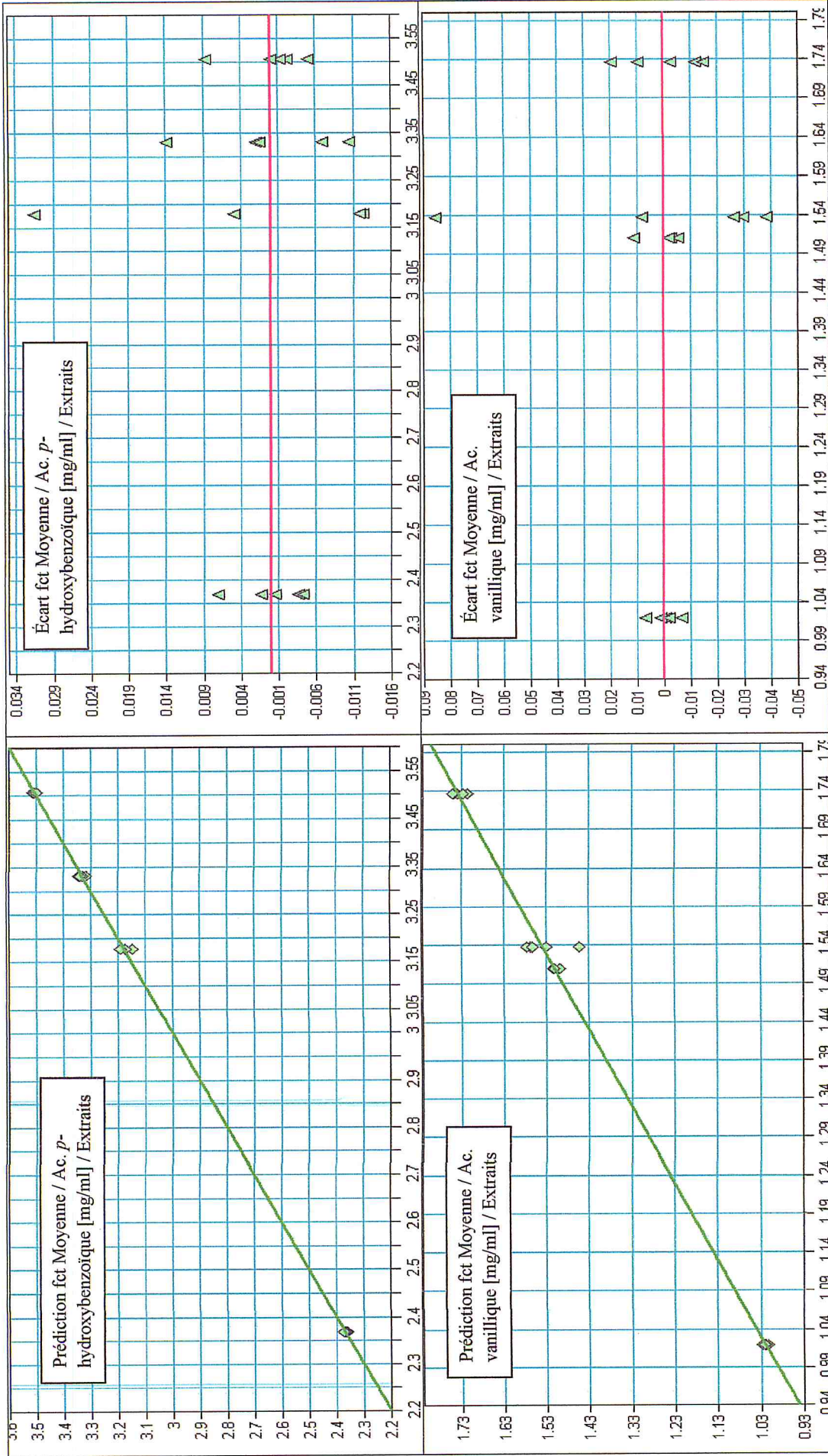
Le pourcentage de récupération est calculé en utilisant la formule suivante :

$$R\% = \frac{\text{Concentration}_{\text{Après enrichissement}}}{\text{Concentration}_{\text{Avant enrichissement}} + \text{Concentration ajoutée}} \times 100$$

D'après les résultats représentés dans le tableau III.16, on constate que pour chaque extrait, le pourcentage de récupération oscille autour de 92 et 107% pour toutes les composantes. Des valeurs moyennes des concentrations prédites varient entre 0.78 et 4.83 mg.ml^{-1} , sont dues probablement à la composition des différentes matrices. En ce qui concerne la fraction phénolique, on remarque que les valeurs des concentrations calculées sont généralement excellentes.

L'extrait méthanolique montre des concentrations élevées en acides phénoliques avec les meilleures valeurs de pourcentage de récupération alors que l'extrait chloroformique montre des plus faibles concentrations avec des pourcentages de récupération plus basses.

Les graphes de la figure III.18 illustrent les représentations des paramètres analytiques des concentrations prédites et moyennes des quatre phénols dans les extraits chloroformique, étherique, éthanolique et méthanolique du Terfez après l'enrichissement.



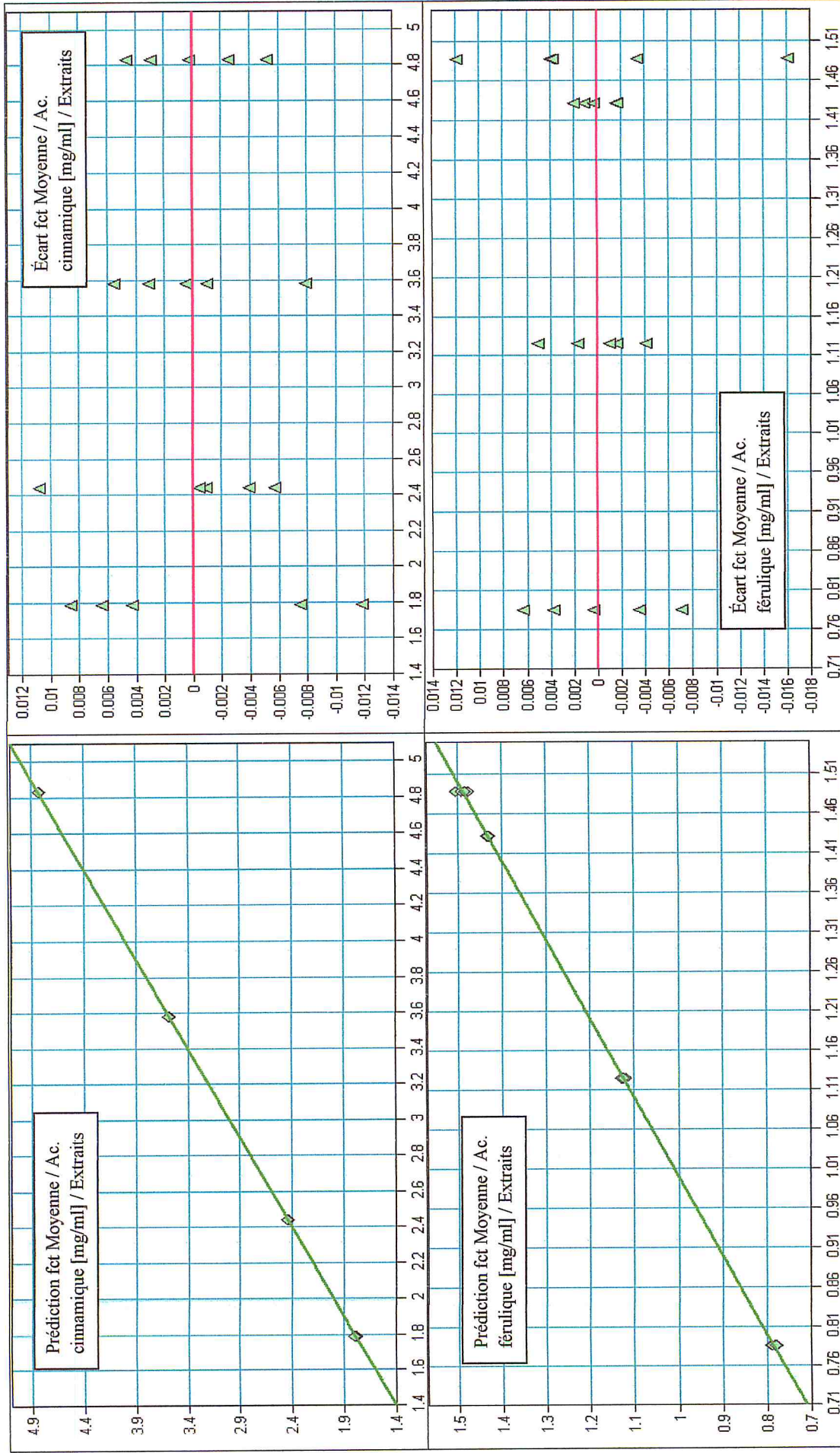


Figure III.19 : Représentations graphiques des paramètres analytiques des concentrations de phénols dans les extraits après l'enrichissement.

Le tableau III.17 représente les valeurs de la prédiction des concentrations des analytes et la fraction phénolique calculée dans les extraits méthanolique, éthanolique, étherique et chloroformique et la proportion de chaque phénol rapportée pour 1g d'extrait de *Tirmania nivea*.

Tableau III.17 : Teneurs et taux des quatre acides et de la fraction phénolique dans 1g d'extrait.

Extrait	Analyte	Teneur des phénols $x \pm \delta$ (mg)	Taux (%)
Extrait méthanolique	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	32.163867 \pm 0.00087	3.2
	Acide vanillique	11.736 \pm 0.012	1.2
	Acide cinnamique	62.33133 \pm 0.00009	6.2
	Acide férulique	7.333 \pm 0.011	0.7
	Fraction phénolique	113.564 \pm 0.024	11.4
Extrait éthanolique	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	35.2147 \pm 0.0020	3.5
	Acide vanillique	8.7605 \pm 0.011	0.9
	Acide cinnamique	44.0407 \pm 0.0021	4.4
	Acide férulique	17.0315 \pm 0.0014	1.7
	Fraction phénolique	105.047 \pm 0.017	10.5
Extrait de l'éther de pétrole	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	31.265 \pm 0.022	3.1
	Acide vanillique	9.600 \pm 0.071	1.0
	Acide cinnamique	27.4528 \pm 0.0021	2.7
	Acide férulique	18.0092 \pm 0.0092	1.8
	Fraction phénolique	86.33 \pm 0.10	8.6
Extrait chloroformique	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	20.0053 \pm 0.0033	2.0
	Acide vanillique	2.772 \pm 0.017	0.3
	Acide cinnamique	18.3511 \pm 0.0054	1.8
	Acide férulique	12.9153 \pm 0.0051	1.3
	Fraction phénolique	54.044 \pm 0.031	5.4

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

Les proportions calculées des analytes et de fraction phénolique dans 1g d'extrait de la table III.17 sont représentées dans la figure III.19.

L'analyse des deux tableaux III.16 et III.17 montre globalement des valeurs de concentrations prédites en accord avec les valeurs de la littérature [76] ce qui permet de valider les modèles développés dans cette étude.

L'extrait méthanolique montre les meilleures proportions en acides phénoliques avec les concentrations suivantes : 32.16, 11.74, 62.33 et 7.33 mg correspondantes à l'acide

p-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide cinnamique et l'acide férulique, respectivement, pour une masse équivalente à 1g d'extrait.

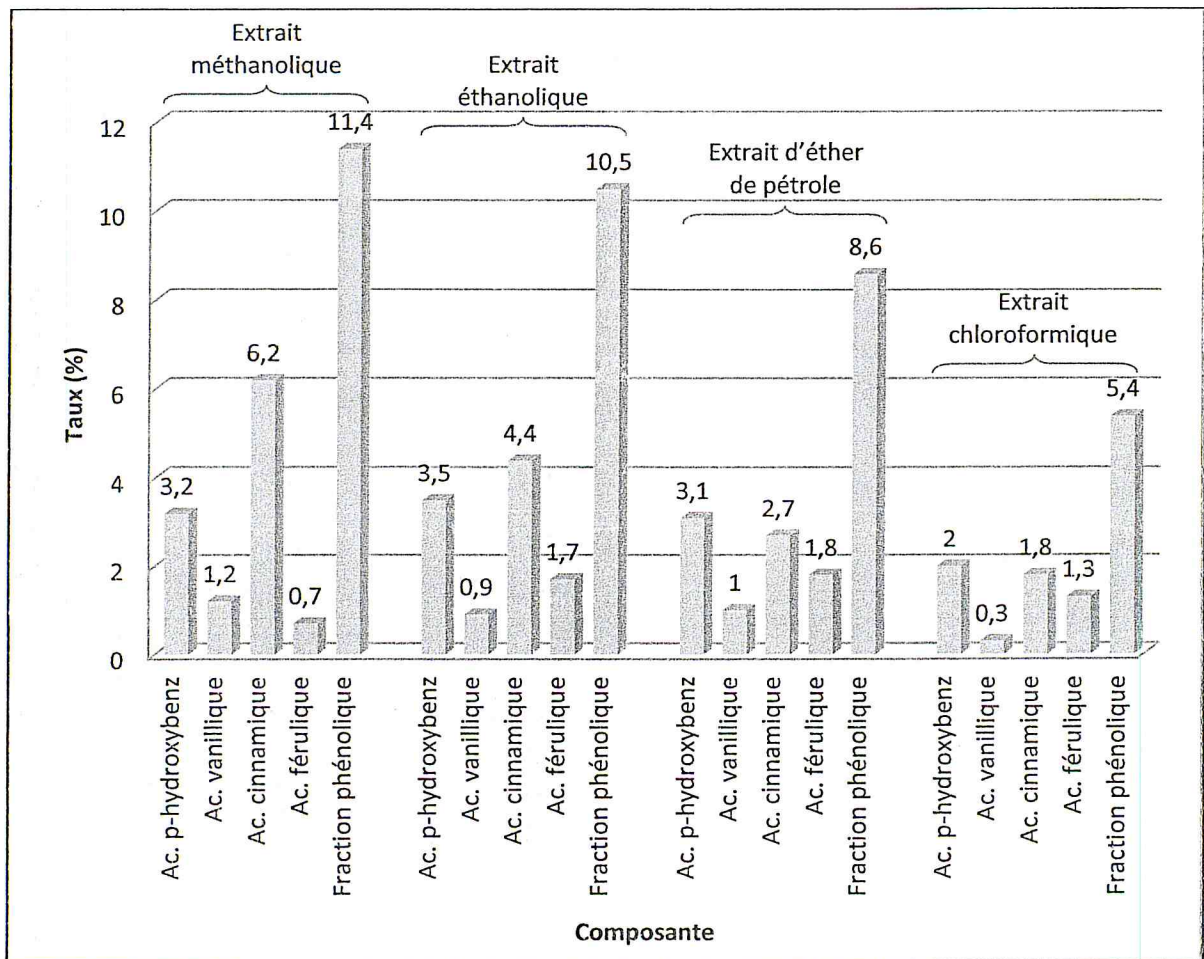


Figure III.19 : Taux des composantes dans 1g de chaque extrait obtenu.

Cependant nous notons des valeurs d'analyses par défaut (approximativement la moitié des valeurs de la méthode Folin-Ciocalteu) [76, 80], ceci pourrait être dû à la non-sélectivité de la méthode F.C., d'où la nécessité d'obtenir des mesures indépendantes de trois répliques au moins pour confirmer les résultats obtenus.

Bien entendu, l'étude comparative correcte pour valider les modèles développés devrait se faire avec les résultats d'analyse chimique par HPLC ou par CG-SM de nos extraits.

CONCLUSION

GÉNÉRALE

Conclusion générale

Nous avons réussi à travers ce modeste travail à exécuter, pour la première fois au sein de notre équipe de recherche, le logiciel intégré « Quant 2 ». L'avantage de tel logiciel est qu'il permet de traiter des spectres des matrices complexes présentant des bandes IR chevauchées.

Afin de construire les modèles de calibration, seize solutions étalons à deux niveaux de concentrations ont été préparées à partir de quatre acides phénoliques majoritaires dans la truffe (l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide cinnamique et l'acide férulique respectivement dissous dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (90/10)) dans les domaines de concentrations comprises entre 0.1 et 4 mg.ml^{-1} puis analysées en utilisant des fenêtres de BaF_2 , avec une entretoise de 0.1 mm d'épaisseur et une accumulation de 15 spectres.

Nous avons étudié les différents paramètres d'optimisation lors de cette modélisation à savoir les gammes d'optimisation, l'option de prétraitement spectral (correction d'offset, soustraction d'une droite, dérivée première, dérivée seconde), les régions spectrales utilisées pour les rangs 4, 5 et 6.

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 : 1765.5-1354, 1175.27-1137.98, 864.1-815 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 0.02 et 0.10, des erreurs de calibrage *RMSEE* limitées par 0.01 et 0.03 sachant que leurs coefficients de détermination sont inclus dans le domaine entre 98.87 et 99.99 permettant d'estimer la bonne qualité de calibrage.

Les rendements en extraits obtenus par macération varient selon la polarité du solvant utilisé. Le meilleur rendement de 3.80% est enregistré pour l'extrait méthanolique suivi par l'extrait éthanolique et l'extrait d'éther de pétrole avec des rendements de 3.38% et 3.03 % respectivement, et enfin l'extrait chloroformique avec 2.66%.

L'analyse des échantillons réels enrichis donne des valeurs de prédiction par défaut en comparaison avec les données de la littérature. L'extrait méthanolique présente les concentrations les plus élevées en acides phénoliques avec les valeurs 32.16, 11.74, 62.33

et 7.33 mg.ml^{-1} correspondantes, respectivement, à l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide cinnamique et l'acide férulique pour une masse équivalente à un gramme d'extrait. Alors que le pourcentage de récupération a varié de 92 à 107 %.

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 facteurs modulants les rendements et les propriétés de ces 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.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Alsheikh, AM., 1994 - Taxonomy and mycorrhizal ecology of the desert truffles in the genus *Terfezia*. Ph.D. thesis, Oregon State University, Oregon, USA.
2. Ackerman LGJ, Van Wyk PJ, Du Plessis LM (1975) Some aspects of the composition of the Kalahari truffle or n'abba. *South Afr Food Rev* 2(5):145–147
3. Honrubia M, Gutiérrez A, Morte A (2002) Desert truffle plantation from south-east Spain. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. In: Hall IR, Wang Y, Danell E, Zambonelli A (eds). Proceedings of the 2nd international conference on edible mycorrhizal mushrooms, Christchurch, New Zealand, 3–6 July 2001. New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited, Christchurch
4. Murcia MA, Martínez-Tomé M, Vera A, Morte A, Gutiérrez A, Honrubia M, Jiménez AM (2003) Effect of industrial processing on desert truffles *Terfezia clavaryi* Chatin and *Picoa juniper* Vittadini): proximate composition and fatty acids. *J Sci Food Agric* 83:535–541
5. Kagan-Zur V. and Roth-Bejerano N. (2008): Dessert truffles. *Truffles*, 1: 32–37.
6. Bokhary H.A. and Sarwat P. (1993). Chemical composition of desert truffles *Terfezia clavaryi*. *J. Food Comp. Anal.* 6(3): 285–293.
7. Saltarelli R., Ceccaroli P., Cesari P., Barbieri E. and Stocchi V. (2008) Effect of storage on biochemical and microbiological parameters of edible truffle species. *Food Chem.* 109: 8–16.
8. Al-Laith A.A. (2010). Antioxidant components and antioxidant/antiradical activities of desert truffle (*Tirmania nivea*) from various Middle Eastern origins. *J. Food Comp. Anal.* 23; 15–22
9. Fratianni F., Luccia A. Di, Coppola R. and Nazzaro F. (2007) Mutagenic and antimutagenic properties of aqueous and ethanolic extracts from fresh and irradiated *Tuber aestivum* black truffle: a preliminary study. *Food Chem* 102:471–474.
10. Janakat S., Al-Fakhiri S. and Sallal A.K. (2005) Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanolic extracts of the truffle *Terfezia clavaryi* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Med J.* 26(6): 952–955.
11. Janakat S. and Nassar M. (2010). Hepatoprotective activity of desert truffle (*Terfezia clavaryi*) in comparison with the effect of *Nigella sativa* in the rat. *PJN* 9: 52–56.
12. Barros L., Ferreira M.J., Queiros B., Ferreira I.C. and Baptista P. (2007). Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem* 103: 413–419.
13. Murcia M.A., Martínez-Tomé M., Jiménez A., Vera A., Honrubia M. and Parras P. (2002). Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing. *Journal of Food Protection*, 65(10): 1614–1622.
14. Morte A, Honrubia M (1995) Improvement of mycorrhizal synthesis between micropropagated *Helianthemum almeriense* plantlets with *Terfezia clavaryi* (desert truffle). In: Elliott TJ (ed) Science and cultivation of edible fungi. Balkema, Rotterdam, The Netherlands.
15. Morte A, Lovisolo C, Schubert A (2000) Effect of drought stress on growth and water relations of the mycorrhizal association *Helianthemum almeriense*-*Terfezia clavaryi*. *Mycorrhiza* 10:115–119

16. Alsheikh AM, Trappe JM (1983a) Desert truffles: the genus *Tirmania*. *Trans Br Mycol Soc* 81(1):83–90
17. Alsheikh A.M., et Trappe JM., 1983b - Taxonomy of *Phaeangium lefebvrei*, a desert truffle eaten by birds. *Can J Mycol* 61(7), pp 1919–1925.
18. Khabar L, Najim L, Janex-Favre MC, Parguey-Leduc A (2001) Contribution à l'étude de la flore mycologique du Maroc: les truffes marocaines, discomycètes. *Bull Soc Mycol Fr* 117(3):213–229
19. Mandeel, Q.A., Al-Laith, A.A., 2007. Ethnomycological aspects of the desert truffle among native Bahraini and non-Bahraini peoples of the Kingdom of Bahrain. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 118–129.
20. Al-Rahmah, A.N., 2001. Truffle of Deserts and Jungles. King Saud University Publications, Riyadh, Saudi Arabia, p. 272 (in Arabic).
21. Photograph © Michael Loizides, DESERT TRUFFLES: the mysterious jewels of antiquity. Michael Loizides*, Caroline Hobart** George Konstandinides*** & Yiangos Yiangou*
22. Malençon G (1938) Les truffes européennes. Historique, morphogénie, organographie, classification, culture. *Revue Mycologique* 3. Mémoires Hors Série 1:1–92
23. Burdsall HH Jr (1968) A revision of the genus *Hydnocystis* (Tuberales) and of the hypogeous species of *Geopora* (Pezizales). *Mycologia* 60:496–525
24. Trappe JM (1979) The orders, families and genera of hypogeous ascomycotina (truffles and their relatives). *Mycotaxon* 9(1):297–340
25. Fortas Z., Chevalier G., 1992. Caractéristiques de la germination des ascospores de *Terfezia arenaria* (Moris) Trappe, récoltée en Algérie. *Cryptogamie Mycol.*, 13 : 21-29.
26. Maublanc A (1946) Les champignons de France. Les champignons de France, 3^{ème} édition, Tome II, 1946. pp. 220–223
27. Maublanc A (1952) Les champignons de France 4^{ème} édition tome II. Les champignons de France, 4^{ème} édition, Tome II, 1952. pp. 232–233
28. Dumas A, Colman L (eds) (1958) Alexandre Dumas's dictionary of cuisine. Simon & Schuster, New York
29. Mandaville PM (2011) Bedouin Ethnobotany: plant concepts and uses in a desert pastoral world. University of Arizona Press, Tucson
30. Shavit E (2008) Truffles roasting in the evening fires: pages from the history of desert truffles. *Fungi Magazine* 1(3):18–23
31. Trappe JM, Claridge AW, Liddle L (2008a) Desert truffles of the Australian outback: ecology, ethnomycology and taxonomy. *Econ Bot* 62(3):497–506
32. Trappe JM, Claridge AW, Arora D, Smit WA (2008b) Desert truffles of the African Kalahari: ecology, ethnomycology and taxonomy. *Econ Bot* 62(3):521–529
33. Chatin A. (1891a) Terfas ou truffes d'Afrique et d'Arabie. Genre *Terfezia* et *Tirmania*. *Bull Soc Bot Fr* 38:59–64

34. Chatin A. (189b) Contribution à l'histoire botanique de la truffe : kamé de Damas (*Terfezia claveryi*). Bull Soc Bot Fr 38:332-335
35. Chatin A (1896b) Un terfes d'Espagne et trois nouveaux terfas du Maroc. Bull Soc Bot Fr 43:397-399
36. Patouillard MN (1894a) Les Terfez de la Tunisie. J Bot 10:153-156
37. Patouillard MN (1894b) Les Terfez de la Tunisie (2 ème note). J Bot 10:181-183
38. Maire R (1906) Notes mycologiques. Ann Mycol 4:329-335
39. Tulane LR, Tulasne C (1851) Fungi hypogaei. Klincksieck, Paris, 222 p
40. Moyen J (1889) Les champignons : traités élémentaire et pratique de mycologie (page 671 et p. 691). Les champignons : traités élémentaire et pratique de mycologie. J Rotschild, Paris, 762 p.
41. Chatin MA (1896) Truffes (terfaz) de Grèce, *Terfezia gennadii*. Bull Soc Bot Fr 43:611-617
42. Fischer E (1897) Plectascineae. In: Engler et Prantl, Die natürlichen Pflanzenfamilien, Engelmann Leipzig, pp. 290-320
43. Mattiolo O. (1905) Prima contribuzione allo studio della flora ipogea del Portogallo. In Bolm. Soc. broterniana 21: 86-105
44. Mattiolo O. (1922) Osservazioni supra due ipogea della Cirenaica e considerazioni intorno ai generi *Tirmania* e *Terfezia*. Atti Acad. naz. Lincei Memerie (ser. 5) 13: 543-568.
45. Bataille MF (1922) Flore analytique et descriptive des tuberoïdes de l'Europe et de l'Afrique du nord. Bull Soc Mycol Fr 37(4):155-207
46. Maublanc A (1927) Les champignons comestibles et vénéneux, 2ème édition, tome II. Paul Lechevalier, Paris
47. Imai S (1933) On two new species of Tuberaceae. Proc Imp Acad 9:183-184
48. Rayss T (1959) Quelques additions a` la mycoflore d'Israel. Bull Res Council Israel 8(1):1-14
49. Kiraly I, Bratek Z (1992) *Terfezia terfezioides* a common truffle in Hungary. Micologia e Vegetazione Mediterranea. In: Tuber, proceeding of the international conference on truffle, l'Aquila, Italy, 5-8 March, 1992) 7(1):43-45
50. Lawrynovicz M, Markovic M, Milenkovic M, Ivancevic B (1997) *Terfezia terfezioides*-a new hypogeous fungus for Balkan peninsula. Acta Mycol 32:233-238
51. Fortas Z., 2009. Diversité des espèces de terfez (truffes des sables) des zones arides algériennes. Séminaire international : Protection et préservation des écosystèmes sahariens, Ouargla, p3 51.
52. Janex-Favre MC, Parguey-Leduc A, Rioussset L (1988) L'ascocarpe hypogé d'une Terfez française (*Terfezia leptoderma* Tul., Tubérales, Discomyce`tes). Bull Trimestriel Soc Mycol Fr 104(3):145-178
53. Chevalier G, Rioussset L, Dexheimer J, Dupre C (1984) Synthèse mycorhizienne entre *Terfezia leptoderma* Tul. et diverses Cistacées. Agronomie 4:210-211

54. Gutiérrez A, Morte A, Honrubia M (2003) Morphological characterization of the mycorrhiza formed by *Helianthemum almeriense* Pau with *Terfezia clavervyi* Chatin and *Picoa lefebvrei* (Pat.) Maire. *Mycorrhiza* 13:299–307
55. http://images.google.fr/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fnaturezaysenderos.com%2FFPlantas%2FHelianthemum_almeriense5.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fnaturezaysenderos.com%2FMGeEspecie.php%3FrecordID%3DHelianthemum%2520almeriense&h=492&w=700&tbnid=6jKV TiIpX8YDkM%3A&vet=1&docid=LeJ5BMquwkpdAM&ei=DjFgWNYEEsSSapOeieAD&tbnid=isch&iact=rc&uact=3&dur=548&page=0&start=0&ndsp=30&ved=0ahUKEWjcw6GknJDRAhVEiRoKHRNPAjwQMwgkKAKwCQ&bih=933&biw=1280
56. http://images.google.fr/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fwww.lepiforum.de%2Flepidopterenforum%2Fforum%2F2_pics%2Fpic38928.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fwww.lepiforum.de%2Flepiwiki.pl%3FMompha_Miscella&h=533&w=800&tbnid=85-VkDZdFwRGVM%3A&vet=1&docid=6rVcPddqZgAG4M&ei=HDFgWOq2AoSya-6NsKgI&tbnid=isch&iact=rc&uact=3&dur=330&page=0&start=0&ndsp=32&ved=0ahUKEWjqtOiqnJDRAhUE2RoKHe4GDIUQMwggKAUwBQ&bih=933&biw=1280
57. http://sophy.tela-botanica.org/Photo-cp/Hed/Helianthemum_guttatum_21_05_2001_5.JPG
58. L. Bradai, « Inventaire et bioécologie des terfez dans quelques régions du Sahara septentrional », Thèse de Doctorat en Agronomie Saharienne, Université Kasdi Merbah-Ouargla, 2014.
59. <http://www.tuber.it/en/glossario.php>
60. Ricard J. M., Bergougnoux F., Callot G., Olivier, J. M., Pargney, J. C., & Sourzat, P. (2003). La truffe. *CTIFL, Paris, France, 270*.
61. <http://www.tuber.it/en/glossario.php>
62. J. Bordallo et A. Rodríguez, “Chapter 3 : Cryptic and New Species”, le livre de “*Desert Truffles (Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication)*”, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014.
63. L. Bradai, 2006 – Contribution à l’étude bioécologique de la truffe blanche de désert (*Tirmania* sp.) : Cas de la région de Oued Mya (Ouargla). Dissertation, Université de Ouargla, Algérie, 131p.
64. Alsheikh AM, Trappe JM (1983b) Desert truffles: the genus *Tirmania*. *Trans Br Mycol Soc* 81(1):83–90
65. E. Shavit et E. Shavit, “Chapter 20 : The Medicinal Value of Desert Truffles”, le livre de “*Desert Truffles (Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication)*”, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014.
66. M. Martinez-Tomé, L. Maggi, A. M. Jiménez-Monreal, M. A. Murcia, and J. A. T. Mari “Chapter 17 : “Nutritional and Antioxidant Properties of *Terfezia* and””, le livre de “*Desert Truffles (Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication)*”, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014.
67. Sawaya WN, Al-Shalhat A, Al-Sogair A, Mohammad M (1985) Chemical composition and nutritive value of truffles of Saudi Arabia. *J Food Sci* 50:450–453
68. Ahmed AA, Mohamed MA, Hami MA (1981) Libyan truffles “*Terfezia boudieri* Chatin”: chemical composition and toxicity. *J Food Sci* 11:927–929

69. Bokhary HA, Suleiman AAA, Basalah MO (1989) The fatty acid components of the desert truffle "Al Kamah" of Saudi Arabia. *J Food Prot* 52:668–669
70. Chellal A., 1995. *Terfezia boudieri* et *Tirmania pinoyi*: composition chimique et effet des traitements thermiques, pouvoir antibiotiques. Thèse de Magister. Univ. Ferhat Abbas (Sétif) : 55-65.
71. Chellal A., Lukasova E., 1995. Evidence for antibiotics in two Algerian truffles *Terfezia* and *Tirmania*. *Pharmazie*, 50: 228-229.
72. S. S. Dahham, S. S. Al-Rawi, A. H. Ibrahim, A. S. Abdul Majid , A.M. S. Abdul Majid, "Antioxidant, anticancer, apoptosis properties and chemical composition of black truffle *Terfezia claveryi*", *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2016 xxx, xxx–xxx ; www.ksu.edu.sa et www.sciencedirect.com
73. H. H. Doğan and S. Aydın, "Determination of antimicrobial effect, antioxidant activity and phenolic contents of desert truffles in Turkey", *Afr J Tradit Complement Altern Med.* (2013) 10(4):52-58 ; <http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v10i4.9>
74. M. Özyürek, M. Bener, K. Güçlü, R. Apak, "Antioxidant/antiradical properties of microwave-assisted extracts of three wild edible mushrooms", *Food Chemistry* 157 (2014) 323–331
75. M. Akyüz, "Nutritive value, flavonoid content and radical scavenging activity of the truffle (*Terfezia boudieri* Chatin)", *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2013, 13(1), 143-151
76. Stojkovic D, Reiss FS, Ferreira ICFR, Barros L, Glamoclija J, Ciric A, Nikolic M, Stevic T, Giveli A, Sokovic M (2013), *Tirmania pinoyi*: chemical composition, in vitro antioxidant and antibacterial activities and in situ control of staphylococcus aureus in chicken soup. *Food Res Int* 53:56–62
77. Lopes GKB, Herbert M, Schulman HM, Hermes-Lima M (1999) Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim Biophys Acta* 1472:142–152
78. Dabbour IR, Takruri HR (2002) Protein digestibility using corrected amino acid score method (PDCAAS) of four types of mushrooms grown in Jordan. *Plant Foods Hum Nutr* 57:13–24
79. Dundar A, Faruk O, Acay H, Okumus V, Ozdemir S, Yildiz A (2012) Antioxidant properties, chemical composition and nutritional value of *Terfezia boudieri* (Chatin) from Turkey. *Food Sci Technol Int* 18:317–328
80. A. Hamza, N. Zouari, S. Zouari , H. Jdir, S. Zaidi, M. Gtari, M. Neffati, "Nutraceutical potential, antioxidant and antibacterial activities of *Terfezia boudieri* Chatin, a wild edible desert truffle from Tunisia arid zone Arabian", *Journal of Chemistry* (2016) 9, 383–389
81. Janakat S, Al-Fakhiri S, Sallal AK (2004) A promising peptide antibiotic from *Terfezia claveryi* aqueous extract against *Staphylococcus aureus* in vitro. *Phytother Res* 18:810–813
82. Janakat S., Al-Fakhiri S. and Sallal A.K. (2005) Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanolic extracts of the truffle *Terfezia claveryi* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Med J.* 26(6): 952–955.

83. Gouzi H, Belyagoubi L, Abdelali KN, Khelifi A (2011) In vitro antibacterial activities of aqueous extracts from Algerian desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania*, Ascomycetes) against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Mushrooms* 13(6):553–558
84. Aldebasi YH, Nouh WG, Abdel-Atti NM, Salem-Bekhit MM, Qureshi MA, Aly SM (2012) Comparative pathological studies on the healing effect of natural (*Terfezia clavaryi*) and synthetic (Vigamox) antimicrobial on corneal ulcers in rabbits. *J Pharm Biomed Sci* 2(6): 66–77
85. Dib-Bellahouel S, Fortaz Z (2011) Antibacterial activity of various fractions of ethyl acetate extract from the desert truffle, *Tirmania pinoyi*, preliminary analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *African J Biotech* 10(47):9694–9699. doi:10.5897/AJB 10.2687
86. Stojkovic D, Reis F, Glamoclija J, Ciric A, Nikolic M, Barros L, Ferreira Isabel, Giweli A and Sokovic M (2012) Nutritional value and antibacterial activity of desert truffle *Tirmania pinoyi* (Maire) Malencon (1973) growing wild in Lybia. Proceedings of the International Conference Biological Food Safety and Quality. Belgrade, at <http://hdl.handle.net/10198/7845>. Accessed 2 May 2013
87. W. W. Coblenz: Investigations of Infrared Spectra, Carnegie Institution, Washington 1905, re-published, The Coblenz Society, Norwalk 1962.
88. Günzler, H. and Gremlich, H.-U., “IR Spectroscopy: An Introduction”, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002.
89. H-U. Gremlich, “Infrared and Raman Spectroscopy”, Handbook of Analytical Techniques, Edited by H. Günzler, A. Williams ; Copyright OWILEY-VCH Verlag GmbH, 2001.
90. https://fr.wikipedia.org/wiki/Spectroscopie_infrarouge
91. 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.
92. Griffiths, P. R. and de Haseth, J. A., Fourier Transform Infrared Spectrometry, Wiley, New York, 1986.
93. https://www.google.fr/search?q=michelson+interferometer&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjqRNDQ4_7SAhXCuhQKHaEYCl4Q_AUIBigB&biw=1280&bih=933#imgrc=-BtCCxwKn404IM:
94. Stuart, B., Modern Infrared Spectroscopy, ACOI Series, Wiley, Chichester, UK, 1996. University of Greenwich.
95. Available from Harrick Scientific Corporation, 88 Broadway, Ossining, NY 10562.
96. U. P. Fringeli in F. M. Mirabella (ed.): “Internal Reflection Spectroscopy: Theory and Application”, Marcel Dekker, New York 1992, p. 255.
97. 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.
98. Steve Gillet, D. Sc, Cours de « Chimie Analytique et caractérisation des matériaux », 1^{ère} année Master Sciences de l’Ingénieur Industriel, Haute école Charlemagne.

99. N. B. Colthup, L. H. Daly, S. E. Wiberley: *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 3rd ed., Academic Press, San Diego 1990.
100. 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.
101. N. Benoudjit, E. Cools, M. Meurens, M. Verleysen, « Calibrage chimométrique des spectrophotomètres : sélection et validation des variables par modèles non-linéaires », Université catholique de Louvain.
102. R. Henrion, G. Henrion, « Chemometrics », *Handbook of Analytical Techniques*, Edited by H. Günzler, A. Williams ; Copyright OWILEY-VCH Verlag GmbH, 2001.
103. 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.
104. E. R. Malinowski, D. G. Howery : *Factor Analysis in Chemistry*, Wiley, New York 1980.
105. 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).
106. https://fr.wikipedia.org/wiki/R%C3%A9gression_des_moindres_carr%C3%A9s_partiels
107. M. Tennenhaus, « La régression PLS, théorie et pratique », ed : Technip, Paris.
108. J. el-haddad, « Chimie appliquée à la spectroscopie de Plasma induit par Laser (LIBS) et à la spectroscopie Téràhertz », Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1 ; 2013.
109. 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.
110. H. Martens, T. Naes, « *Multivariate Calibration* », Wiley, 1991.
111. I.S. Helland, On the structure of partial least squares regression, *Communications in Statistics - Simulation and Computation*, 17 (1988) 581-607.
112. Metcalf, R.L. Plant volatiles as insect attractants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 1987, 5, 251-301.
113. 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.
114. Dixon, R.A. Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2004, 55, 225-261.
115. Buchanan, B., Grissem, W., Jones, R., 2000. American Society of Plant Physiologists, chapitre 24, pp 1250-1318.
116. Lobstein, A., 2010. Substances naturelles et pharmacognosie, les alcaloïdes, pp 3-25.
117. 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.

118. 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.
119. D. M. Pereira, P. Valentão, J. A. Pereira and P. B. Andrade, Phenolics: From Chemistry to Biology, *Molecules* 2009, 14, 2202-221, doi:10.3390/molecules14062202 ; ISSN 1420-3049 ; www.mdpi.com/journal/molecules
120. Andrade, P.B.; Pereira, D.M.; Ferreres, F.; Valentão, P.; Recent trends in high throughput analysis and antioxidant potential screening for phenolics. *Curr. Pharm. Anal.* 2008, 4, 137-150.
121. Cushnie, T.P.T; Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2005, 26, 343-356.
122. Haslam, E., 1994. Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Nat. Prod.*, 11, pp 41-66.
123. Yang, C.S.; Landau, J.M.; Huang, M.-T.; Newmark, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* 2001, 21, 381-406.
124. Bruneton J. *Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales*; Éditions Tec & Doc: Paris, France, 1999.
125. Prior, R.L.; Wu, X. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic. Res.* 2006, 40, 1014-1028.
126. Wu, X.; Prior, R.L. Identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: Vegetables, nuts and grains. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 3101-3113.
127. Harborne, J.B. Plant polyphenols – XI. The structure of acylated anthocyanins. *Phytochemistry* 1964, 3, 151-160.
128. Anderson, O.M. Anthocyanin occurrences and analysis. In *Proceedings of the International Workshop on Anthocyanins: Research and Development of Anthocyanins*, Adelaide, South Australia, April 17-19, 2002.
129. Mateus, N.; Oliveira, J.; Pissarra, J.; González-Paramás, A.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C.; Silva, A.M.S.; de Freitas, V. A new vinylpyranoanthocyanin pigment occurring in aged red wine. *Food Chem.* 2006, 97, 689-695.
130. Fortas Z, Chevalier G (1992b) Effet des conditions de culture sur la mycorhization de l'*Helianthemum guttatum* par trois espèces de Terfez des genres *Terfezia* et *Tirmania* d'Algérie. *Can J Bot* 70(12) : 2453–2460

