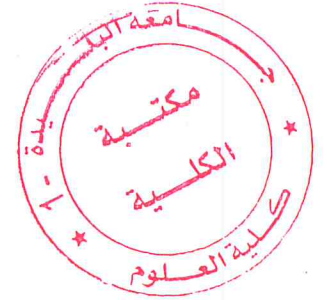


Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique Université BLIDA

Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire présenté par
BOUZIDI Faiza



En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie des Produits Natureles

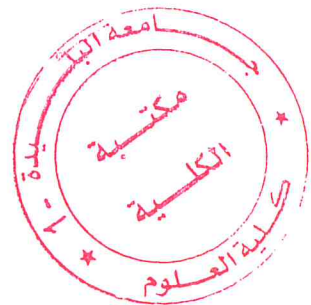
Titre

Etablissement d'un modèle de calibration multivariée
des stérols : Dosage des stérols dans des extraits
d'algues marines

Soutenu publiquement le 04 juillet 2017 devant le jury :

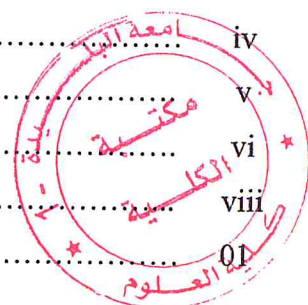
Z. Chemat	MCA	Présidente	Université de Blida
R. Mehdaoui	MCA	Examinatrice	Université de Blida
N. BOUZIDI	MCA	Promotrice	Université de Blida
G. Ziane	MAA	Co/Promotrice	Université de Blida

Promotion 2016-2017



SOMMAIRE

Remerciement.....	i
Dédicace.....	iii
Listes des figures.....	iv
Listes des tables.....	v
Listes d'abréviations.....	vi
Résumé.....	viii
Introduction générale.....	01
Partie I : Partie théorique	
Chapitre 1 : Généralité sur les algues et les stérols	
I- Généralité sur les algues marines.....	03
I-1- Introduction.....	03
I-2-Grandes classes des algues marines.....	03
I-2-1- Algues vertes (Chlorophycées).....	03
I-2-2- Algues brunes (Phéophycées).....	03
I-2-3- Algues rouges (Rhodophycées).....	04
I-3-Distribution des algues.....	04
I-4- Composition des algues et utilisation.....	04
II- Composition stéroliques des algues.....	05
II-1 - Extraction des stérols.....	18
II-1-1- Extraction par solvant.....	18
II-2- Analyse des stérols.....	18
Chapitre 2 : Spectroscopie IRTF	
I- Spectroscopie IRTF.....	19
I-1- Un spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR)	20
I-2- Chimiométrie.....	21
I-3-Calibrage multivariable.....	21
I-4- L'analyse quantitative et l'apport des méthodes chimiométriques au traitement des spectres infrarouges.....	22
I-5- Synthèse des travaux antérieurs sur IRTF-PLS.....	24



Partie II: Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériel et méthodes

I-1 Introduction.....	27
I-2- Matériel et méthodes.....	27
I-2-1- Spectrophotométrie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	27
I-3- Spécificité du logiciel PLS (Quant 2)	28
I-4-Réactifs.....	28
I-5- Spectres IRTF des étalons.....	28
II-5-1- Spectre IRTF des solutions mères préparé directement dans CHCl ₃	29
II-6- Calibration multicomposé.....	29
II-6-1- Optimisation du modèle PLS (Quant 2)	30
II-6-2- Préparation de la matrice de calibration.....	31
II-6-3- Préparation des échantillons synthétiques.....	32
II-6-4- Différentes étapes de l'éditeur de la méthode de Quant 2.....	32
II-6-5- Prétraitements spectraux utilisés dans le Quant 2.....	33
II- Régression des moindres carrées partiels (PLS).....	34
II-1- Type de validation.....	34
II-1-1- Validation croisée.....	34
II-1-2- Test de Validation.....	34
II-2- Stratégies de validation.....	34
II-2-1- Validation interne.....	34
II-2-2- Validation externe.....	34
III- Paramètres analytiques fournis par logiciel PLS.....	35
Chapitre 2 : Résultats et discussions	
I- Construction des modèles PLS.....	36
I-1- Optimisation des différentes régions spectrales.....	36
I-1-1- Modèles construits pour le cholestérol.....	36
I-1-2- Modèles construits pour le dehydrocholestérol.....	37
I-1-3- Modèles construits pour l'acétate de cholestérol.....	38
I-1-4- Modèles construits pour le sitostérol.....	40
I-1-5- Modèles optimums choisis selon la région spectrale.....	40
I-2- Optimisation des différents rangs (facteurs).....	40
I-2-1- Modèles construit pour le cholestérol.....	40

I-2-2- Modèles construits pour le dehydrocholestérol.....	41
I-2-3- Modèles construit pour l'acétate de cholestérol.....	41
I-2-4- Modèles construit pour le sitostérol.....	41
I-2-5- Modèles optimums choisis selon le rang	41
I-3- Modèles PLS choisis.....	41
II- Représentation graphique des paramètres des modèles PLS choisis pour chaque composante.....	49
II-1- Cholestérol.....	49
II-2- Dehydrocholestérol.....	50
II-3- Acétate de cholestérol.....	51
II-4- Sitostérol.....	51
III- Détermination de cholestérol, dehydrocholestérol, acétate de cholestérol, sitostérol dans les échantillons réels par PLS-IRTF.....	52
III-1- Analyse directe des échantillons réels.....	53
III-1-1- Résultats de l'analyse PLS des échantillons réels sans traitement préalable.....	54
III-2- Analyse des échantillons réels après réaction de saponification.....	54
III-2- 1- Procédure générale de la réaction de saponification.....	54
III-2- 1-1- Extraction liquide-liquide.....	55
III-2-2- Résultats d'analyse PLS des échantillons réels après réaction de saponification.....	56
Conclusion	58
Références bibliographiques	60

Remerciement

Avant tout nous remercions « Allah » tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin déjà réusite.

Je tiens à remercier très sincèrement mon promoteur Dr. BOUZIDI. N d'avoir accepté de m'encadrer. Je le remercie pour son aide, ses conseils et ses orientations, sa disponibilité et sa patience. Je le remercie vivement pour le choix du sujet qui est intéressant et d'actualité.

J'adresse mes sincères remerciements à Pr. DAGHBOUCH Y, Je tiens à lui témoigner ma gratitude pour ses encouragements, sa disponibilité, sa patience avec moi, sa gentillesse et ces qualités scientifiques et humaines.

Je remercie également tous les membres de jury pour l'honneur qu'ils me font d'avoir acceptés de juger ce travail.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à tous les professeurs et les enseignants pour leurs efforts et encouragement le long de ce master.

Un grand merci au l'ingénieur du laboratoire de recherche « Chimie De Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) » de l'Université de Blida 1, pour sa disponibilité et son aide précieux dans la réalisation de mon travail expérimentale.

J'adresse également mes sincères remerciements aux deux doctorantes du laboratoire de chimie des substances naturelles et de biomolécule (LCSN-BioM) Melle BENSAMMEN Nachida et Melle BOUNAAS Karima pour leur gentillesse et leur aide dans la réalisation de ce modeste travail.

Mes remerciements s'adressent aussi aux membres du laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules, qui ont mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail.

Je n'oublie surement pas mes collègues et amies qui ont contribué par leur soutien et amitié.

Je ne pouvais finir sans remercier très fortement mes parents, pour leurs aides, leur soutien moral et leurs encouragements. Je leurs exprime toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

Dédicace

Je dédie cet événement marquant de ma vie :

*A celui qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant
que*

la volonté fait toujours les grandes femmes : à ma mère.

A celui qui m'a donné la force : à mon père

A mes chères sœurs et frères

A mon fiancé: Mohamed

A toute ma famille

A mes chères amies

*Et enfin, à tous mes amies et camarades chimistes de
l'équipe « Chimie des Substances Naturelles »*

Liste des figures

Figure 1:	Structure de cholestérol	05
Figure 2 :	Structure de fucostérol	05
Figure 3 :	Protocole générale de l'extraction par solvant	18
Figure 4 :	Protocole générale de l'extraction par solvant	21
Figure 5 :	Schéma représentative de la chimiométrie	22
Figure 6 :	Montage IRTF utilisé pour la détermination des étalons	28
Figure 7 :	Les spectres IRTF des solutions étalons	29
Figure 8 :	Fenêtre d'OPUS Quant 2	30
Figure 9:	Assistant de l'éditeur de méthode Quant 2	33
Figure 10 :	Les étapes de la validation externe	35
Figure 11 :	Représentations graphiques des paramètres analytiques du modèle optimum de cholestérol	49
Figure 12 :	Représentation graphiques des paramètres analytiques de modèle optimum de dehydrocholestérol	50
Figure 13 :	Représentations graphiques des paramètres analytiques de modèle optimum de l'acétate de cholestérol	51
Figure 14 :	Représentations graphiques des paramètres analytiques de modèle optimum de sitostérol	52
Figure 15 :	Spectres IRTF des extraits d'algues et de la solution étalon plus concentrée sans traitement préalable	53
Figure 16 :	Protocole générale de la réaction de saponification	55
Figure 17 :	Protocole générale de l'extraction liquide-liquide	55
Figure18 :	Spectres des extraits et solution étalon plus concentré après réaction de saponification	56

Listes des tables

Tableau I-1:	Stérols d'algues rouges	6
Tableau I-2:	Stérols de quelques espèces d'algues brunes	10
Tableau I-3:	Position systématique d'algues vertes	12
Tableau I-4:	Stérols d'algues vertes	13
Tableau I-5:	Méthodes d'analyse utilisée dans l'analyse des stérols aux différentes espèces	19
Tableau II-1:	Limites de concentrations des étalons utilisées	31
Tableau II-2:	Composition des solutions étalons (matrice de la calibration)	31
Tableau II-3:	Composition des solutions synthétiques	32
Tableau II-4:	Paramètres considérés pour les modèles PLS établis du cholestérol selon la région	36
Tableau II-5:	Paramètres considérés pour les modèles PLS établis du dehydrocholestérol selon la région	38
Tableau II-6:	Paramètres considérés pour les modèles PLS établis du l'acétate de cholestérol selon la région	39
Tableau II-7:	Paramètres considérés pour les modèles PLS établis du sitostérol selon la région	40
Tableau II-8:	Modèles optimums selon la région de chaque étalon	42
Tableau II-9:	Paramètres considérés pour les modèles PLS établis du cholestérol selon le rang	43
Tableau II-10:	Paramètres considérés pour les modèles PLS établis du dehydrocholestérol selon le rang	44
Tableau II-11:	Paramètres considérés pour les modèles PLS établis du l'acétate de cholestérol selon le rang	45
Tableau II-12:	Paramètres considérés pour les modèles PLS établis du sitostérol selon le rang	46
Tableau II-13:	Modèles optimums selon le rang de chaque étalon	47
Tableau II-14:	Modèles optimisés selon le rang et la région	48
Tableau II-15:	Concentrations prédites des étalons dans les échantillons réels sans traitement préalable	54
Tableau II-16:	Concentrations prédites des étalons dans les échantillons réels après réaction de saponification	57

Liste d'abréviations

CG :	Chromatographie gaz
HPLC :	Chromatographie liquide à haute performance
SM :	Spectrométrie de masse
CCM :	Chromatographie sur couche mince
EISM :	Spectrométrie de masse à impact électronique
RMN1H :	Résonance magnétique nucléaire de proton 1
RMN13C :	Résonance magnétique nucléaire de carbone 13
IR :	Infrarouge
CG/SM :	Chromatographie gaz couplé à spectrométrie de masse
CGL :	Chromatographie gaz- liquide
CGL/SM :	Chromatographie gaz- liquide couplé à spectrométrie de masse
T_f :	Température de fusion
[α]_D^T :	Pouvoir rotatoire
CHCl₃ :	Chloroforme
MgSO₄ :	Sulfate de magnésium
CPG :	Chromatographie en phase gazeux
Col, capi :	Colonne capillaire
FID :	Détecteur à inflammation ionique
mm :	Millimètre
ID :	Diamètre intérieur
um :	Micromètre
C18 :	Octadécylsilique
UV :	Ultra-violet
RI :	Indice de réfraction
DAD :	Détecteur à rayon diode
Mob :	Mobile
AcOET :	Acétate d'éthyle
Vinj :	Volume d'injection
N₂ :	L'azote
T :	Température
TMS :	Tétraméthylsilane

Stat :	Stationnaire
IRTF :	Infrarouge à transformer de fourrier
PLS :	Régression des moindres carrés partiels
PCR :	Régression de composant principal
ATR :	La réflexion total atténuée
RMSECV :	Erreur quadratique moyenne de la validation croisée
RMSEE :	Erreur quadratique moyenne du test de validation
RMSEP :	Erreur quadratique moyenne de la prédiction
R² :	Coefficient de corrélation
PF :	La graisse de porc
FB :	La graisse de bœuf

Résumé

Cette étude est consacrée au développement d'une méthode de calibration multicomposé PLS-IRTF pour la quantification et la détermination simultanée des composés stéroliques dans les extraits d'algues.

Pour choisir le modèle de calibration multicomposé, six solutions étalon contenant les quatre analytes (cholestérol, dehydrocholestérol, acétate de cholestérol et sitostérol) à des concentrations différentes sont utilisés.

La calibration a été établie en considérant deux types d'optimisation, le premier selon la région spectrale et le deuxième selon le rang pour différents prétraitements spectraux.

Les résultats de calibrage indiquent que les modèles PLS-IRTF sont adéquats pour la détermination simultanée des quatre analytes en fournissant des faibles erreurs de validation, à savoir : 0.054, 0.098, 0.0768 et 0.0573, des coefficients de corrélation égaux à 99.96, 98.74, 99.49 et 98.4 pour des rangs de 6, 5, 4, 6 dans le cas de cholestérol, de dehydrocholestérol, d'acétate de cholestérol et de sitostérol, respectivement.

L'analyse directe (sans traitement préalable) des extraits d'algues dilués dans CHCl_3 fournit des concentrations prédites qui ne sont pas cohérentes, une réaction de saponification a été réalisée afin d'alléger la matrice. Les résultats obtenus méritent d'être confirmés par d'autres expériences.

Mots clés : PLS, IRTF, Algues, Cholestérol, Dehydrocholestérol, Acétate de cholestérol, Sitostérol.

ملخص

كرست هذه الدراسة إلى تطوير أسلوب معايرة متعددة المكونات IRTF-PLS لتقدير في ان واحد كمية المركبات الستيرولية الكولسترول , ديهيدروكوليسترول, أسيتات الكوليسترول و سيتوستيرول في مستخلصات الطحالب البحرية.

لاختيار نموذج المعايرة متعددة المكونات، تستخدم ستة عشر محلول قياسي حيث يحتوي كل منه على المركبات الأربعة بتركيز مختلفة .

تأسست المعايرة من خلال النظر في كلا النوعين من التحسينات , أولها وفقا للمنطقة الطيفية , الثانية وفقا للمرتبة(المتغير الكامن) و ذلك باستعمال مختلف انواع المعالجة الاولى .

تشير نتائج المعايرة أن النماذج مناسبة لتحديد المركبات الأربعة في ان واحد من خلال توفيرات ضعيفة لأخطاء التصديق على النحو التالي 0.0473,0.0768,0.058,0.054 بمعاملات ارتباط تساوي 99.96, 98.74, 99.49, 98.4 وفق المراتب 4 و 5.6 في حالات الكولسترول , ديهيدروكوليسترول, خلات الكوليسترول و سيتوستيرول على التوالي .

التحليل المباشر (بدون معالجة) لمستخلصات الطحالب المخففة في الكلوروفورم قدمت تراكيز متوقعة ليست متسقة. تفاعل التصبين ضروري من أجل التخفيف من المصفوفة. النتائج المتحصل عليها تحتاج إلى تأكيد بتجارب أخرى.

الكلمات المفتاحية : IRTF, PLS, الطحالب, الكولسترول, ديهيدروكوليسترول, خلات الكوليسترول و سيتوستيرول

Abstract

This study is devoted to the development of a PLS-IRTF multicomponent calibration method for the simultaneous determination of sterol compounds in algae extracts.

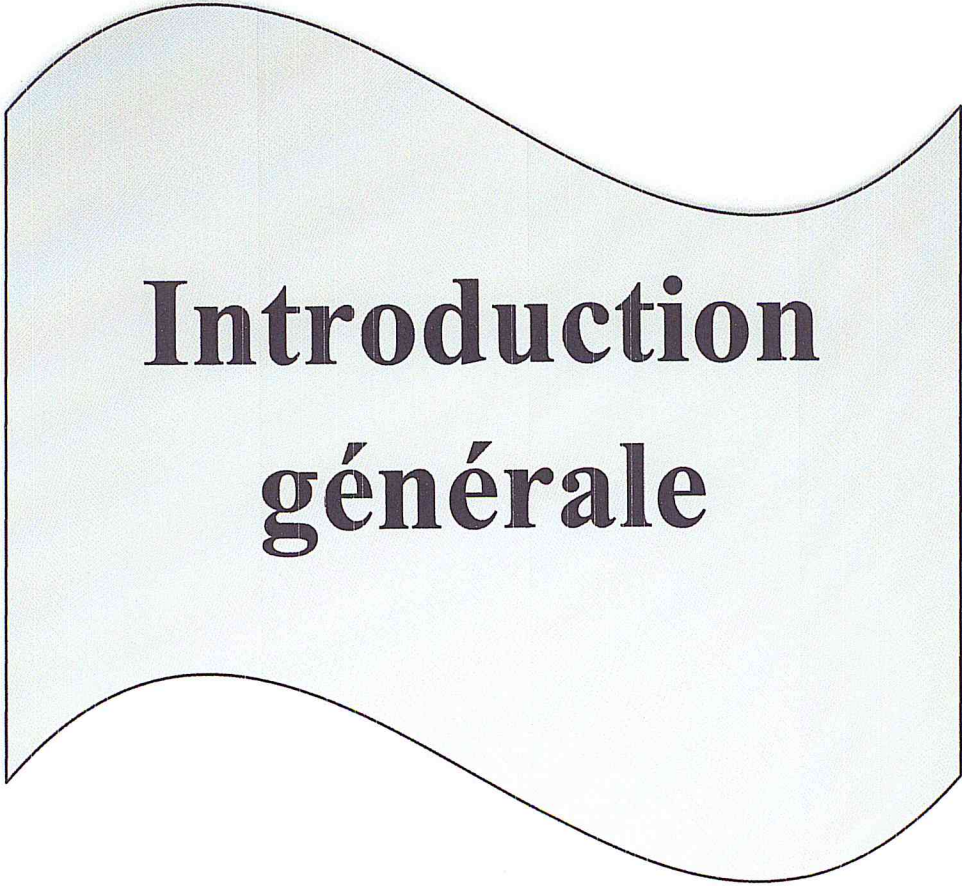
To choose the multicomponent calibration model, size solutions containing the four analytes cholesterol, dehydrocholesterol, cholesterol acetate and sitosterol at different concentrations are used.

The calibration was established by considering two types of optimization, the first according to the spectral region and the second according to the rank for different spectral pre-treatments.

The calibration results indicate that the PLS-IRTF models are adequate for the simultaneous determination of the four analytes by providing low validation errors of 0.054, 0.098, 0.0768 and 0.0573, correlation coefficients equal to 99.96, 98.74, 99.49 and 98.4 for ranks of 6, 5, 4, 6 in the case of cholesterol, dehydrocholesterol, cholesterol acetate and sitosterol, respectively.

Direct analysis (without pre-treatment) of the diluted algal extracts in CHCl_3 provided predicted concentrations which are not coherent; a saponification reaction was carried out in order to lighten the matrix. The results obtained deserve to be confirmed by other experiments.

Key words: PLS, FTIR, Algae, Cholesterol, Dehydrocholesterol, Cholesterol acetate, sitosterol.



**Introduction
générale**

Introduction générale

Introduction générale

Les algues marines constituent une ressource naturelle importante à cause de leur diversité chimique. Elles sont riches en métabolites primaires et secondaires tels que les stérols. Ces derniers sont utilisés dans la classification chimiotaxonomique. Il a été montré que le stérol prépondérant dans les rhodophycées (algues rouges) est le cholestérol, dans les phéophycées (algues brunes) le fucostérol est le stérol dominant. Par contre dans les chlorophycées (algues vertes) il n'existe pas un stérol majoritaire. Parfois il varie au sein de la même famille. Dans la même algue verte, plusieurs stérols peuvent exister avec des pourcentages considérables par rapport à la fraction stérolique.

Le thème de mémoire a porté sur les stérols des algues. L'étude de la composition stérolique nécessite l'isolement et /ou la reconstitution de cette fraction. Les méthodes d'extraction et d'analyse ont été discutées également.

Différentes techniques analytiques sont utilisées dans l'analyse des composés stéroliques dans les extraits d'algues. Néanmoins, la spectroscopie infrarouge a été bien considérée comme un outil utile pour le contrôle de qualité dans diverses applications industrielles depuis quelques décennies. Le développement de la transformée de Fourier a poussé l'utilisation de cette technique et la rendre très employée pour l'analyse d'échantillons de diverses nature, en mélanges. L'intérêt de cette technique réside essentiellement dans sa rapidité et son caractère non destructif. Son utilisation est aussi due aux avancées de l'instrumentation et au développement des méthodes chimiométriques.

L'apparition de la nouvelle méthode de calibration multicomposée a facilité l'exploitation et l'obtention des différents paramètres analytiques de validation en un temps très rapide bien que, le principe théorique de cette méthode d'analyse est assez complexe. La méthode de calibration multicomposée la plus utilisée pour le traitement des données spectroscopiques IRTF est la régression des moindres carrés partiels (PLS). Les travaux réalisés dans ce domaine de recherche (PLS-IRTF) s'intéressent généralement, au développement de modèles dans les différentes zones spectrales de l'infrarouge moyen, et à la détermination simultanée d'analytes dans des matrices complexes.

Le travail entrepris dans le cadre de ce mémoire s'insère dans le large domaine des produits naturels, en se fixant comme objectif l'exploitation pour la première fois

Introduction générale


au sein de notre équipe de recherche de modèles de calibration PLS-IRTF. L'application concerne le développement de modèles pour la détermination des stérols dans les extraits d'algues de différentes classes.

Ce mémoire est réparti en deux chapitres :

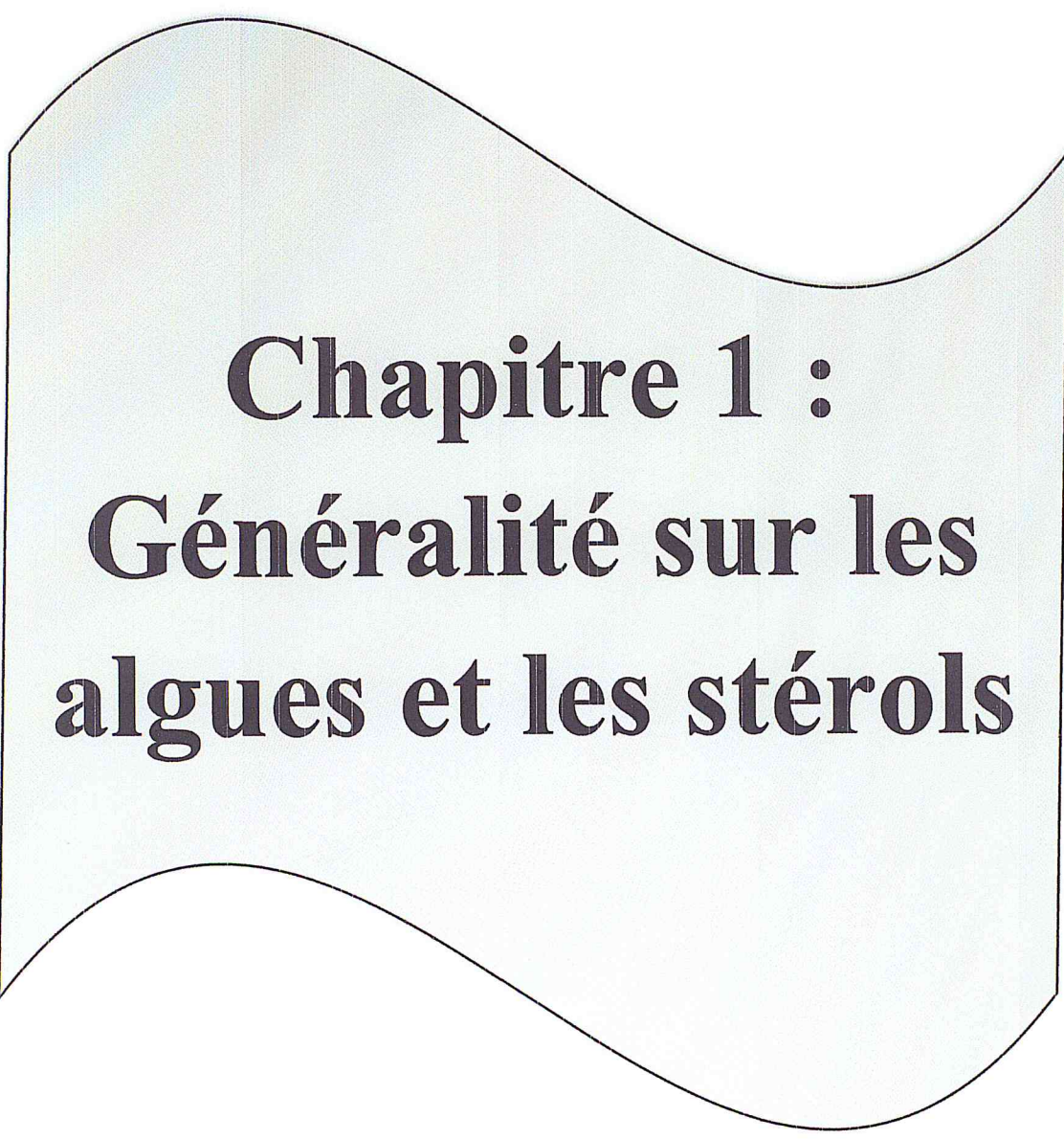
Le premier chapitre contient une partie théorique générale sur les connaissances de base de cette étude suivie d'une synthèse des travaux antérieurs.

Le deuxième chapitre comporte une partie expérimentale qui a pour objet d'une part de sélectionner les conditions opératoires adéquates pour effectuer le travail, et d'autre part d'élaborer des modèles de la calibration multicomposée pour la détermination simultanée des composés stéroliques (cholestérol, dehydrocholestérol, acétate de cholestérol, sitostérol) dans des échantillons d'algues de différentes espèces *Caulerpa taxifolia*, *Cystoseira sedoides*, *Laurencia sp* et *Dictyota dichotoma*.

Enfin, nous avons terminé par une conclusion.



Partie I :
Partie théorique



Chapitre 1 :
Généralité sur les
algues et les stérols

I-Généralité sur les algues marines

I-1-Introduction

L'environnement marin est un écosystème rendu unique en raison de la diversité des organismes qu'il abrite. Parmi ses organismes, les algues qui font preuve d'une incroyable richesse. De nouvelles espèces sont identifiées perpétuellement [1]. Elles ont des formes et des dimensions très variables. Certaines sont microscopiques et d'autres mesurent plusieurs mètres de longueur, mais elles ont toutes des caractères communs. Elles sont essentiellement aquatiques dans les eaux douces ou marines, et certaines vivent sur la neige ou la glace des régions polaires et des hautes montagnes. D'autres au contraire supportent dans les eaux des sources thermales des températures élevées (algues thermophiles) [2].

I-2- Grandes classes des algues marines

Les algues sont classées selon le pigment dominant, Les pigments ont dès le début du 19^{ième} siècle constituent un critère important dans la classification des algues. Le rôle physiologique de ces molécules est de capter l'énergie lumineuse. Selon la nature des pigments surnuméraires associés à la chlorophylle, les plastes sont parfois verts (Chlorophycées), parfois jaunes ou bruns (Chromophytes), ou encore rouges (Rhodophycées) [3].

I-2-1- Algues vertes (Chlorophycées)

Elles sont de formes très variées, uni-ou pluricellulaires. Leurs plastes sont colorés en vert par les chlorophylles a et b, auxquelles sont associés des carotènes et des xanthophylles. La photosynthèse permet la formation d'amidon, comme pour les plantes supérieures, la plupart des algues vertes vivent en eau douce ou en milieu marins, mais certaines espèces peuvent également se développer sur terre. Elles jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux, favorisant ainsi la vie animale [4].

I-2-2- Algues brunes (Phéophycées)

La couleur brune de ces algues résulte de la dominance du pigment xanthophylle, la fucoxanthine, qui masque les autres pigments (chlorophylle a et c, ainsi que le bêta-carotène). Toutes possèdent une structure pluricellulaire, mais leurs

Chapitre1 : Généralité sur les algues et les stérols

dimensions varient depuis les éléments microscopiques jusqu'aux très grands spécimens. La grande majorité des algues brunes sont marines [4].

I-2-3- Algues rouges (Rhodophycées)

Les rhodophycées ou algues rouges forment un groupe très diversifié. Ces algues doivent leur couleur à la présence de plastie rose dans lesquels un pigment rouge, la phycoérythrine, est associé à plusieurs autres pigments dont les chlorophylles. La plupart de ces algues rouges sont pluricellulaires et marines, mais il existe quelques formes unicellulaires et quelques-unes vivent également en eau douce. Les algues rouges sont divisées en deux groupes: celui des Bangiophycées (qualifiées de primitives) et celui des Floridéophycées (plus complexes). Elles se distinguent généralement par leur cycle de reproduction particulièrement complexe [4].

I-3- Distribution des algues

La plupart des algues se développent en milieu aquatique d'eau douce, saline ou saumâtre, mais certaines sont terrestres et sont capables de se développer sur le sol ou sur le tronc des arbres [5]. Dans l'eau, les algues, ainsi que de petites plantes, forment le phytoplancton le zooplancton étant constitué par des animaux et des protistes non photosynthétiques. Certaines algues se développent sur des rochers humides, sur le tronc des arbres (comme la *Pleurococcus*, une chlorophyte), ou sur un sol mouillé (comme la *Nostoc*, une cyanobactérie). D'autres sont des endosymbiotes de protozoaires (Zooxanthelles chez *Paramecium bursaria*), de plantes (*Anabaena* chez *Azolla*, *Cycas*), d'hydriques, de bryozoaires, de mollusques, vers ou coraux chez lesquels elles se développent dans le cytoplasme. Des algues vivent en symbiose avec des champignons pour former les lichens [5].

I-4- Composition des algues et utilisation

La composition chimique des algues est variable, elles contiennent généralement des pigments (chlorophylles, carotènes, xanthophylles), des polysaccharides, des acides gras, des stérols, des dérivés terpéniques, des composés phénoliques et d'autres dérivés. Les algues ont à l'origine de multiples utilisations alimentaire, agronomique, en cosmétiques (antirides), pharmaceutiques, biotechnologiques, en thalassothérapie (retour au milieu original) en médecine douce

Chapitre 1 : Généralité sur les algues et les stérols

ou même en médecine légale également elles servent de modèles originaux pour des études de physiologie de génétique ou de biologie cellulaires [6-8].

II- Composition stérolique des algues

La diversité chimique des lipides marins, spécialement les stérols a été reconnue comme étant une source de biomarqueurs chimiotaxonomiques et phylogénétiques des algues marines [9-10]. Les stérols forment une catégorie importante des lipides. Leur structure est constituée par un système de quatre cycles accolés dont trois cycles à six carbones et un cycle à cinq carbones, appelé noyau multi-cyclique ou noyau stérol. Le plus connu des stérols est le cholestérol qui est présent dans tous les tissus animaux mais est surtout concentré dans le cerveau et la moelle épinière. C'est le précurseur dans la biosynthèse de beaucoup d'autres stéroïdes y compris les acides biliaires et les hormones stéroïdes [11]. Les stérols des algues sont différents des stérols des plantes supérieures et que ceux-ci sont caractéristiques des différentes classes d'algues, voire des familles et parfois même des différentes espèces [12].

L'étude de la composition en stérols d'un certain nombre d'algues marines a été précédemment utilisée à leur chimiotaxonomie. Ainsi chez les algues, le fucostérol caractérise les Phéophycées, le cholestérol les Rhodophycées, alors que les Chlorophycées présentent souvent une composition stérolique complexe sans stérol caractéristique.

Les tableaux I-1 jusqu'à I-4 représentent une revue sur les algues et leur compositions en stérols. Les figures 1 et 2 montrent les structures de cholestérol et fucostérol.

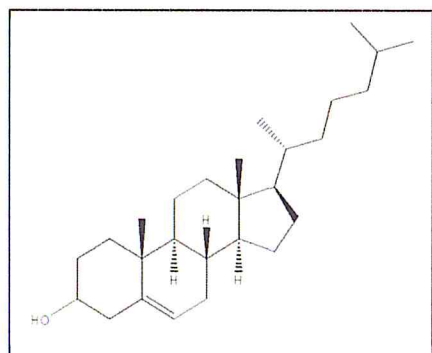


Figure 1 : Structure de cholestérol

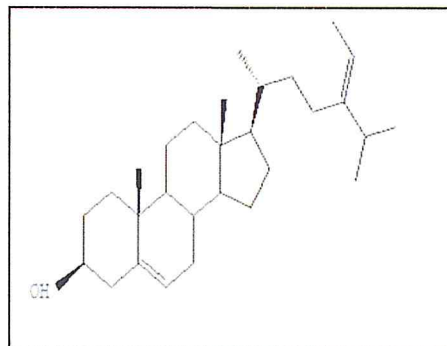


Figure 2 : Structure de fucostérol

Tableau I-1 : Stérols d'algues rouges.

Réf.	Ordre	Famille	Algue	Stérol	Analyse
[13]	Bangiaceae	Bangiaceae	<i>Porphyra purpurea</i>	1, 2, 8	
[14]	Gelidiales	Gelidiaceae	<i>Acanthopeltis japonica</i>	1	
			<i>Gelidium amansii</i>	1	
			<i>G. Japonicum</i>	1	
			<i>G. subcostatum</i>	1	
[15]	Pterocladiales	Pterocladaceae	<i>Pterocladia tenuis</i>	1	
			<i>Pterocladia capillaceae</i>	1(93.7%), 2(2.2%), 3(0.6%), 4(2.5%), 6(0.4%), 10(0.6%)	CG
[14]	Cryptonemiales	Dumontiaceae	<i>Dilsea cearnosa</i>	1	
		Corallinaceae	<i>Corallina officinalis</i>	1	
[15]			<i>Corallina sp</i>	1(89.8%), 2(1%), 3(0.5%), 4(2%), 5(2.3%), 6(1.5%), 7(0.5%), 8(0.4%), 10(0.7%), 11(0.6%)	CG
[14]		Halymeniaceae	<i>Grateloupia elliptica</i>	1	
[16]			<i>Grateloupia turturu</i>	Cholest-5-en-3-ol formate	HPLC, SM, CCM, EISM
[14]			<i>Cyrtymenia sparsa</i>	1	
[15]		Corallinaceae	<i>Jania rubens</i>	1(86.7%), 2(1.4%), 3(1%), 4(1.7%), 5(2.5%), 6(1.9%), 7(1.7%), 8(0.6%), 10(1.2%), 11(0.5%)	CG

Chapitre1 : Généralité sur les algues et les stérols

[14]		Polyidaceae	<i>Polyides caprinus</i>	1		
			<i>P.rotundus</i>	1		
[17]		Gracilariaceae	<i>Gracilaria verrucosa</i>	1		
[14]		Gigartinaceae	<i>Gracilaria edulis</i>	1 (major), 19		SM, RMN ¹ H, IR
			<i>Chondrus crispus</i>	1		
			<i>C.giganteus</i>	1		
			<i>C.ocellatus</i>	1		
			<i>Gigartina stellate</i>	1		
[18]			<i>Gigartina skotisbergii</i>	1, 8		CG, CG/SM
[14]		Plocamiaceae	<i>Plocamium vulgare</i>	1 (86.4%), 2 (2.2%), 3 (0.6%) 4 (2.5%), 6 (0.4%), 10 (0.6%)		GC
		Rhodymeniale	<i>Coeloseira pacifica</i>	1		
		Ceramiales	<i>Ceramium rubrum</i>	1		
[19]			<i>Amanzia glomerata</i>	1, 12		
[15]			<i>Spyridia aculeata</i>	1(79.9%), 2(9.7%), 3(0.2%), 6(1.9%), 4(3.3%), 8(1.3%) 10(1%), 11(1.4%), 5(0.4%)		CG
[16]		Rhodomelaceae	<i>Acantophora spicifera</i>	1		CCM,CG
[19]			<i>Lenormandia prolifera</i>	1, 12		
[20]			<i>Rytiphlea tinctoria</i>	1, 6(63%)		
[14]			<i>Grinnellia americana</i>	1, 8		
		Rhodomelaceae	<i>Laurencia pinnatifida</i>	1		

[15]				<i>L.intricata</i>	1 (87.3%), 2 (3.6%), 3(4.9%), 5 (0.5%), 6 (1.5%), 9(0.3%), 7 (1.1%)	CG
				<i>L.microcladia</i>	1(91.6%), 2(0.9%), 3 (0.6%) 4(1.9%), 5(0.7%), 6(0.6%) , 9 (0.4%)	
				<i>L.obtusa</i>	1 (73.3%), 2 (6.5%), 3(1.5%), 4(6.5%), 6(3%), 7(2.5%), 8(0.9%), 9(0.5%), 10(3.2%), 11(0.5%)	
[21]				<i>L.papillosa</i>	1 (97%), 2, 4, 6, 7, 24 (traces)	CG /SM
[13]	Rhodoméniales		Rhodomeniaceae	<i>Rhodymenia palmate</i>	1, 2, 8	
[14]				<i>Polysiphonia nigrescens</i>	1	
				<i>P.lanosa(fastigata)</i>	1	
				<i>P.subtillissima</i>	1	
			Rhomelaceae	<i>Rhodomeia conféroïdes</i>	1	
			Dasyaceae	<i>Dasya pedicellata</i>	1	
			Rhomelaceae	<i>Chondria dasyphylla</i>	1	
[22]				<i>Chondria armata</i>	1 (12.02%), 12(11.5%), 20 (9%) 21 (6.7%), 22 (4%), 23 (18.02%)	RMN ¹ H, ¹³ C EIMS ,CG/SM
[23]	Nemalionales		Galaxauraceae	<i>Galaxaura marginata</i>	8,17, 27	SM, RMN ¹ H, ¹³ C
[16]			Chaetangiaceae	<i>Galaxaura oblongata</i>	1	CCM, CG
	Bonnemaisoniales		Bonnemaisoniaceae	<i>Asparagopsis armata</i>	*1, 15, 16, 17 *1 (70%), 8 (4%), 2 (7%), 4(5%),	CGL, CGL/SM

Chapitre1 : Généralité sur les algues et les stéroïls

[24,25]					25 (4%), 26 (4%), 7+24(1%), 17(4%)	
[13]	Gigartinale	Areschougiaceae	<i>Falkenbergia rufolanosa</i>		1(81%), 2(4%), 4(1%), 25 (5%), 26 (1%), 7+24 (4%), 17 (3%)	
			<i>Anatheca montagnei</i>		1 (94.2%), 2 (0.2%), 3 (0.4%), 5(1.1%), 6 (0.8%), 7 (0.7%), 8 (2.3%)	CG
			<i>Agardhiella tenera</i>		1 (90.3%), 2 (0.7%), 5 (1.1%), 6 (0.9%), 7 (0.5%), 8 (5.3%), 10 (0.4%)	
[26]	Ceramiale	Rhodomelaceae	<i>Meristotheca</i>		1 (85%), 2 (2.8%), 3 (2.9%), 4 (2.9%), 6 (1.2%), 7(1.3%), 8 (1%), 9 (0.2%), 10 (1.6%).	
			<i>senegalensis</i>		14, 1, 13, 12	CCM,SM, RMN ¹ H, ¹³ C
[16,27]	Goniotrichale	Goniotrichaceae	<i>Melanothamnus</i>			
			<i>somalensis</i>			
			<i>Goniotrichum elegans</i>		4 (majoritaire), 1 (24%)	HPLC,SM,CCM, EISM
[28]	Pyrenomonadale	Pyrenomonadaceae	<i>Rhodomonas</i> sp		1 (1.3%), 28 (98.7%)	
			<i>Proteomonas sulcata</i>		1 (2.7%), 28 (97.3%)	
			<i>Chroomonas placoides</i>		1 (2%), 22 (35.5%), 28 (62.5%)	

Chapitre1 : Généralité sur les algues et les stérols

Tableau I-2 : Stérols de quelques espèces d'algues brunes

Réf.	Algue	Stérol	Analyse
[29]	<i>Sargassum fluitans</i>	7, 1, 12, 2, 6, 29, 30, 31	CCM, CGL, IR
[30]	<i>S. carpophyllum</i>	7, 8, 42, 43, 44, 46	CG/SM
[31]	<i>Stilophora rhizodes</i>	12(73.2%), 7(4.6%), 32(4.6%), 1(11.1%)	
	<i>Punctaria lattifolia</i>	1(76%), 12(6.1%), 32(2.4%), 34(3.5%), 35(2.7%), 36(1.2%)	
	<i>Striaria attenuata</i>	7(16%), 1(22%), 12(18%), 32(16%), 11(6%)	
	<i>Scytosiphon lomentaria</i>	7(76%), 1(2%), 12(15%), 32(3%)	
[32]	<i>Himantalia elongata</i>	7(97.2%), 29(2.6%)	
	<i>Laminaria ochroleuca</i>	7(85.9%), 29(14.1%)	
	<i>Undaria pinnatifida</i>	7(82.9%), 29(16.8%)	
[33]	<i>Fucus vesiculosus</i>	Stérol glucoside	
	<i>Ascophyllum nodosum</i>	7, 12	CCM, CG/SM
[34]	<i>Lessonia sp</i>	7(78.7%), 1(5.4%), 12(10.5%), 37(5.4%)	
[35]	<i>Cystoseira trinodes</i>	7(96.9%), 1(0.7%), 12(1.1%), 4(1.2%)	
[36]	<i>C. abies-marina</i>	7(86.7%), 1(3.2%), 12(10.1%)	
[35]	<i>Hormophysa triquetra</i>	7(72.4%), 1(14.4%), 12(10.4%), 4(2.8%)	
	<i>Padina gymnospora</i>	7(38.4%), 1(21.3%), 12(15.5%), 2(3.4%Z, 7.3%E), 4(10.6%), 9(11.7%)	
	<i>Sargassum denticularum</i>	7(28.1%), 1(43.2%), 12(7.4%), 2(0.6%Z, 5.7E), 37(2.9%), 4(9.6%),	
	<i>Sargassum boveanum</i>	9(2.5%)	
[37]	<i>Laminaria digitata</i>	7(88%), 12(12%)	
	<i>Fucus serratus</i>	7(100%)	
	<i>Ascophyllum nodosum</i>	7(100%)	
[38]	<i>Sargassum furcatum</i>	7(81%), 1(8.7%),	
	<i>Dictyota dichotoma</i>	7(60.3%), 1(14.2%), 6(12.6%)	

	<i>D.mertensii</i>	7(3%), 1(77.6%), 2(5.7%), 6(12.7%)								
[39]	<i>Turbinaria ornata</i>	7, 41, 48								
[40]	<i>Agarum cribosum</i>	1, 7, 8, 12, 42								
[41]	<i>Zanardinia prototypus</i>	7(85%), 1(6%), 12(5%), 10(2%)								
[42]	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	12(48.4%), 39(32%E) et (12.4% Z), 47(4.4%)								
[43]	<i>Padina vickersiae</i>	1(major)								
	<i>P.pavonia</i>	7(> 90%)								
	<i>P.arborescens</i>	7								
		7	1	11	38	10	39	24	40	
[44]	<i>Cystoseira crinita</i>	58.5	11	3.5	18	-	-	-	-	
[45]	<i>C.barbata</i>	61.2	2.4	-	3.7	-	-	-	25.4	
[31]		95.4	2.2	-	-	-	-	-	-	
[46]	<i>Aureoumbra lagunensis</i>	-	14.1	-	-	22.2	35.7	19.2	-	

Chapitre 1 : Généralité sur les algues et les stérols

Tableau I-3 : Position systématique d'algues vertes

Ordre	Nbre de familles	Principales familles	Principaux genres (avec des travaux chimiques)
Cladophorale	2	Cladophoraceae	<i>Cladophora</i>
Prasiolale	1	Prasiolaceae	
Ulvale	5	Monostromataceae	
		Ulvaceae	<i>Ulva</i>
Bryopsidale	5	Bryopsidaceae	<i>Bryopsis</i>
		Caulerpaceae	<i>Caulerpa</i>
		Codiaceae	<i>Codium</i>
		Halimedaceae	<i>Halimida</i>
		Udoteaceae	<i>Avrainvillea, chlorodesmis, penicillus, rhipocephalus, tydemania, udotea</i>
Dasycladale	1	Dasycladaceae	<i>Cymopolia, neomeris</i>
Siphonocladale	3	Siphonocladaceae	
		Valoniaceae	
Chaetophorale	1	Chaetophoraceae	

Les trois premiers ordres contiennent des espèces qui sont principalement marines et qui vivent dans des eaux tempérées. Les noms prasiolales et ulvales sont récents et ont respectivement remplacés les termes plus anciens de schizogoniales et ulotrichales. Par contre, les trois ordres suivants sont exclusivement marins et se trouvent dans les eaux tropicales. Le terme bryopsidales a remplacé celui de caulerpale lequel avait remplacé celui de siphonale. Enfin, l'ordre de chaetophorales renferme des espèces unicellulaires.

Tableau I-4 : Stéroïdes d'algues vertes

Réf.	Ordre	Famille	Algue	Stéroïde	Analyse
[47]	Charales	Characeae	<i>Nitella flexilis</i>	24 (58%), 11 (36%)	
[48]	Cladophorales	Cladophoraceae	<i>Chara vulgaris</i>	24 (39%), 11(54%)	
			<i>Cladophora vagabunda</i>	1(22%)	
			<i>Cladophora fluxuosa</i>	1(18.5%)	
			<i>Cladophora echinus</i>	1(24.7%)	
			<i>Cladophora laetevirens</i>	1(4%)	
			<i>Cladophora rupstris</i>	1(7%)	
			<i>Cladophora densa</i>	1 (5.7%)	
			<i>Cladophora vagabunda</i>	1 et (35.7%) de 7-déhydrocholéstérol	
[49]	Bryopsidales	Codiaceae	<i>Codium fragile</i>	49, 28	CGL; CCM; SM; RMN; IR
[50]	Chlorellales	Chlorellaceae	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	37 ^a	
	Sphaeropleales	Scenedesmaceae	<i>Scenedesmus obliquus</i>	66 ^a ($\Delta^{7,22}$ -diène 3-ol)	

Chapitre 1 : Généralité sur les algues et les stérols

[51]	Ulvale	Ulvaceae	<i>Ulva lactuca</i>	1 (0.260µg/mg d'extrait brute)	CCM, CG
[52]	Siphonocladale	Siphonocladaceae	<i>Dictyosphaeria cavernosa</i>	37 ^p (27.5%)	CCM, CG/SM
[53]	Chlorosphaerale	Coccomyxaceae	<i>Coccomyxa elongata</i>	24	RMN du ¹ H et ¹³ C
[54]	Bryopsidale	Ulvophyceae	<i>Caulerpa taxifolia</i> (voir p224 pour les autres algues)	24*, 1, 6, 12, 7	HPLC
[55]	Bryopsidale Ulvale	Codiaceae Ulvaceae	<i>Codium fragile</i> <i>Ulva pertusa</i>	50, 1, 12, 11	CCM, CC, CG/SM, RMN
[56]	Charale	Charophyceae	<i>Chara buckellii</i> <i>Chara australis</i> <i>Chara vulgaris</i> <i>Nitella translucens</i> <i>Nitella flexilis</i> <i>Nitellopsis obtusa</i> <i>Lamprothamnium papulosum</i>	1 12 10 67 24 11 2 1 1 3 33 6 4 2 1 8 84 Tr tr Tr - - 83 - 17 - - - 83 - tr 5 - tr 58 36 25 - - 35 40 12 - 10 17 60 -	CG, CG/SM
[57]	Ulvale	Ulvaceae	<i>Ulva lactuca</i>	2	
[58]	Sphaeropleale	Scenedesmaceae	<i>Scenedesmus obliquus</i>	32	T _i , [α] _D ^T
[59]				1 6 24 4 10 52 53 54 55 56	

Chapitre1 : Généralité sur les algues et les stéroïls

Chlorellale		Chlorellaceae	<i>Dictyosphaerium pulchellum</i> H.C.Wood	90	1	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CG, CG/MS
Sphaeropleales		Scenedesmaceae	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	65	17	-	-
Ulvale		Ulotrichaceae	<i>Ulothrix zonata</i> (F.Weber & Mohr) Kützing	7	23	12	1	-	41	16	-	-	-	-	-	-	-	-
Chlamydomonadale		Volvocaceae	<i>Eudorina unicocca</i> G.M.Smith	27	4	-	-	22	-	-	-	32	-	-	-	15	-	-
[60]				2	1	8	4	51	12	47	9	50	24	51	7	11	-	-
Ulvale		Ulvaceae	<i>Enteromorpha clathrata</i> (Roth) Greville	0.2	1.5	-	-	-	1.4	1.2	0.4	-	1.2	-	-	94.1	-	-
			<i>Enteromorpha linza</i> (Linnaeus) J.Agardh	0.7	9.4	-	0.3	-	0.5	-	-	0.2	0.3	-	-	88.6	-	-
			<i>Ulva fasciata</i>	0.6	7.5	-	0.5	-	0.7	0.6	0.3	-	3.5	-	0.8	85.5	-	-
			<i>Ulva lactuca</i> (Linnaeus)	0.6	7.7	-	0.2	0.9	0.8	-	0.3	0.6	5.4	-	0.4	83.1	-	-
			<i>Ulva popenguinensis</i> (P.J.L.Dangeard, nom. Inval).	0.7	41.2	-	1.6	-	1.2	1.1	0.4	-	3.8	-	2.4	47.6	-	-
Cladophorale		Cladophoraceae	<i>Cladophora vagabunda</i> (Linnaeus) Hoek	0.3	5.7	-	0.3	-	13.5	2.5	-	3.4	55.8	-	-	18.5	-	-
Bryopsidale		Bryopsidaceae	<i>bryopsis plumose</i>	0.4	4.0	0.4	0.3	-	1.8	1.9	-	1.9	88.3	-	-	1.0	-	-
		Caulerpaceae	<i>Caulerpa racemosa</i>	2.7	13.1	-	2.0	-	2.1	1.7	0.5	2.9	58.1	-	16.9	-	-	-

Chapitre 1 : Généralité sur les algues et les stéroïdes

			(Forsskål) J. Agardh		0.6	0.7	-	14.9	0.4	-	80.9	0.4	1.6	-	0.5	
[61]	Chlamydomonadales	Chlamydomonadaceae	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	58, 68 convertir en desmostérol	0.6	0.7	-	14.9	0.4	-	80.9	0.4	1.6	-	0.5	
[62]	Sphaerothecales	Scenedesmaceae	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Stérol glucoside et stérol glucoside estérifié												
[63]	Sphaerothecales	Hydrodictyaceae	<i>Hydrodictyon reticulatum</i> Roth, 1797	24, 6												
[64]	Chlorellales	Oocystaceae	<i>Oocystis polymorpha</i>	1, 69, 70, 66, 71												
[65]	Ulvales	Ulvaceae	<i>Enteromorpha intestinalis</i> <i>Ulva lactuca</i>	11, 62, 63, 64, 65 11						CGL						CGL
[49]	Bryopsidales	Codiaceae	<i>Codium fragile</i>	50, 49												
[66]					2	1	4	49	12	50	24	11				
	Cladophorales	Cladophoraceae	<i>Cladophora laetevirens</i>		-	24.7	23.6	-	30.9	-	20.7	-				
			<i>Chaetomorpha aurea</i>		tr	30	10.2	-	32.7	-	27	-				
	Bryopsidales	Caulerpaceae	<i>Caulerpa prolifera</i>		-	9.3	tr	-	5.2	-	85.5	-				
		Bryopsidaceae	<i>Bryopsis plumosa</i>		tr	10.7	3	-	4	-	82.2	-				
			<i>Bryopsis muscosa</i>		tr	7.3	2.9	-	4	-	85.7	-				
		Udoteaceae	<i>Udotea petiolata</i>		tr	6.2	2.5	-	4	-	81.9	5.2				
		Codiaceae	<i>Codium vermilara</i>		-	tr	-	tr	tr	75.7	24.2	-				
	Siphonocladales	Dasycladaceae	<i>Dasycladus vermicularis</i>		tr	13.9	3.1	-	5.1	-	77.8	-				

Chapitre1 : Généralité sur les algues et les stérols

		Polyphysaceae	<i>Acetabularia mediterranea</i>	-	14.1	2.2	-	7.6	-	76	-
[67]	Chlorellale	Oocystaceae	<i>Oocystis marsonii</i>	9,8, 24, 39							
		Chlorellaceae	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	2, 4, 8, 10, 72							
			<i>Chlorella emersonii</i>	66, 71, 73, 74							
	Sphaecopleale	Selenastraceae	<i>Ankistrodesmus braunii</i>	66, 71, 74							
[68]	Bryopsidale	Codiaceae	<i>Codium iyengarii</i>	47, 74							RMN ¹ H, ¹³ C
			<i>Codium decorticans</i>	50							
[69]	Charale	Charophyceae	<i>Chara globularis</i>	1 (2%), 11 (3%), 24* (86%), 4 (3%), 10 (3%)							CG/SM
[70]	Chorellale	Chorellaceae	<i>Chlorella sp</i>	1(2.5%), 66 ^{tr} , 71							
			<i>Chlorella vulgaris</i>	37(41.7%), 76(13.5%), 77(13.2%)							

*: sterol majoritaire, tr:sterol principal.

1 : cholesterol, 2 :22-dihydrocholesterol, 3 :cholestanol, 4 :brassicasterol, 5 : Cholest-7-én-3ol, 6: 24-methylcholesterol, 7: Fucostérol, 8: Desmostérol, 9:Poriferastérol, 10:Stigmastérol, 11:isofucostérol, 12:24-méthylènecholestérol, 13:7-oxo-cholestérol, 14:24-nor-cholest-5én-3, 7-dione, 15: Stigmasta-5,28-diene-3β,24β-diol, 16: Cholesta-5,23-diene-3β,25-diol, 17: Cholesta-5,25-diene-3β,24β-diol, 18: Nonosterol, 19: 5α-poriferast-9(11)-en-3β-ol, 20: 23-methylcholesterol, 21:23-méthyl-5α-cholestan-3β-ol, 22:24β-ethylcholest-5,22-diene-3β-ol, 23:24β-ethylcholesterol, 24:Sitosterol, 25:25-hydroxycholesterol, 26:25-hydroxy-24-méthylcholesterol, 27:24(R/S),25-epoxycholesterol, 28 :24-méthylcholesta-5,22^E-dien-3β-ol, 29:24-ethylcholesterol; 30:24-méthyl-trans-22-déhydrocholesterol;31:24-ethyl-trans-22-déhydrocholesterol;32:24-ethylcholest-5en-3β-ol;33:24-méthylcholesta-4,24(28)dien-3-one;34:24-méthylcholest-24(28)-en-3βol ; 35 :5α-cholest-7-en-3βol, 36 :24-méthylcholesta-5,22-dien-3β-ol,37 :Ergostérol,38 :27-méthylcholesta-5,24(28)-dien-3β-ol, 39 :24-propylidenecholesterol, 40:24-ethylcholesta-5,22-dien-3β-ol, 41 :29-hydroperoxy-stigmasta-5,24(28)-dien-3β-ol, 42 :Saringostérol, 43 :3β,28xi-dihydroxy-24-ethylcholesta-5,23Z-diene,44 :24-ethylcholesta-4,24(28)-dien-3,6-dione,45 :24-ketocholestérol,46 :24R,28R/24S,28S-epoxy-24ethylcholestérol, 47:Dihydrobrassicastérol, 48 : 24-hydroperoxy-24-vinylcholestérol, 49: codistérol, 50: clérostérol, 51: poriféranol, 52: 24-méthylcholesta-5,24(28)-dien-3-β-ol, 53: 24-ethylcholesta-5,24(28)Z-dien-3β-ol, 54: 24-méthylcholest-7-én-3β-ol, 55: 24-ethylcholesta-7,22E-dien-3β-ol, 56:24-ethylcholest-7-en-3β-ol, 57:(24S)-24ethyl-3-oxocholesta-4,25-dien-6β-ol, 58:(24S)-24-ethyl-5α-hydroperoxycholesta-6,25-dien-3β-ol, 59: (24S)-24-ethyl-7-oxocholesta-5,25-dien-3β-ol,60:(24S)-24-ethyl-7α-hydroperoxycholesta-5,25-dien-3β-ol,61:(24S)-24-ethylcholesta-5,25-dien-3β-ol,62:cycloartenol, 63:24-méthylcycloartenol, 64:24-ethylidenephenol, 65:24-méthylènephenol, 66:chondrillasterol, 67:24-ethylcholesta-8,24-diene-3β-ol, 68:28-époxyergost-5-én-3-ol,69: Δ^{7,22}-ergosterol, 70: Δ⁷-ergosterol, 71:Δ⁷-chondrillasterol, 72 :Ergost-7-énol,73:Ergost-7,22-dienol, 74 :Ergost-7-énol, 75:3-O-β-D-galactopyranosyl-stigmasta-5,25-diene, 76:24β-ethylcholesta-5,7,22-trien-3β-ol, 77 :5-dihydroergostérol, tr: traces.

-les pourcentages des stérols sont donnés entre parenthèses.

II-1- Extraction des stérols

Différentes techniques ont été utilisées dans l'extraction de stérol à partir de divers matrices. L'extraction par solvant ou mélange de solvant est la plus utilisée. L'isolement des stérols totaux nécessitent souvent une réaction de saponification. Préconcentration des stérols peut être effectuée extraction liquide-liquide ou bien par extraction en phase solide en utilisant des cartouches d'extraction [71,72].

II-1-1-Extraction par solvant

La figure 3 représente le protocole général de l'extraction par solvant.

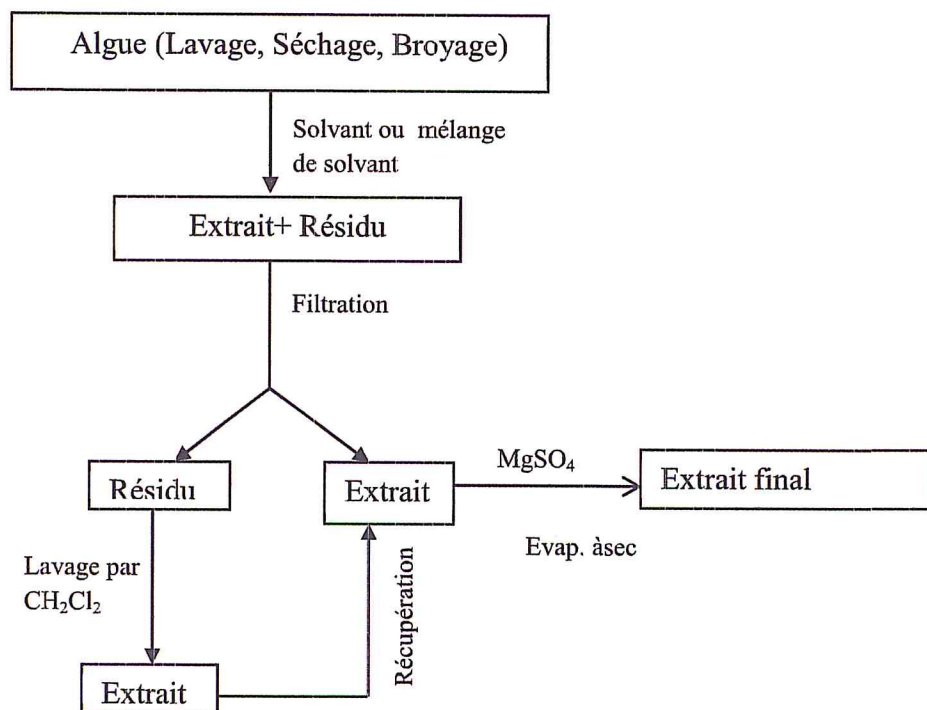


Figure 3 : Protocole générale de l'extraction par solvant [52].

II-2-Analyse des stérols

Les analyses sur les lipides en général, et les stérols en particulier ont connu d'énormes progrès avec le développement des techniques chromatographiques, chromatographie sur couche mince (C.C.M.), chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectromètre de masse (CPG/SM) et également l'application d'autres techniques spectroscopiques telles que : l'infrarouge (IR) et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Il est donc possible d'identifier les stérols dans un mélange [73].

Le tableau I-5 montre les détails sur les méthodes d'analyse des stérols.

Chapitre 1 : Généralité sur les algues et les stérols

Tableau I-5 : Méthodes d'analyse des stérols dans différentes espèces

Produit isolé	Technique utilisée	Conditions	Type d'analyse	Réf
Algue rouge	IRTF	Col C ₁₈ , Solvant : CH ₂ Cl ₂	Quantitative	[71]
	HPLC	Mode isocratique, phase mob (2,2,4-triméthylpentane/acétate d'éthyle). Col de DSC-18, Solvant : EtACO. Vinj : 1000 ul		
7 espèces d'algues vertes	CG/SM	Col, cap à 30m *0,25mm, Four de 50- 280° à 5°C. min ⁻¹	Quantitative	[49]
9 espèces d'algues	CG	Détecteur : FID, Col de 5mm*1m Gas vecteur : N ₂ à débit de 30ml/min, T de l'injecteur et détecteur à 250-300°C.	Quantitative	[52]
Différentes espèces d'algues	RMN	RMN ¹ H DEPT : T de four à 25°C Solvant référence TMS, RMN ¹³ C	Structurale	[74]
12 Rhodophytes	CG	Col, capi à silice OV.1 (ép du film 0,40um, 25m*0,32 mm ID) ou OV.17(ép du film 0.40um, 25m*0.32mm) ,T de four à 270°C	Quantitative	[15]
Algue brune	CG/SM	Col, capi SPB-50 (30m*0.32mm i.d ,ép de film à 0.25um), Gas vecteur : He, Programmation de T de four(270-290°C à 4°C/min, 290°C à 20min).	Quantitative	[75]
	CG	Col, capi HP-5(23m*0.2mm, ép de film 0.5um), T a programmé à 100-315°C ,5°C /min, à 315°C pendant 10min. Tension d'ionisation 70 eV. Ou Col, capi SPB-50. Détecteur : FID.		
	CCM	Gel de silice G. Solvant : éther de pétrole /acétone (10 :1).		



Chapitre 2 :
Spectrométrie
IRTF

I- Spectroscopie IRTF

La spectroscopie, ou spectrométrie, est l'étude expérimentale du spectre d'un phénomène physique. Les techniques spectrométriques permettent l'analyse de rayonnement électromagnétique de toutes les gammes de fréquence ou longueur d'onde. Le domaine de la spectroscopie IR est compris entre le visible et les micro-ondes, l'infrarouge se subdivise en trois parties : le proche infrarouge situe entre 13 000 et 4 000 cm^{-1} , l'infrarouge moyen se situe entre 4 000 et 200 cm^{-1} , et l'infrarouge lointain se situe entre 200 et 10 cm^{-1} [76]. La spectroscopie infrarouge est basée sur l'étude des interactions entre la matière et un rayonnement électromagnétique. La spectroscopie est une méthode analytique quantitative permettant de mesurer l'absorbance d'une substance chimique, généralement en solution, à une longueur d'onde prédéfinie. Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert.

I-1-Un spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier

Dans ce type d'appareillage, le faisceau infrarouge provenant de la source est dirigé vers l'interféromètre de Michelson qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Dans l'interféromètre le faisceau arrive sur la séparatrice. La radiation de la source est alors divisée en deux faisceaux par un séparateur de faisceaux. Un des faisceaux parcourt un chemin optique fixe, l'autre un chemin optique de longueur variable à cause d'un miroir mobile, avant d'être recombinaisonnés, de traverser l'échantillon et de frapper le détecteur. Quand la différence de chemin optique entre les faisceaux correspond à un multiple entier de la longueur d'ondes d'une bande, on obtient une interférence constructive. Une interférence négative est obtenue lorsque la différence correspond à un multiple entier impair du quart de la longueur d'onde. L'ensemble de ces interférences positives et négatives transmises à travers un signal complexe produit un interférogramme à partir duquel le spectre est calculé par transformée de Fourier. L'avantage de ce dispositif est d'avoir accès instantanément à la densité optique pour toute une gamme de longueurs d'ondes. D'autre part ce type d'appareil permet d'avoir une résolution spectrale et une précision spectrale élevées, de travailler avec des signaux faibles et d'obtenir le spectre rapidement et avec un bon rapport signal sur bruit. En regard des différentes réponses de la matière à l'excitation par un rayonnement IR, nous avons utilisé dans cette étude deux modes de spectrométrie IR [77]. La figure 4 montre le principe de l'analyse par spectroscopie d'absorption infrarouge.

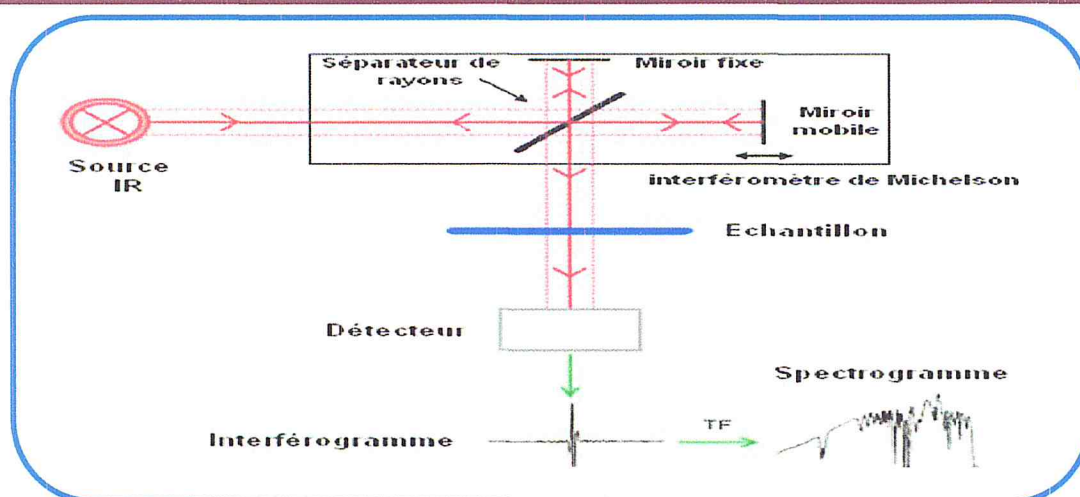


Figure 4: Schéma de principe de l'analyse par spectroscopie d'absorption infrarouge

I-2-Chimiométrie

La chimiométrie est un outil utilisé afin d'extraire de l'information pertinente et utile à partir de données physicochimiques mesurées ou connues brutes. Il est basé sur la construction, puis l'exploitation d'un modèle de comportement à l'aide d'outils statistiques. Il peut traiter des systèmes complexes et donc généralement multivariés [79].

Le terme chimiométrie vient de l'anglais « chemometrics », jeune discipline associant initialement analyse de données et chimie analytique. Aujourd'hui, il recouvre l'ensemble des applications de la chimie, de la physique, des sciences de la vie, de l'économie, de la sociologie, des méthodes statistiques et de l'informatique.

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux applications originelles de la chimiométrie dans le domaine de la chimie analytique, et plus particulièrement des multicateurs ou capteurs multivariés [80].

La chimiométrie (ou analyse multivariée) en instrumentation consiste à modéliser les variations d'un certain nombre de variables, que nous appellerons Y variables dont l'obtention est délicate (nécessitant une analyse chimique par exemple) en fonction d'autres variables appelées X variables mesurables facilement (mesure de capteurs physiques par exemple) afin de pouvoir se passer ultérieurement de l'obtention des premières.

On distingue 2 opérations:

- **L'étalonnage** en laboratoire où toutes les mesures de variables doivent être réalisées et où le modèle (ou prédicteur) est calculé. Attention, ce terme se traduit en anglais par calibration, à ne pas confondre avec le calibrage d'un instrument qui est le recalage à l'aide d'un ou deux mesurages.

- La **prédiction**, utilisation courante sur le terrain, où seules les variables X faciles sont mesurées, les autres, Y, étant calculées à l'aide du modèle. La figure 5 représente schéma de la chimiométrie.

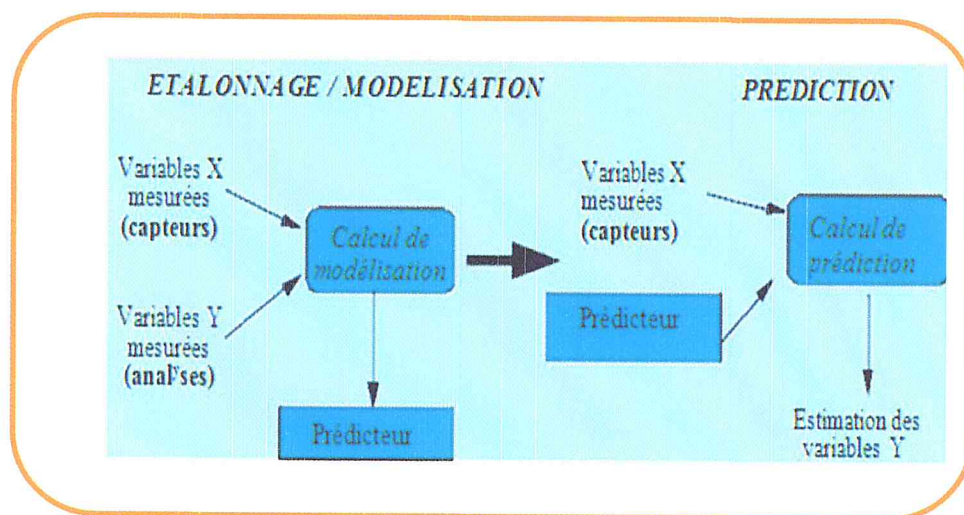


Figure 5 : Schéma représentative de la chimiométrie [81].

I-3-Calibrage multivariable

Le calibrage multivariable est l'application la plus réussie de la combinaison du chemiometrie avec des données spectrales. Un certain nombre de livres classiques sur le calibrage multivariable existe avec une majorité d'exemples des données spectroscopiques [78].

Le calibrage consiste à établir un rapport entre une propriété de produit chimique, biologique ou physique désirée d'un échantillon et de son spectre. C'est une prolongation de la loi de « beer » donnant un rapport univariable entre l'absorbance et la concentration.

I-4- L'analyse quantitative et l'apport des méthodes chimiométriques au traitement des spectres infrarouges

Comme nous l'avons vu, le développement des techniques spectroscopiques IR quantitatives est dû aux possibilités offertes par l'IRTF associées au développement permanent des systèmes informatiques. La qualité des analyses quantitatives a beaucoup progressé en raison d'une meilleure précision des appareils (spectre acquis numériquement, bonne linéarité sur un large domaine). C'est cette numérisation des spectres qui autorise l'emploi de toutes les techniques d'analyse de données rendues possibles par l'offre logicielle

Chapitre 2 : Spectrométrie IRTF

actuelle. A noter qu'avec cette numérisation les possibilités de traitements correctifs des spectres (correction de la ligne de base, dérivée d'ordre 1 à 3.) sont nombreuses [82].

Ces méthodes chimiométriques permettent l'analyse multicomposante et l'exploitation de la plus grande partie de l'information sans émettre d'hypothèses trop restrictives sur le plan de la théorie spectrale. En amont, elles permettent l'optimisation des essais en garantissant la qualité spectrale recueillie. En aval, dans le cas des analyses quantitatives, elles permettent la description des données sous forme synthétique (moyennes, variances...) et la quantification des résultats (méthodes prédictives) à l'aide des méthodes de régression permettant la compression des données comme la régression en composantes principales (PCR) et la méthode des moindres carrés partiels (PLS).

Nous concevons alors mieux l'importance de ces méthodes dans l'extraction de l'information quantitative contenue dans les spectres IR, dans la mesure où les spectromètres IRTF génèrent rapidement une multitude de données spectrales que les spectroscopies ont du mal à traiter.

Il a été proposé plusieurs méthodes pour le calibrage multivariable, il s'avère que plusieurs de ces méthodes ne s'exécutent que pareillement pour éviter la confusion due à l'utilisation de beaucoup de différentes méthodes :

- 1-Régression linéaire multiple (MLR) [83].
- 2-Régression de composant principal (PCR) [84].
- 3-Régression de racine latente (LRR) [85].
- 4-Régression des moindres carrés partielle (PLS) [86].
- 5-Régression inverse découpée en tranches (SIR) [87].
- 6-Régression de continuum (CR) [88].
- 7-Régression localement pesée (LWR) [89].
- 8-Régression principale de covariates (PCovR) [90].

La régression des moindres carrés partielle est, elle consiste à construire les matrices de changement de base et de prédiction en utilisant conjointement les absorbances et les concentrations.

Nous n'expliquerons que très schématiquement l'algorithme le plus simple (dit « non orthogonal ») pour une seule composante (PLS1). Pour une explication plus complète ou pour l'algorithme avec plusieurs composantes (PLS2), on se reportera à la littérature [91].

Chapitre 2 : Spectrométrie IRTF

La régression PLS présente l'avantage de traiter les spectres entiers sans pour autant être obligé de connaître la composition totale des échantillons d'étalonnage. Il suffit de connaître la concentration de l'élément recherché, les autres sont implicitement prises en compte. Le fait de travailler sur les spectres entiers améliore la précision de la prédiction et permet de tenir compte de la ligne de base. On peut d'autre part visualiser les spectres estimés par le modèle, et surtout les résidus, afin de vérifier les zones spectrales mal prises en compte par le modèle ou pour identifier les spectres aberrants. Par ailleurs la régression PLS n'est pas gênée par la colinéarité entre les variables, ce qui est le cas en de nombreux endroits d'un spectre, puisque les composantes sont orthogonales entre elles. De plus, en dépit du fait qu'il s'agisse d'une technique linéaire, elle est capable de modéliser certains non linéarités entre les intensités spectrales et la concentration. Enfin, la régression PLS garde dans une certaine mesure des performances en présence de bruit réduit lors de la compression des données et/ou d'interférences spectrales.

Le modèle est en général d'un simple modèle additif du premier degré dont les coefficients sont estimés par la méthode des moindres carrés partiels. Ce modèle qui doit représenter le mieux possible la réalité est de bonne qualité s'il est robuste, à une bonne validité et une bonne prédictivité. Pour qu'un modèle soit robuste, il doit tenir compte de toutes les variabilités qu'il est possible d'avoir au cours de l'analyse (lieu, température, opérateur...). De nombreux facteurs influent les qualités du modèle à savoir largeur de bande, fenêtre spectrale, la résolution [92-93].

I-5-Synthèse des travaux antérieurs portés sur IRTF-PLS

Différents travaux ont été menés en utilisant le PLS-IRTF et en s'intéressant d'un côté aux régions spectrales de mesure dans les différentes zones de l'infrarouge et d'autre côté aux matrices ciblées.

- D'après Y.B.Che man et al [94] :

L'objectif de cette étude est d'étudier l'utilisation de la spectroscopie IRTF pour détecter la présence potentielle du saindoux (la graisse de porc) en chocolat et des produits de chocolat disponibles sur le marché, se concentrant sur l'addition du saindoux au beurre de cacao, comme ingrédient principal dans la formulation de chocolat, et pour une détermination quantitative de saindoux.

Chapitre 2 : Spectrométrie IRTF

- D'après Sergio Armenta et al [95] :

Ce travail porte sur la surveillance de la fermentation du nectar de pomme de pin par ATR-IRTF et l'analyse multivariée. Un modèle classique de la forme 4^2 a été conçu et utilisé pour le calibrage. Le domaine spectral s'étend de 907 à 1531 cm^{-1} a été sélectionné. Un prétraitement spectral consistant à l'utilisation de la 1^{ère} dérivé avec un centrage moyen des données infrarouges. Les erreurs de racine carrée moyenne du calibrage (RMSEC) de 0.040, 0.021, 0.063 et 0.074% ont été obtenues pour le glucose, fructose, saccharose et l'éthanol, respectivement. Des valeurs d'erreur relative moyenne de validation de 2.9, de 2.1, de 2.6 et de 3.6 ont été trouvées pour le glucose, le fructose, la saccharose et l'éthanol respectivement. Les résultats obtenus par cette méthode à différents niveaux de fermentation ont été comparables à ceux obtenus par une méthode spectrométrique de référence. Ainsi, la spectrométrie IRTF fournit une alternative rapide à de longues et pénibles procédures classiques à la détermination d'éthanol et à l'analyse enzymatique de sucre.

- D'après Iwona Scibisz et al [96]:

L'objectif de cette étude était d'étudier la possibilité de prévoir les paramètres de qualité de la tomate par spectroscopie infrarouge. Pendant deux années, des échantillons de tomate, représentant une grande variabilité dans la composition chimique, ont été analysés par ATR-IRTF dans la région spectrale entre 4000 et 400 cm^{-1} . Durant la 1^{ère} année, des modèles de calibrage PLS ont été développés en considérant la validation interne des échantillons. Par la suite une optimisation des modèles a été réalisée selon différentes zones spectrales et différents prétraitements. Les résultats obtenus des coefficients de détermination importante avec de faibles erreurs de prédiction. La spectrométrie infrarouge est alternative pour la détermination des paramètres de la tomate.

- D'après A. Rohman et al [97].


Cette étude a été visée pour développer une technique rapide et non destructive pour la détection et la quantification du porc dans les boulettes de la viande du bœuf en utilisant la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et la régression des moindres carrés partielle (PLS). Les bandes spectrales liées à la graisse de porc (PF), la graisse de bœuf (FB) et leurs mélanges dans la formulation de boulette de viande ont été analysés, interprétés, et identifiés en les rapportant à ceux représentant au PF et au FB purs. Pour l'analyse quantitative, la régression de PLS a été employée pour

Chapitre 2 : Spectrométrie IRTF

développer un modèle de calibrage dans la région d'empreinte digitale sélectionnée de 1200-1000 cm^{-1} . L'équation de la calibration obtenue de la relation entre la valeur réelle de PF et les valeurs prédites par IRTF est $y=0.999x+0.004$, avec un coefficient de détermination (R^2) et une erreur quadratique moyenne de calibration (RMSEC) de 0,999 et 0,442, respectivement. Le modèle de calibrage de PLS a été plus tard employé pour la prédiction des échantillons indépendants. En utilisant les échantillons de boulettes de viandes faites par le laboratoire contenant les mélanges du FB et du PF, et en considérant 4 composants principaux, l'erreur quadratique moyenne de validation (RMSEV) est de 0,742. Les résultats ont prouvé que la spectroscopie d'IRTF peut être employée pour la détection et la quantification du porc dans la formulation de boulette de viande de bœuf pour la vérification halal.



Partie II :
Partie
expérimentale



**Chapitre 1:
Matériel et
méthodes**

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

I-1-Introduction

La chimiométrie est une méthode analytique assez nouvelle, mais elle a déjà eu un impact énorme sur le terrain spectroscopique, à un point tel que le logiciel de chimiométrie est aujourd'hui intégré avec l'instrumentation en tant que norme de développement [98].

L'objectif principal de ce travail a été l'utilisation d'un logiciel Quant 2 d'OPUS pour développer une méthode de calibration multicomposé (PLS-IRTF).

Dans cette étude, nous allons optimiser les différents paramètres analytiques ainsi que les conditions opératoires. L'application concerne la détermination des composés stéroliques (cholestérol, dehydrocholestérol, acétate de cholestérol, sitostérol) dans une série d'extraits d'algues diluées directement dans le solvant sans traitement préalable et après réaction de saponification en considérant des zones spectrales sélectionnées.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de chimie des substances naturelles du département de chimie, faculté des sciences et au laboratoire des plantes médicinales et aromatiques du département d'agronomie, faculté d'agro-vétérinaire, Université de Blida.

I-2- Matériel et réactifs

I-2-1-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 triglicinedeuteré 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 (figure).

Les fenêtres utilisées pour l'analyse de la phase liquide sont 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 pur utilisé pour la préparation des solutions (CHCl_3).

L'introduction des solutions a été réalisée avec un système à écoulement bloqué avec une cellule de flux. L'avantage d'une telle cellule est d'éviter les inconvénients relatifs au nettoyage et au remplissage des cellules conventionnelles et de minimiser la consommation des solvants organiques et de réduire le temps d'analyse.

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

Le système d'écoulement est effectué 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 multicomposée. La figure 6 montre l'instrumentation utilisée pour effectuer les mesures.

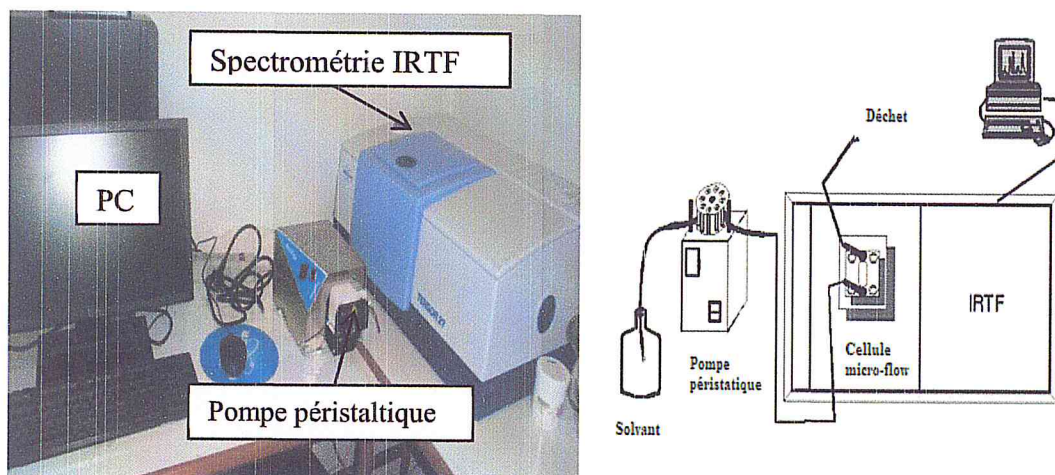


Figure 6 : Montage IRTF utilisé pour la détermination des étalons.

I-3- Spécificité du logiciel PLS (Quant 2)

L'utilisation du modèle de calibration PLS se fait à travers le logiciel Quant d'OPUS, ce dernier dispose de deux modèles Quant 1 et Quant 2.

Si les spectres des étalons présentent des pics séparés et spécifiques on fait appel au Quant 1, mais si les spectres sont exclusivement constitués de pics superposés (chevauchement dans les spectres), la méthode Quant 1 n'est pas indiquée. Dans ce cas, il faut utiliser le logiciel Quant 2 d'OPUS. La licence de ce logiciel qui n'est pas intégré au spectromètre a été achetée auprès de la boîte Bruker. Le logiciel PLS (Quant 2) a été utilisé pour la première fois au sein de notre équipe pour réaliser une étude quantitative.

I-4-Réactifs

Tous les réactifs utilisés dans cette étude ; chloroforme, méthanol, cholestérol, dehydrocholestérol, acétate de cholestérol, sitostérol, potasse sont de grade analytique.

I-5- Spectres IRTF des solutions mères préparées directement dans CHCl_3

Des solutions mères de cholestérol, dehydrocholestérol, d'acétate de cholestérol et de sitostérol ont été préparées directement dans CHCl_3 à des concentrations de 7, 5, 6, 4 mg.ml^{-1} , respectivement.

La figure 7 montre les spectres d'absorbance des solutions mères dans le domaine spectral compris entre 4000 et 800 cm^{-1} .

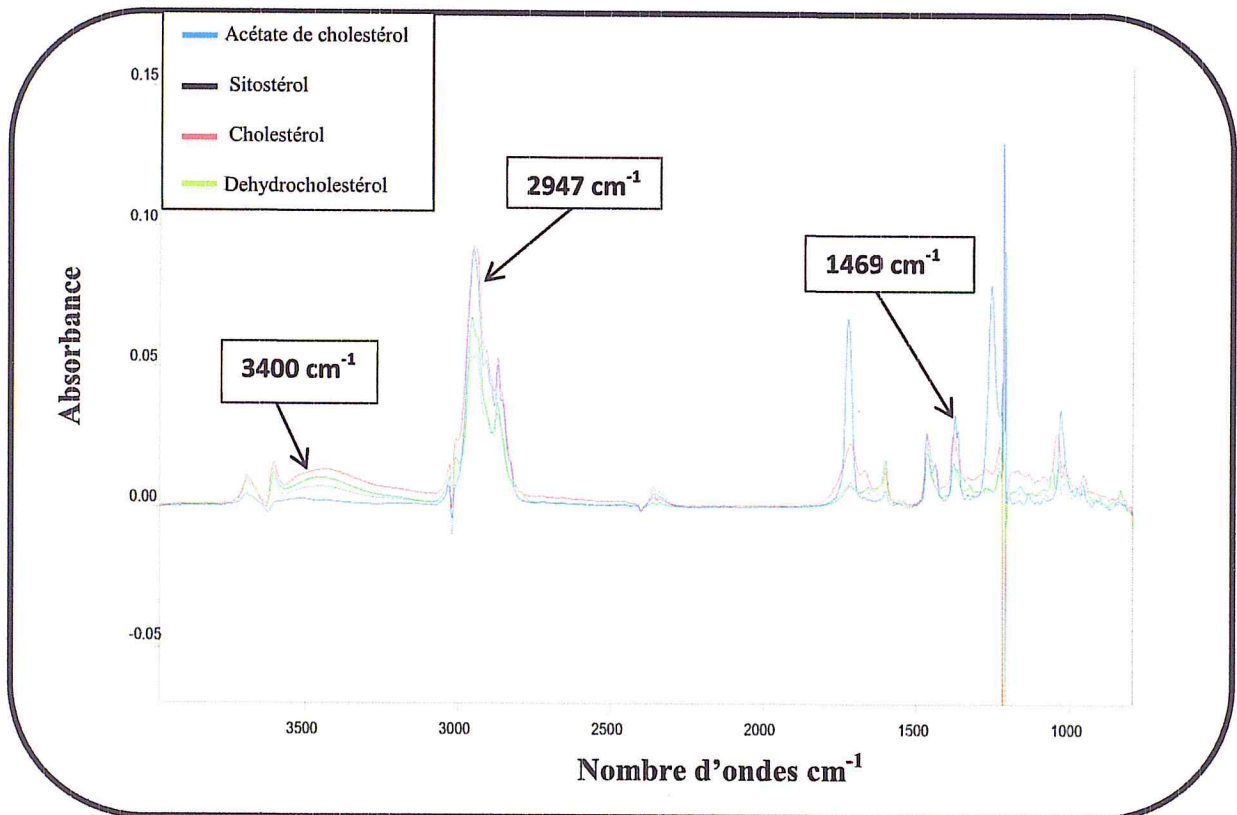


Figure 7 : Spectres IRTF des solutions mères d'étalons

D'après les spectres de la figure 1, on constate qu'il existe une bande à 3400 cm^{-1} commune aux quatre étalons utilisés, qui représente l'élongation de la liaison O-H d'un alcool. Les bandes entre 2976 cm^{-1} et 2792 cm^{-1} et à 1469 cm^{-1} sont caractéristiques de l'élongation du groupement CH, CH₂ et CH₃. Les bandes à 1057, 1044, 1032 cm^{-1} correspondent à l'élongation C-O selon les différents étalons

I-6-Calibration multicomposée

Nous allons, à travers cette étude d'une part développer un modèle de calibration multicomposé pour la détermination simultanée de cholestérol, de dehydrocholestérol,

d'acétate de cholestérol et de sitostérol et d'autre part montrer la simplicité et la rapidité de cette procédure quantitative.

Dans cette étude nous allons utiliser le logiciel Quant 2 d'OPUS (figure 8). Ce logiciel nous permet d'analyser la concentration des composantes chimiques contenues dans l'échantillon. Le calcul des valeurs de concentration présuppose en tout état de cause un calibrage préalable.

La figure 8 représente la fenêtre d'OPUS Quant 2.

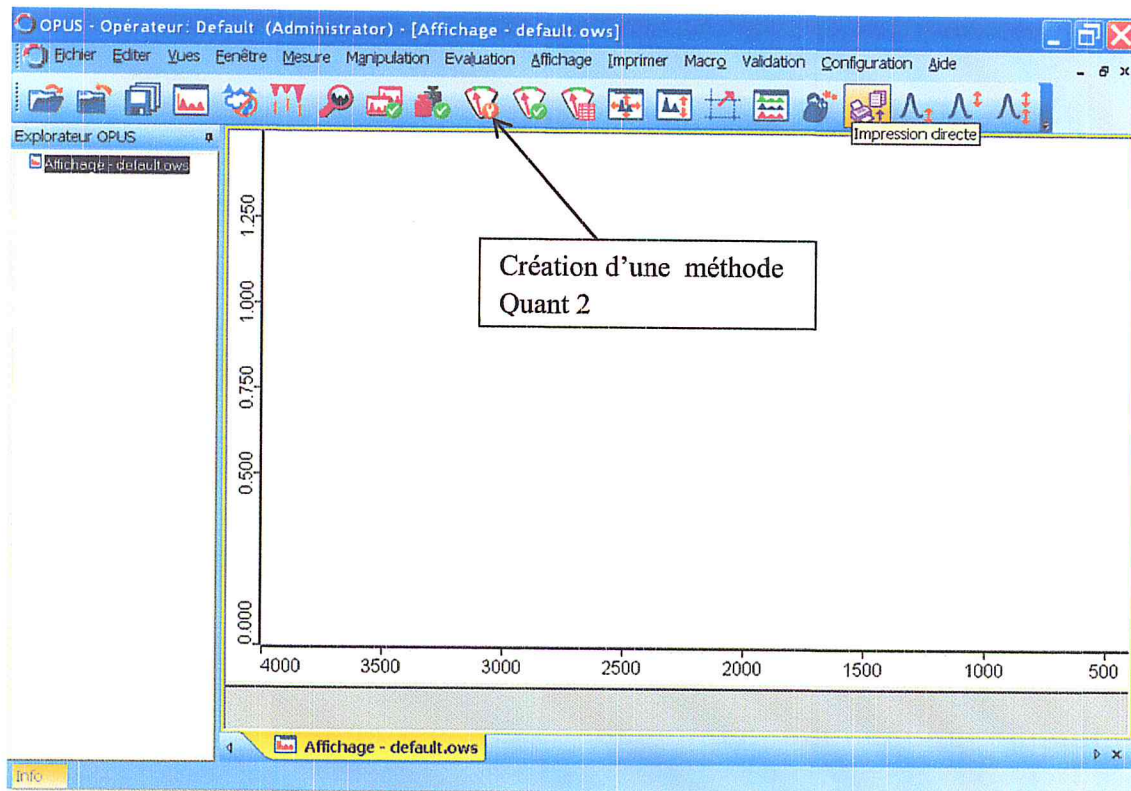


Figure 8 : Fenêtre d'OPUS Quant 2.

I-6-1- Optimisation du modèle PLS (Quant 2)

Pour procéder au calibrage et obtenir les meilleures valeurs de prédiction, nous devons disposer d'un jeu d'échantillons de calibrage. Chacun des échantillons de calibrage doit contenir des concentrations différentes des quatre composantes. La concentration de chaque composante dans l'échantillon doit être connue. Ensuite, nous procédons au calibrage à l'aide des spectres des échantillons avec les concentrations de chaque composante. Pour ce faire, nous sélectionnons pour tous les spectres des gammes ou l'intensité des pics est importante.

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

I-6-2-Préparation de la matrice de calibration

Dans cette étude, seize solutions étalons ont été préparées afin de construire le modèle. Les limites inférieures et supérieures des concentrations considérées dans la calibration pour chaque étalon ont été montrées dans le tableau I-1.

Tableau II-1 : Limites de concentrations des étalons utilisées.

Etalon	Les limites de concentration (mg.ml ⁻¹)
Cholestérol	0.21 - 2.8
Dehydrocholestérol	0.15 – 1.25
Acétate de cholestérol	0.3 – 1.5
Sitostérol	0.04 - 0.4

Les seize solutions étalons ont été préparées à partir des quatre solutions mères de concentration différentes (cholestérol, dehydrocholestérol, acétate de cholestérol et sitostérol).

La composition des seize solutions étalons en termes de concentrations et de volumes, sont regroupées dans le tableau I-2.

Tableau II-2 : Composition des solutions étalons (matrice de la calibration)

Etalon Solution étalon	Cholestérol		Dehydrocholestérol		Acétate de cholestérol		Sitostérol	
	C mg.ml ⁻¹	V ml	C mg.ml ⁻¹	V ml	C mg.ml ⁻¹	V ml	C mg.ml ⁻¹	V ml
Solution1	0.21	0.15	0.15	0.15	0.3	0.25	0.04	0.05
Solution2	2.8	2	0.15	0.15	0.3	0.25	0.04	0.05
Solution3	0.21	0.15	1.25	1.25	0.3	0.25	0.04	0.05
Solution4	0.21	0.15	0.15	0.15	1.5	1.25	0.04	0.05
Solution5	0.21	0.15	0.15	0.15	0.3	0.25	0.4	0.5
Solution6	2.8	2	1.25	1.25	0.3	0.25	0.04	0.05
Solution7	2.8	2	0.15	0.15	1.5	1.25	0.04	0.05
Solution8	2.8	2	0.15	0.15	0.3	0.25	0.4	0.5
Solution9	0.21	0.15	1.25	1.25	1.5	1.25	0.04	0.05
Solution10	0.21	0.15	1.25	1.25	0.3	0.25	0.4	0.5
Solution11	0.21	0.15	0.15	0.15	1.5	1.25	0.4	0.5
Solution12	2.8	2	1.25	1.25	1.5	1.25	0.04	0.05
Solution13	2.8	2	1.25	1.25	0.3	0.25	0.4	0.5
Solution14	2.8	2	0.15	0.15	1.5	1.25	0.4	0.5
Solution15	0.21	0.15	1.25	1.25	1.5	1.25	0.4	0.5
Solution16	2.8	2	1.25	1.25	1.5	1.25	0.4	0.5

C : Concentration de l'étalon dans l'échantillon en mg/ml, V : Volume prélevé de la solution mère en ml, (un volume finale de 5 ml est considéré).

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

Les cinq solutions synthétiques sont préparées pour être utilisé comme test.

La composition des cinq solutions synthétiques en termes de concentrations et de volumes, sont regroupées dans le tableau I-3.

Tableau II-3 : Composition des solutions synthétiques

Etalon Solution Synthétiques	Cholestérol		Dehydrocholestérol		Acétate de cholestérol		Sitostérol	
	C mg.ml ⁻¹	V ml	C mg.ml ⁻¹	V ml	C mg.ml ⁻¹	V ml	C mg.ml ⁻¹	V ml
Solution synthétique 1	0.35	0.25	0.2	0.2	0.6	0.5	0.08	0.1
Solution synthétique 2	0.7	0.5	0.4	0.4	0.72	0.6	0.16	0.2
Solution synthétique 3	1.05	0.75	0.6	0.6	0.96	0.8	0.2	0.25
Solution synthétique 4	1.4	1	0.8	0.8	1.08	0.9	0.28	0.35
Solution synthétique 5	2.1	1.5	1	1	1.2	1	0.32	0.4

C : Concentration de l'étalon dans l'échantillon en mg/ml, V : Volume prélevé de la solution mère en ml, (un volume finale de 5 ml est considéré).

I-6-4- Différentes étapes de l'éditeur de la méthode de Quant 2

Les différentes étapes de l'éditeur ou de la création de méthode Quant 2 sont très faciles et pratiques à exécuter grâce à un assistant OPUS qui nous guide dans chaque étape (Figure 9) une fois les spectres des solutions étalons sont enregistrées.

Cet assistant va vous aider à définir une méthode d'analyse quantitative Quant 2

Les étapes suivantes sont à parcourir

- Ouvrir la fenêtre de création d'une méthode de Quant 2
- Spécifier la désignation et les unités des composantes
- Ajouter les spectres pour le calibrage et le test
- Introduire les concentrations des composantes
- Choix de la stratégie (soit la validation croisée ou le test de validation)
- Fixer le nombre de répliques (nombre d'échantillons exclus)
- Spécifier l'algorithme de PLS 1 (sélectionner un seul composé)
- Sélectionner les gammes d'optimisation (sélection interactive)
- Sélectionner les différents prétraitements spectraux de PLS dans IR moyen (prétraitement par prétraitement)
- Optimiser le modèle
- Valider le modèle (désigner les paramètres RMSECV et RMSEE ou RMSEP de chaque composante)
- Sauvegarder la méthode

Cliquer sur **Charger une méthode** pour éditer une méthode existante.

Figure 9 : Assistant de l'éditeur de méthode Quant 2.

I-6-5- Prétraitements spectraux utilisés dans le Quant 2

Le prétraitement de données est une étape importante en effectuant un calibrage. Pour assurer la reproductibilité des échantillons de calibrage, plusieurs spectres de chaque échantillon doivent être acquis.

Le but du prétraitement des données est d'assurer une bonne corrélation entre les données spectrales et les valeurs de concentration. Il existe six modes de prétraitement spectral différent dans le Quant 2 relatifs au PLS détaillés comme suit :

- **Pas de prétraitement des données:** aucune modification dans le spectre.
- **Correction d'offset :** décale les spectres afin de placer le Y minimum à zéro.
- **Soustraction d'une droite :** adapte une ligne droite au spectre et soustrait ça. Ceci explique une inclinaison dans le spectre enregistré.

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

- **Le premier dérivé** : Elle calcule la première dérivée du spectre. Cette méthode souligne les bords raides d'une crête. Elle est employée pour une séparation physique du mélange.
- **La deuxième dérivé** : semblable à la première dérivée, mais avec un résultat plus énergétique.
- **La première dérivé + soustraction d'une droite** : le logiciel fait les deux prétraitements au même temps.

II- Régression des moindres carrée partiels (PLS)

II-1-Type de validation

Il y a deux types de validation, la validation croisée et le test de validation.

II-1-1-Validation croisée

La validation croisée emploie le même ensemble d'échantillons de calibrage. Dans ce système le logiciel utilise l'ensemble des échantillons pour valider et calibrer le modèle. Avant de commencer le calibrage, un échantillon est exclu de l'entité des échantillons. Cet échantillon est employé pour la validation et les échantillons restants sont employés pour le calibrage.

II-1-2-Test de Validation

Le test de validation emploie en plus de l'ensemble des échantillons de calibrage un autre ensemble d'échantillons dont les concentrations sont incluses dans la gamme de calibrage.

II-2-Stratégies de validation

II-2-1-Validation interne

Dans cette méthode, on introduit les spectres des échantillons étalons « calibrage » et des échantillons synthétiques « test », tout en mentionnant leurs concentrations. Après exécution de l'assistant de l'éditeur de la méthode Quant 2, on obtient l'erreur de prédiction « Erreur moyenne de la racine carrée de prédiction où l'erreur quadratique moyenne de la prédiction (RMSEP) ».

II-2-2-Validation externe

La figure 10 représente les étapes de la validation externe.

Cet assistant va vous aider à définir une méthode d'analyse quantitative Quant 2 par validation externe.

Les étapes suivantes sont à parcourir

- Ouvrir la fenêtre de création d'une méthode de Quant 2/liste des fichiers.
- Ajouter des méthodes (la méthode optimisée pour chaque étalon)
- Sauvegarder la liste des méthodes
- Ajouter des spectres des échantillons réels
- Sauvegarder la liste des spectres
- Aller au résultat d'analyse
- Analyser
- Obtenir les concentrations prédites de chaque échantillon réel

Figure 10 : les étapes de la validation externe

III- Paramètres analytiques fournis par le logiciel Quant 2 de PLS

Le logiciel que nous avons utilisé présente des paramètres analytiques pour valider les méthodes optimisées ces paramètres sont détaillés dans ce qui suit :

- R^2 (Coefficient de corrélation): Le coefficient de corrélation est une mesure de la relation linéaire entre les variables, c.-à-d. la valeur de coefficient de corrélation indique quelle quantité de changement d'une variable est expliquée par un changement de l'autre variable.


R^2 approche à 100% pendant que les valeurs de concentration prévue approchent les valeurs vraies.

- Rang : Le rang est le nombre de vecteurs de PLS (sont des variables latentes utilisées parmi le logiciel).

- RMSECV : (Erreur moyenne de la racine carrée de la validation croisée où l'erreur quadratique moyenne de la validation croisée) : Le cas de la validation croisée la valeur de RMSECV peut être prise comme critère pour juger la qualité de la méthode.

- RMSEE (Erreur moyenne de la racine carrée d'estimation où l'erreur quadratique moyenne du calibrage) : La valeur de RMSEE est un critère utilisé pour juger le calibrage.

- RMSEP (Erreur moyenne de la racine carrée de prédiction) : Le cas du test validation la valeur de RMSEP peut être prise comme critère pour juger la qualité de la méthode.



**Chapitre 2 :
Résultats et
discussions**

Chapitre 2 : Résultats et discussions

I-Construction des modèles PLS

I-1-Optimisation des différentes régions spectrales

Des modèles PLS ont été construits pour chaque étalon. Le rang (facteur) a été fixé pour différents modes de prétraitement. L'optimisation a été réalisée dans différentes régions spectrales. Pour valider les 4 meilleurs modèles, l'erreur moyenne de la racine carrée de validation croisée ou l'erreur quadratique moyenne de la validation croisée (RMSECV) a été le paramètre principal à considérer.

I-1-1- Modèles construits pour le cholestérol

L'optimisation des régions spectrales a été réalisée pour un rang de 6. Les modèles obtenus sont résumés dans le tableau II-4 :

Tableau II-4 : Paramètres considérés pour les modèles PLS établis du cholestérol selon la région

Traitement spectrale	Région spectrale (cm ⁻¹)	RMSECV	R ²	RMSEC	R ²	RMSEP	R ²
Pas de prétraitement des données	2976.8 - 2792.9 1500.6-1424.73	0.0733	99.68	0.0472	99.88	0.102	97.11
	1766.77-1688.33 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9 970.82-941.25	0.0898	99.52	0.0443	99.89	0.439	46.8
	2976.8 - 2792.9 1393.9-1240.9	0.0964	99.44	0.064	99.78	0.158	93.11
	1500.6-1424.73 1393.9-1240.9 970.82-941.25	0.126	99.05	0.0884	99.58	0.127	95.55
Correction d'offset	2976.8 - 2792.9 1500.6-1424.73	0.0965	99.44	0.0489	99.87	0.117	96.25
	2976.8 - 2792.9 1393.9-1240.9	0.125	99.06	0.064	99.78	0.181	91
	2976.8 - 2792.9 1393.9-1240.9 970.82-941.25	0.0989	99.41	0.0503	99.86	0.219	86.83
Soustraction d'une droite	2976.8 - 2792.9 1500.6-1424.73	0.0565	99.81	0.0242	99.97	0.063	98.91
	2976.8 - 2792.9 1500.6-1424.73 970.82-941.25	0.0595	99.79	0.0258	99.96	0.0655	98.82
	2976.8 - 2792.9 1500.6-1424.73	0.0669	99.71	0.0395	99.92	0.121	95.98

Chapitre 2 : Résultats et discussions

	1393.9-1240.9						
	1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	0.131	98.98	0.0799	99.65	0.181	90.98
1ère dérivé	2976.8 - 2792.9 1500.6-1424.73	0.0538	99.83	0.0279	99.96	0.128	95.49
	2976.8 - 2792.9	0.07	99.71	0.0327	99.94	0.0833	98.09
	2976.8 - 2792.9 1393.9-1240.9	0.0657	99.74	0.0358	99.93	0.0483	99.36
	2976.8 - 2792.9 1393.9-1240.9 970.82-941.25	0.054	99.83	0.0279	99.96	0.0551	99.16
2ème dérivé	2976.8 - 2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9 970.82-941.25	0.0869	99.55	0.0507	99.86	0.413	53.07
	2976.8 - 2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	0.078	99.64	0.0326	99.94	0.0972	97.39
1ère dérivé +Soustraction d'une droite	2976.8 - 2792.9 1500.6-1424.73	0.0409	99.9	0.0264	99.96	0.136	94.92
	2976.8 - 2792.9 1500.6-1424.73 970.82-941.25	0.0406	99.9	0.0258	99.96	0.104	97.01
	2976.8 - 2792.9 1393.9-1240.9 970.82-941.25	0.0406	99.9	0.0263	99.96	0.192	89.83
	1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	0.0883	99.53	0.0522	99.85	0.211	87.78
	2976.8 - 2792.9 1393.9-1240.9	0.0501	99.85	0.0299	99.95	0.148	93.94

Conditions opératoires: Sélection interactive (générale A), rang max=15, nbre de réplique=5, algorithme PLS1.

I-1-2- Modèles construits pour le dehydrocholestérol

L'optimisation des régions spectrales a été réalisée pour un rang de 7. Les modèles obtenus sont résumés dans le tableau II-5 :

Chapitre 2 : Résultats et discussions

Tableau II-5: Paramètres considérés pour les modèles PLS établis du dehydrocholestérol selon la région

Traitement spectrale	Région spectrale (cm ⁻¹)	RMSECV	R ²	RMSEC	R ²	RMSEP	R ²
Pas de prétraitement	1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	0.129	94.46	0.0705	98.54	0.235	30.76
1ère dérivé	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	0.13	94.42	0.0519	99.21	0.262	14.44
	1500.6-1424.73 1393.9-1240.9 970.82-941.25	0.152	92.37	0.0626	98.85	0.237	29.81
	1393.9-1240.9	0.232	82.23	0.0984	97.16	0.17	63.84
2ème dérivé	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73	0.0963	96.94	0.0449	99.41	0.0832	91.35
	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 970.82-941.25	0.122	95.1	0.046	99.38	0.162	67.21
	2976.8-2792.9	0.11	96.03	0.0452	99.4	0.182	58.66
	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	0.13	94.43	0.0576	99.04	0.104	86.49
	1500.6-1424.73 1393.9-1240.9 970.82-941.25	0.149	92.66	0.0703	98.55	0.254	19.13
1ère dérivé+ soustraction d'une droite	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73	0.0985	96.79	0.0384	99.57	0.181	58.94
	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	0.121	95.13	0.0456	99.39	0.223	37.68

Conditions opératoires: Sélection interactive (générale A), rang max=15, nbre de réplique=5, algorithme PLS1.

I-1-3- Modèles construits pour l'acétate de cholestérol

L'optimisation des régions spectrales a été réalisée pour un rang de 4. Les modèles obtenus sont résumés dans le tableau II-6 :

Chapitre 2 : Résultats et discussions

Tableau II-6: Paramètres considérés pour les modèles PLS établis du l'acétate de cholestérol selon la région

Traitement spectrale	Région spectrale (cm ⁻¹)	RMSECV	R ²	RMSEC	R ²	RMSEP	R ²
Pas de prétraitement	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73	0.088	97.84	0.0589	99.1	0.101	79.43
	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	0.0934	97.57	0.0636	98.95	0.105	77.68
	2976.8-2792.9 1393.9-1240.9	0.111	96.53	0.0704	98.71	0.108	76.52
Correction d'offset	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 970.82-941.25	0.0976	97.34	0.0681	98.79	0.207	13.51
	2976.8-2792.9 1766.77-1688.33 1500.6-1424.73 970.82-941.25	0.193	89.6	0.0599	99.06	0.0676	90.78
Soustraction d'une droite	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	0.0917	97.66	0.0564	99.17	0.142	59.07
	2976.8-2792.9 1393.9-1240.9 970.82-941.25	0.0963	97.41	0.0685	98.78	0.11	75.65
1ère dérivé	2976.8-2792.9 1766.77-1688.33 1393.9-1240.9 970.82-941.25	0.0865	97.91	0.0536	99.25	0.0891	83.98
	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 970.82-941.25	0.0811	98.17	0.0582	99.12	0.125	68.37
	2976.8-2792.9 1766.77-1688.33 1500.6-1424.73 970.82-941.25	0.0814	98.15	0.058	99.13	0.114	73.59
2ème dérivé	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9 970.82-941.25	0.088	97.84	0.0561	99.18	0.0704	90
	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	0.0798	98.22	0.0551	99.21	0.0729	89.27
1ère dérivé+ soustraction d'une droite	2976.8-2792.9 1766.77-1688.33 1393.9-1240.9 970.82-941.25	0.0862	97.93	0.054	99.24	0.0921	82.89
	2976.8-2792.9 1766.77-1688.33 1500.6-1424.73 970.82-941.25	0.0777	98.31	0.0553	99.2	0.127	67.67
	2976.8-2792.9 1766.77-1688.33 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	0.0885	97.82	0.054	99.24	0.0945	81.97

Conditions opératoires: Sélection interactive (générale A), rang max=15, nbre de réplique=5, algorithme PLS1.

Chapitre 2 : Résultats et discussions

I-1-4-Les modèles construits pour le sitostérol

L'optimisation des régions spectrales a été réalisée pour un rang de 6. Les modèles obtenus sont résumés dans le tableau II-7 :

Tableau II-7 : Paramètres considérés pour les modèles PLS établis du sitostérol selon la région

Traitement Spectrale	Région spectrale (cm ⁻¹)	RMSECV	R ²	RMSEE	R ²	RMSEP	R ²
Soustraction d'une droite	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73	0.0511	91.95	0.028	97.89	0.0552	58.17
	2976.8-2792.9 1393.9-1240.9	0.0799	80	0.0362	96.47	0.0562	56.73
	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	0.0754	82.46	0.038	96.11	0.0711	30.68
2ème dérivé	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73	0.0573	89.87	0.0243	98.4	0.032	85.98
	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	0.0437	94.11	0.0227	98.61	0.0807	10.68

Conditions opératoires: Sélection interactive (générale A), rang max=15, nbre de Réplique = 5, Algorithme PLS1.

I-1-5-Modèles optimums choisis selon la région spectrale

Le tableau II-8 regroupe les résultats d'optimisation des différents modèles selon la région spectrale pour chaque étalon. On a considéré les faibles valeurs d'erreurs et les plus importants coefficients de corrélation.

I-2-Optimisation des différents rangs (facteurs)

Des modèles PLS ont été construits pour chaque étalon. La région spectrale a été fixée pour chaque mode de prétraitement. Différents rangs (facteurs) ont été testés. Pour valider les 4 meilleurs modèles, l'erreur moyenne de la racine carrée de validation croisée (RMSECV) est le paramètre principal à considérer. Les erreurs RMSEE, RMSEP ainsi que les coefficients de corrélation également ont été considérés.

Chapitre 2 : Résultats et discussions

I-2-1- Modèles construit pour le cholestérol

Des modèles PLS ont été construits pour le cholestérol. La région spectrale a été fixée pour chaque mode de prétraitement. Les rangs (facteur) testés sont 5, 6 et 7. Les modèles obtenus sont résumés dans le tableau II-9.

I-2-2- Modèles construits pour le dehydrocholestérol

Des modèles PLS ont été construits pour le dehydrocholestérol. La région spectrale a été fixée pour chaque mode de prétraitement. Les rangs (facteur) testés sont 5, 6 et 7. Les modèles obtenus sont résumés dans le tableau II-10 :

I-2-3- Modèles construit pour l'acétate de cholestérol

Des modèles PLS ont été construits pour l'acétate cholestérol. La région spectrale a été fixée pour chaque mode de prétraitement. Les rangs (facteur) testés sont 4, 5, 6 et 7. Les modèles obtenus sont résumés dans le tableau II-11 :

I-2-4- Modèles construit pour le sitostérol

Des modèles PLS ont été construits pour sitostérol. La région spectrale a été fixée pour chaque mode de prétraitement. Les rangs (facteur) testés sont 6, 7 et 8. Les modèles obtenus sont résumés dans le tableau II-12 :

I-2-5- Modèles optimums choisis selon le rang

Le tableau II-13 regroupe les résultats d'optimisation des différents modèles selon le rang pour chaque étalon. On a considéré les faibles valeurs d'erreurs et les plus importants coefficients de corrélation.

I-3- Modèles PLS choisis

D'après les deux optimisations réalisées, les modèles choisis sont représentés dans le tableau II-14.

Les quatre modèles choisis pour les composantes utilisés donnent de meilleurs coefficients de détermination et une erreur RMSECV inférieur à 0.1 permettant d'estimer la bonne qualité de calibrage.

Tableau II-8: Modèles optimums selon la région de chaque étalon

Composantes	Traitement spectrale	Région spectrale cm^{-1}	Rang	RMSECV	R ²	RMSEE	R ²	RMSEP	R ²
Cholestérol	1ère dérivé	2976.8-2792.9 1393.9-1240.9 970.82-941.25	6	0.054	99.83	0.0279	99.96	0.0551	99.16
Dehydrocholestérol	2ème dérivé	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9 970.82-941.25	7	0.0963	96.94	0.0449	99.41	0.0832	91.35
Acétate de cholestérol	2ème dérivé	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73	4	0.088	97.84	0.0561	99.18	0.0704	90
Sitostérol	2ème dérivé	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73	6	0.0573	89.87	0.0243	98.4	0.032	85.98

Tableau II-9: Paramètres considérés pour les modèles PLS établis du cholestérol selon le rang

Traitement spectrale	Région spectrale cm^{-1}	Rang	RMSECV	R ²	RMSEE	R ²	RMSEP	R ²
Pas de prétraitement des données	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	5	0.11	99.27	0.0678	99.78	0.365	63.2
		6	0.0834	99.58	0.0488	99.87	0.141	94.54
		7	0.0719	99.69	0.0374	99.92	0.0778	98.33
Soustraction d'une droite	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	5	0.0831	99.58	0.047	99.88	0.109	96.74
		6	0.0748	99.66	0.042	99.9	0.129	95.39
		7	0.0746	99.66	0.0273	99.96	0.064	98.87
1ère dérivé	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	5	0.0871	99.54	0.0542	99.84	0.135	94.98
		6	0.0719	99.69	0.0384	99.92	0.11	96.64
		7	0.0451	99.88	0.0261	99.96	0.0597	99.02
2ème dérivé	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 970.82-941.25	5	0.0979	99.42	0.0624	99.78	0.291	76.59
		6	0.0492	99.85	0.0293	99.95	0.121	95.99
		7	0.0542	99.82	0.0255	99.96	0.094	97.56
1ère dérivé + soustraction d'une droite	2976.8-2792.9 1766.77-1688.33 1500.6-1424.73 970.82-941.25	5	0.0714	99.69	0.0302	99.95	0.128	95.45
		6	0.0445	99.88	0.024	99.97	0.092	97.66
		7	0.0403	99.9	0.0236	99.97	0.0756	98.42

Conditions opératoires: Sélection interactive (générale A), rang max=15, nbre de réplique=5, algorithme PLS1

Tableau II-10 : Paramètres considérés pour les modèles PLS établis du dehydrocholestérol selon le rang

Traitement spectrale	Région spectrale cm-1	Rang	RMSECV	R2	RMSEE	R2	RMSEP	R2
Pas de prétraitement	2976.8-2792.9	5	0.109	96.07	0.0596	98.93	0.105	86.24
	1393.9-1240.9	6	0.0914	97.22	0.0581	99	0.114	83.78
		7	0.106	96.28	0.0546	99.13	0.158	68.65
Soustraction d'une droite	2976.8-2792.9	6	0.103	96.47	0.054	99.14	0.236	30.09
	1766.77-1688.33	7	0.122	95.02	0.0464	99.37	0.256	18.32
	1500.6-1424.73							
970.82-941.25								
1ère dérivé	2976.8-2792.9	5	0.114	95.63	0.0624	98.8	0.172	63.01
	1500.6-1424.73	6	0.105	96.28	0.0535	99.13	0.246	24.4
	1393.9-1240.9	7	0.0866	97.47	0.0504	99.24	0.245	24.93
2ème dérivé	970.82-941.25	6	0.0795	97.87	0.0493	99.26	0.221	37.47
	1500.6-1424.73	7	0.0821	97.73	0.0492	99.28	0.15	71.85
	1393.9-1240.9							
970.82-941.25								
1ère dérivé + soustraction d'une droite	2976.8-2792.9	5	0.098	96.76	0.064	98.74	0.0716	93.58
	1500.6-1424.73	6	0.0955	96.93	0.0571	99.01	0.128	79.67
	1393.9-1240.9	7	0.11	95.88	0.0521	99.19	0.11	84.89
970.82-941.25	1766.77-1688.33	5	0.144	92.97	0.0878	97.62	0.0637	94.93
	1500.6-1424.73	6	0.103	96.43	0.0548	99.09	0.0952	88.67
	1393.9-1240.9	7	0.0969	96.83	0.0521	99.19	0.256	18.31
970.82-941.25								

Conditions opératoires: Sélection interactive (générale A), rang max=15, nbre de réplique=5, algorithme PLS1.

Tableau II-11 : Paramètres considérés pour les modèles PLS établis du l'acétate de cholestérol selon le rang

Traitement spectrale	Région spectrale (cm ⁻¹)	Rang	RMSECV	R ²	RMSEE	R ²	RMSEP	R ²
Pas de prétraitement Centrage moyen	1500.6-1424.73 1393.9-1240.9 970.82-941.25	4	0.07	98.63	0.0403	99.58	0.0435	96.17
		5	0.0587	99.03	0.0323	99.73	0.0247	98.77
		6	0.0641	98.85	0.0276	99.81	0.0516	94.62
		7	0.0579	99.06	0.0271	99.82	0.034	97.67
Correction d'offset Centrage moyen	1500.6-1424.73 1393.9-1240.9 970.82-941.25	4	0.0835	98.05	0.0484	99.39	0.0243	98.81
		5	0.0746	98.44	0.0379	99.63	0.0304	98.14
		6	0.0703	98.61	0.0355	99.68	0.0376	97.15
		7	0.0568	99.1	0.0269	99.82	0.0447	95.96
Soustraction d'une droite Centrage moyen	1766.77-1688.33 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9 970.82-941.25	4	0.0768	98.35	0.0446	99.49	0.0237	98.87
		5	0.0733	98.49	0.0363	99.66	0.163	46.08
		4	0.0897	97.75	0.0475	99.42	0.0669	90.98
		5	0.0834	98.05	0.044	99.51	0.0858	85.13
1ère dérivé Centrage moyen	2976.8-2792.9 1393.9-1240.9 970.82-941.25	6	0.0702	98.62	0.0307	99.76	0.0975	81.1
		7	0.0606	98.97	0.03	99.78	0.0975	80.82
		4	0.083	98.07	0.0403	99.58	0.0241	98.83
		5	0.0806	98.18	0.039	99.61	0.0315	98
2ème dérivé Centrage moyen	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 970.82-941.25	6	0.0679	98.71	0.0321	99.74	0.0971	80.98
		7	0.0665	98.76	0.0321	99.75	0.0761	88.32
		4	0.0876	97.85	0.0432	99.52	0.107	76.87
		5	0.0774	98.32	0.037	99.65	0.0501	94.93
1ère dérivé + soustraction d'une droite Centrage moyen	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 970.82-941.25	6	0.0707	98.6	0.0318	99.75	0.0264	98.09
		7	0.0619	98.93	0.0303	99.77	0.0379	97.09

Conditions opératoires: Sélection interactive (générale A), rang max=15, nbre de réplique=5, algorithme PLS1.

Chapitre 2 : Résultats et discussions

Tableau II-12 : Paramètres considérés pour les modèles PLS établis du sitostérol selon le rang

Traitement spectral	Région spectrale (cm ⁻¹)	Rang	RMSECV	R ²	RMSEE	R ²	RMSEP	R ²
Soustraction d'une droite Centrage moyen	2976.8-2792.9 1393.9-1240.9 970.82-941.25	6	0.083	78.59	0.0405	95.45	0.0388	79.36
		7	0.0401	95.01	0.016	99.3	0.0426	75.14
Correction d'offset Centrage moyen	2976.8-2792.9 1393.9-1240.9	6	0.118	56.18	0.0625	88.94	0.0697	33.34
		7	0.104	65.71	0.043	94.83	0.0645	42.98
1ère dérivé Centrage moyen	2976.8-2792.9 1393.9-1240.9	6	0.0712	84.25	0.025	98.26	0.0769	18.91
		7	0.0502	92.18	0.0182	99.1	0.0643	43.29
		8	0.0486	92.68	0.0142	99.46	0.0577	54.43
1ère dérivé + soustraction d'une droite Centrage moyen	2976.8-2792.9 1393.9-1240.9 970.82-941.25	6	0.0642	87.21	0.037	96.21	0.0268	90.18
		7	0.05	92.24	0.0221	98.67	0.0609	49.25
		8	0.0398	95.09	0.0164	99.28	0.0712	30.6

Conditions opératoires: Sélection interactive (générale A), rang max=15, nbre de réplique=5, algorithme PLS1.

Tableau II-13 : Modèles optimums selon le rang de chaque étalon

Composantes	Traitement spectrale	Région spectrale cm^{-1}	Rang	RMSECV	R ²	RMSEE	R ²	RMSEP	R ²
Cholestérol	1ère dérivé Centrage moyen	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9	7	0.0451	99.88	0.0261	99.96	0.0597	99.02
Dehydrocholestérol	2ème dérivé Centrage moyen	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9 970.82-941.25	5	0.098	96.76	0.064	98.74	0.0716	93.58
Acétate de cholestérol	Soustraction d'une droite Centrage moyen	1766.77-1688.33 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9 790.82-941.25	4	0.0768	98.35	0.0446	99.49	0.0237	98.87
Sitostérol	1ère dérivé + soustraction d'une droite Centrage moyen	2976.8-2792.9 1393.9-1240.9 970.82-941.25	6	0.0642	87.21	0.037	96.21	0.0268	90.18

Chapitre 2 : Résultats et discussions

Tableau II-14 : Modèles optimisés selon le rang et la région

Composantes	Traitement spectrale	Région spectrale cm^{-1}	Rang	RMSECV	R^2	RMSEE	R^2	RMSEP	R^2										
Cholestérol	1ère dérivé Centrage moyen	2976.8-2792.9 1393.9-1240.9 970.82-941.25	6	0.054	99.83	0.0279	99.96	0.0551	99.16										
										Dehydrocholestérol	2ème dérivé Centrage moyen	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73 1393.9-1240.9 970.82-941.25	5	0.098	96.76	0.064	98.74	0.0716	93.58
Sitostérol	2ème dérivé Centrage moyen	2976.8-2792.9 1500.6-1424.73	6	0.0573	89.87	0.0243	98.4	0.032	85.98										

Chapitre 2 : Résultats et discussions

II- Représentation graphique des paramètres des modèles PLS choisis pour chaque composante

II-1- Cholestérol

La figure 11 montre les représentations graphiques des paramètres analytiques de cholestérol 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 de la validation croisée par rapport à la valeur réelle, (C) montre la corrélation entre la valeur prédite et réelle au test de validation et enfin (D) illustre la dispersion de l'erreur absolue de test de validation par rapport à la valeur réelle. Les quatre diagrammes obtenus permettent d'apprécier la qualité de la série de calibrage.

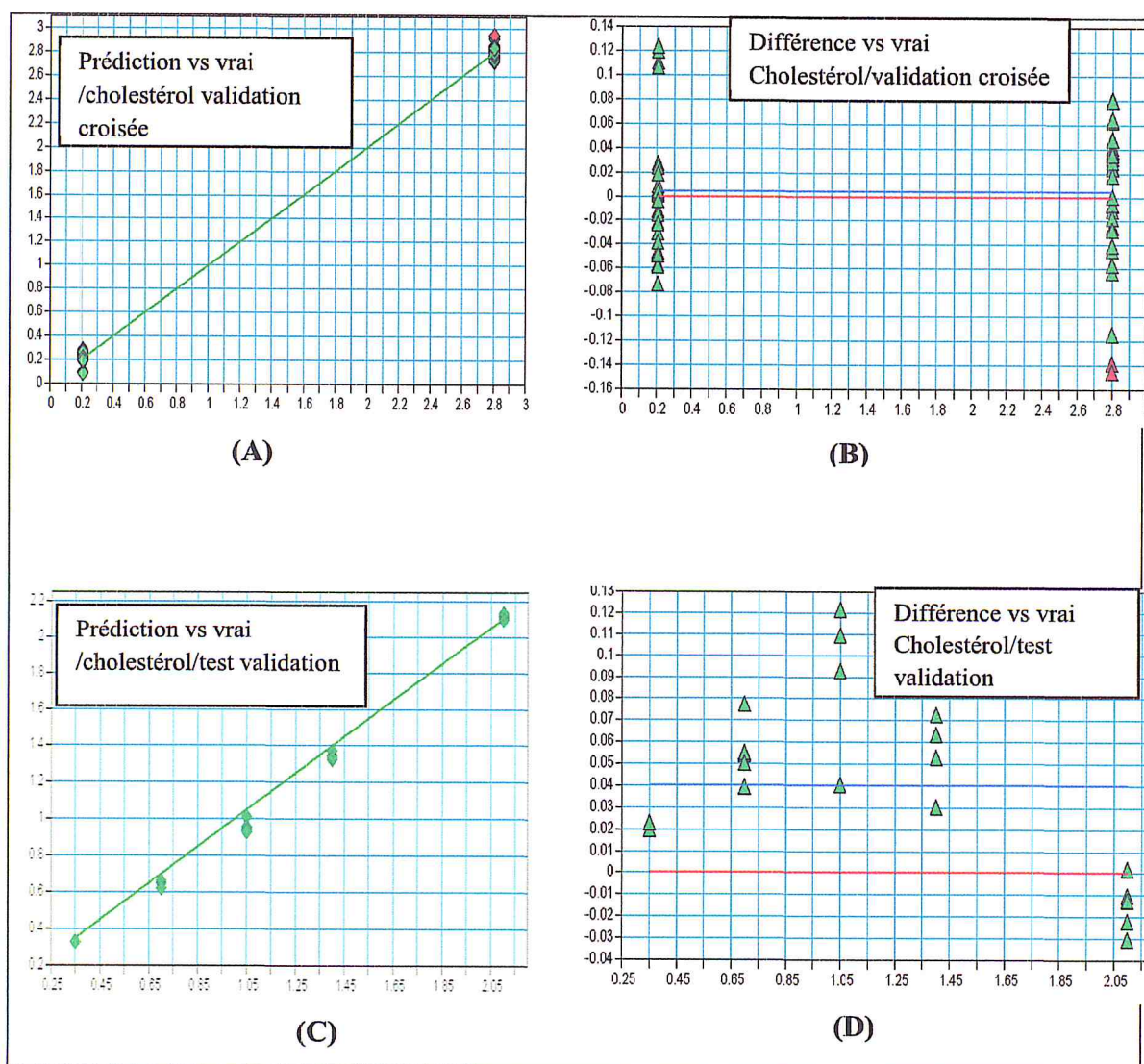


Figure 11 : Représentations graphiques des paramètres analytiques du modèle optimum de cholestérol

Chapitre 2 : Résultats et discussions

II-2- Dehydrocholestérol

La figure 12 montre des représentations graphiques des paramètres analytiques de dehydrocholestérol 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 de la validation croisée par rapport à la valeur réelle, (C) montre la corrélation entre la valeur prédite et réelle au test de validation et enfin (D) illustre la dispersion de l'erreur absolue de test de validation par rapport à la valeur réelle. Les quatre diagrammes obtenus permettent d'apprécier la qualité de la série de calibrage.

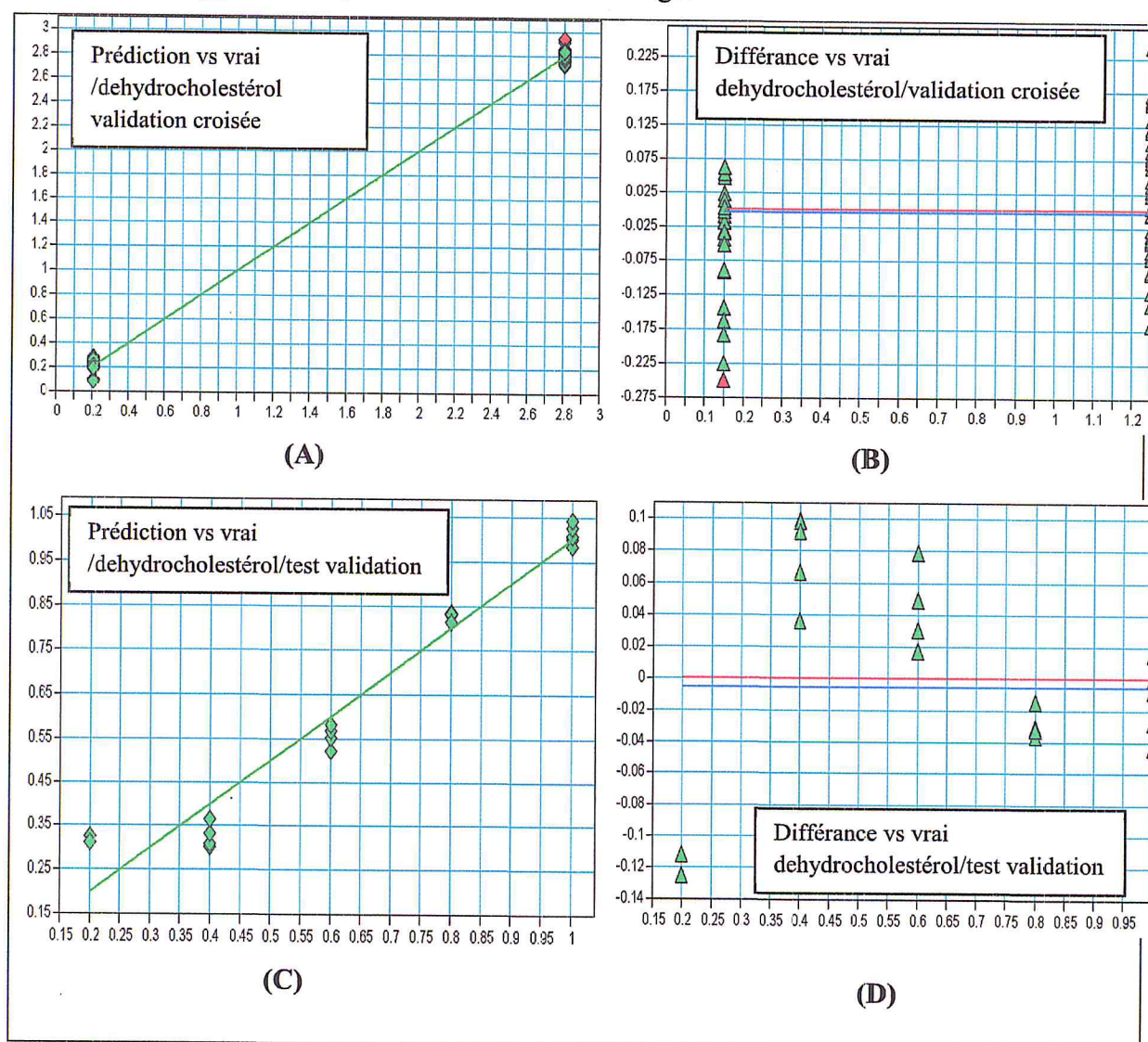
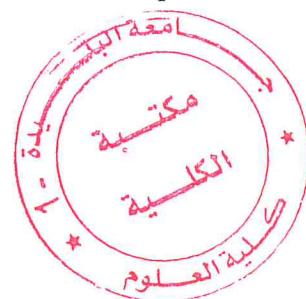


Figure 12 : Représentations graphiques des paramètres analytiques de modèle optimum de dehydrocholestérol



Chapitre 2 : Résultats et discussions

II-3-Pour l'acétate de cholestérol

La figure 13 montre des représentations graphiques des paramètres analytiques de l'acétate de cholestérol 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 de la validation croisée par rapport à la valeur réelle, (C) montre la corrélation entre la valeur prédite et réelle au test de validation et enfin (D) illustre la dispersion de l'erreur absolue de test validation par rapport à la valeur réelle. Les quatre diagrammes obtenus permettent d'apprécier la qualité de la série de calibrage.

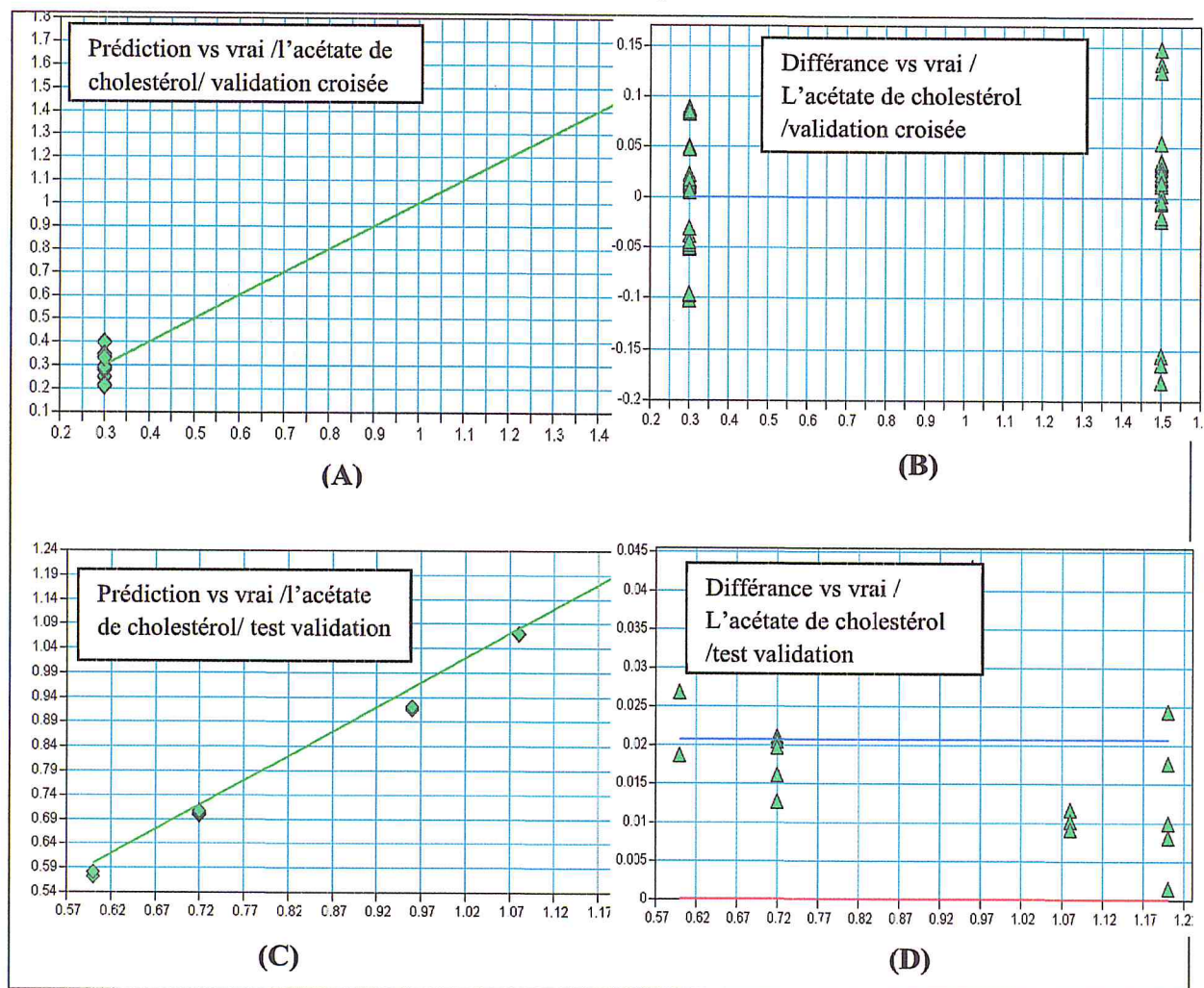


Figure 13 : Représentations graphiques des paramètres analytiques de modèle optimum de l'acétate de cholestérol

Chapitre 2 : Résultats et discussions

II-4-Pour le sitostérol

La figure 14 montre des représentations graphiques des paramètres analytiques de sitostérol 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 de la validation croisée par rapport à la valeur réelle, (C) montre la corrélation entre la valeur prédite et réelle au test de validation et enfin (D) illustre la dispersion de l'erreur absolue de test validation par rapport à la valeur réelle. Les quatre diagrammes obtenus permettent d'apprécier la qualité de la série de calibration.

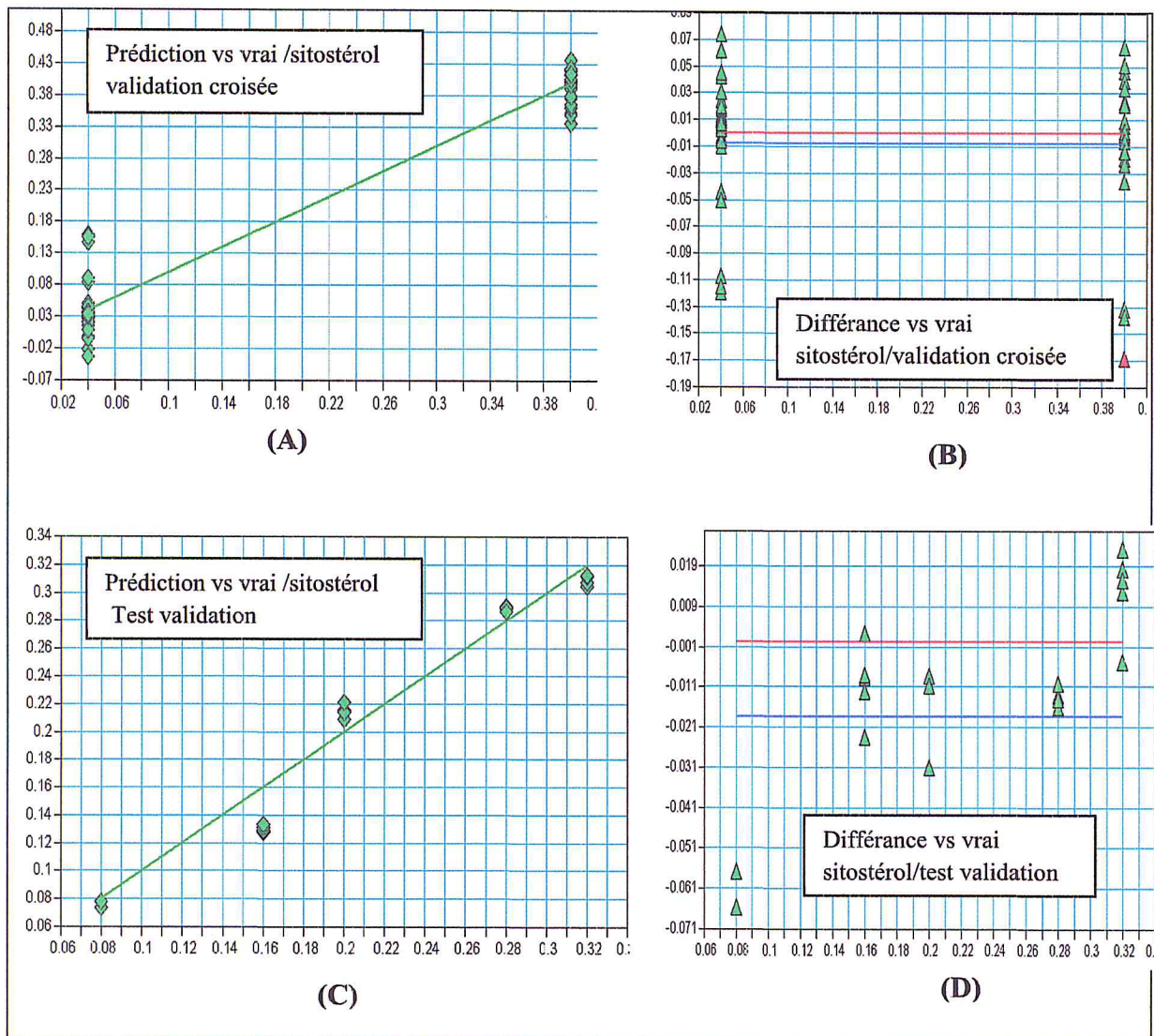


Figure 14: Représentations graphiques des paramètres analytiques de modèle optimum de sitostérol

Chapitre 2 : Résultats et discussions

III-Détermination de cholestérol, dehydrocholestérol, acétate de cholestérol, sitostérol dans les échantillons réels par PLS-IRTF

L'application choisie pour vérifier l'efficacité du modèle développé PLS-IRTF est la détermination simultanée de la concentration du cholestérol, dehydrocholestérol, acétate de cholestérol, sitostérol dans les extraits d'algues.

Les échantillons utilisés dans cette partie de travail se sont des extraits d'espèces d'algues marines obtenus par extraction par un mélange de solvants chloroforme/méthanol V/V (1/1), octroyés du laboratoire des substances naturelles. Les espèces utilisées sont *Cystoseira sedoides*, *Dictyota dichotoma* (algues brunes), *Laurencia sp* (algue rouge), *Caulerpa taxifolia* (algue verte). Ces algues sont choisies sur la base de leur composition stérolique.

III-1- Analyse directe des échantillons réels

Le but de cette expérience est de vérifier la possibilité de la détermination des quatre composantes (cholestérol, dehydrocholestérol, acétate de cholestérol, sitostérol) dans les extraits d'algues par PLS-IRTF et ce, sans traitement préalable des échantillons.

Une quantité de 100 mg d'extrait d'algue est considérée dans chaque préparation. Cette quantité a été diluée dans 0.5 ml de CHCl_3 . L'analyse IRTF des extraits a été faite dans les conditions expérimentales mentionnées dans la section II-1.

La figure 15 représente les spectres des quatre extraits considérés d'un côté et de l'étalon le plus concentré. L'examen des spectres d'extrait montre que ces derniers comportent des bandes intenses et larges qui masquent les bandes des stérols dans la région des empreintes digitales d'étalons (solution 16).

Chapitre 2 : Résultats et discussions

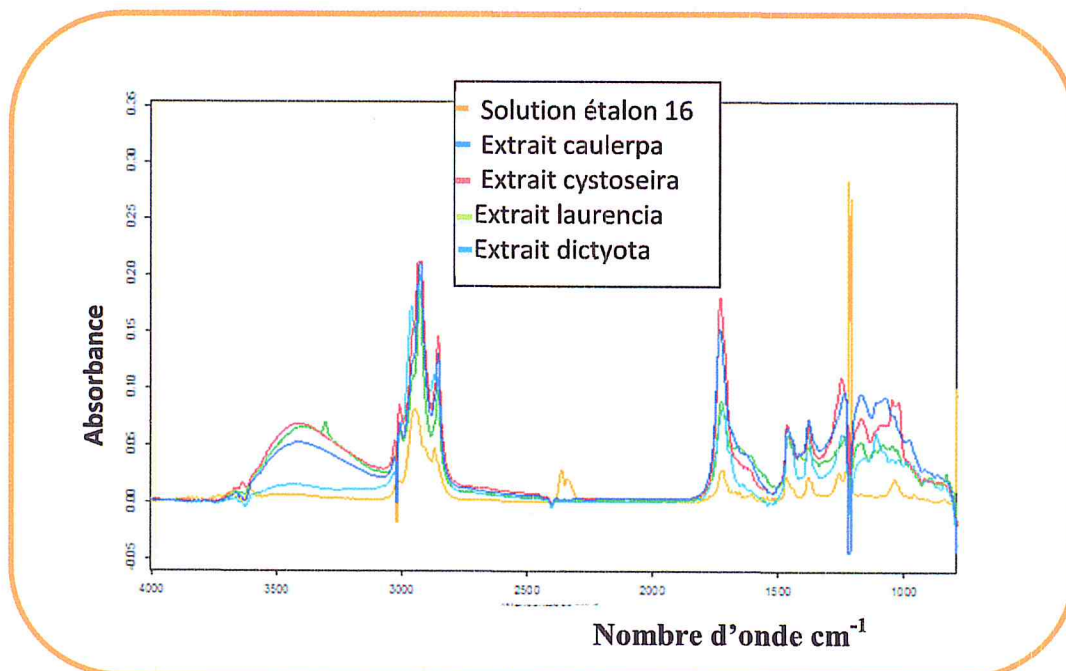


Figure 15 : spectres IRTF des extraits d'algues et de la solution étalon plus concentrée sans traitement préalable

III-1-1-Résultats de l'analyse PLS des échantillons réels sans traitement préalable

Pour déterminer la concentration prédite de chaque composante dans les échantillons réels, on a utilisé la validation externe. Les modèles optimums choisis ont été employés. Les résultats sont résumés dans le tableau II-15.

Tableau II-15 : Les concentrations prédites des étalons dans les échantillons réels sans traitement préalable.

Echantillons Réels	[] prédites			
	Cholestérol (mg.ml ⁻¹)	Dehydrocholestérol (mg.ml ⁻¹)	Acétate de cholestérol (mg.ml ⁻¹)	Sitostérol (mg.ml ⁻¹)
	X ± δ	X ± δ	X ± δ	X ± δ
<i>Caulerpa taxifolia</i>	192,28666 ± 0,00189	105,86333 ± 0,00043	34,10266 ± 0,00206	-
<i>Cystoseira sedoides</i>	191,49666 ± 0,00783	83,37133 ± 0,01494	50,17100 ± 0,01586	-
<i>Dictyota dichotoma</i>	41,52000 ± 0,00390	119,25333 ± 0,00228	13,44066 ± 0,00030	10,36166 ± 0,01619
<i>Laurencia Sp</i>	150,71666 ± 0,00161	107,86666 ± 0,00174	18,09100 ± 0,00097	-

X : moyenne des concentrations prédites, δ : déviation standard.

Chapitre 2 : Résultats et discussions

Les valeurs des concentrations prédites des stérols dans les extraits ne sont pas cohérentes compte tenu de la quantité d'extrait considéré initialement pour chaque espèce. Etant donné que la teneur des stérols dans les extraits d'algues est faible, la détermination directe est impossible. Une préconcentration s'avère nécessaire.

III-2-Analyse des échantillons réels après réaction de saponification

III-2- 1-Procédure générale de la réaction de saponification

Afin d'alléger la matrice et de préconcentrer les stérols. Nous avons effectués une réaction de saponification selon le protocole détaillé sur la figure 16.

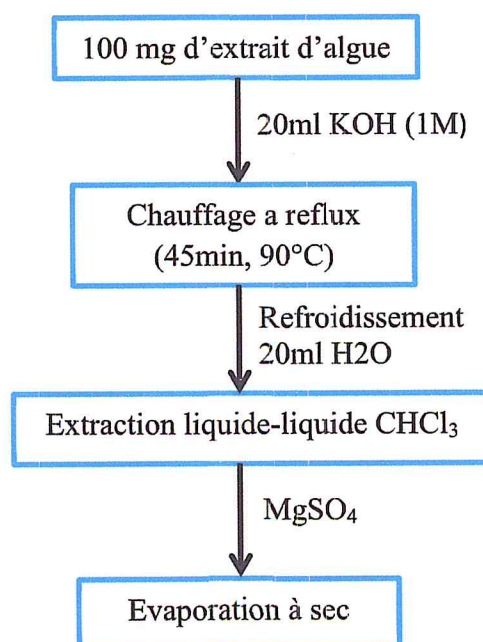


Figure 16 : Protocole générale de la réaction de saponification

III-2- 1-1- Extraction liquide-liquide

Le mélange réactionnel après réaction de saponification a subi une extraction liquide-liquide selon le protocole mentionné dans la figure 17.

Chapitre 2 : Résultats et discussions

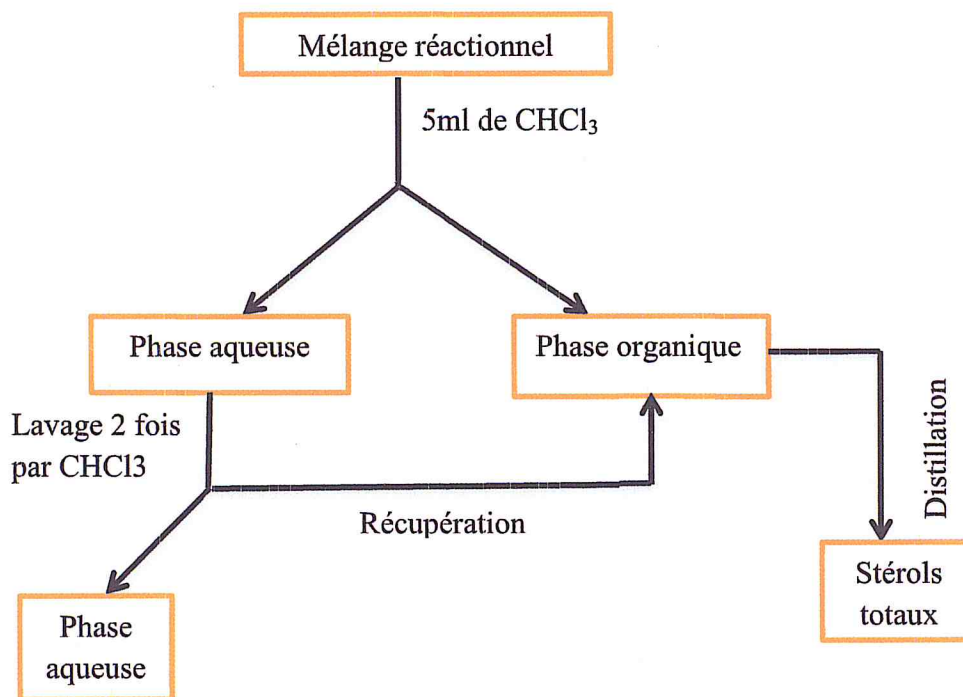


Figure 17 : Protocol générale de l'extraction liquide-liquide

La solution d'extrait obtenue après réaction de saponification et extraction liquide-liquide a été évaporée à sec et ensuite diluée dans 1 ml de solvant pour être analysée.

La figure 18 représente les spectres des quatre extraits obtenus après réaction de saponification et extraction liquide-liquide considérés d'un côté et de l'étalon le plus concentré. L'examen des spectres d'extraits montre que la réaction de saponification a permis l'apparition de bandes de stérols.

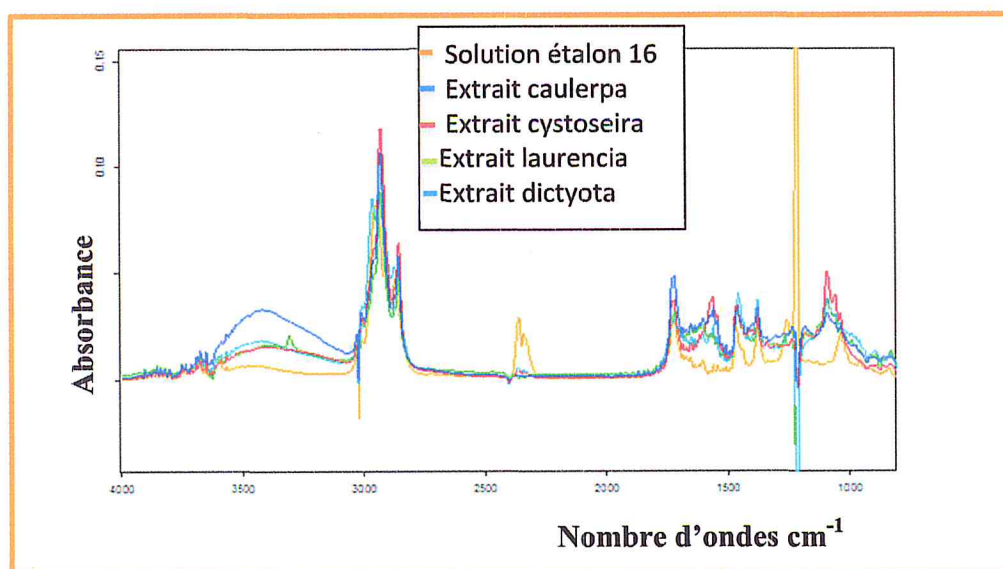


Figure 18 : Spectres des extraits et solution étalon plus concentré après réaction de saponification

Chapitre 2 : Résultats et discussions

III-2-2-Résultats de l'analyse PLS des échantillons réels après réaction de saponification

Les modèles optimums choisis ont été sélectionnés, les spectres des échantillons réels après réaction de saponification ont été introduits pour une validation externe, les résultats d'analyse sont résumés dans le tableau II- 16.

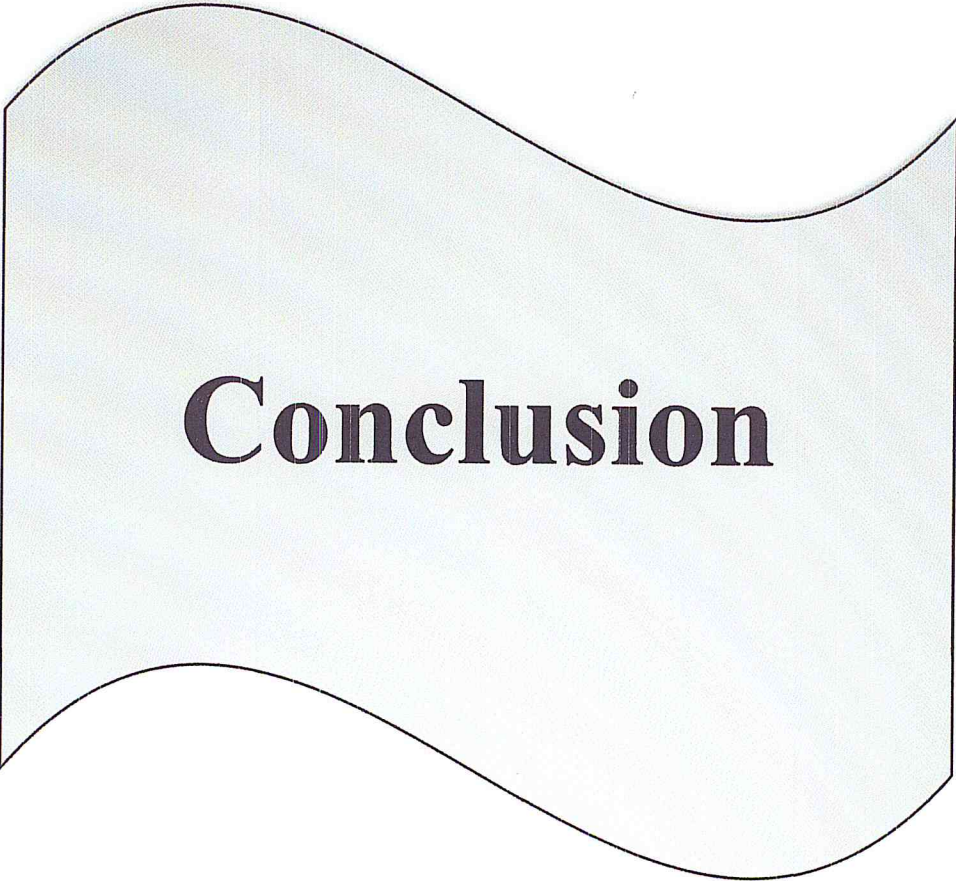
Tableau II-16 : Concentrations prédites des étalons dans les échantillons réels après réaction de saponification

Echantillons Réels	[] prédites			
	Cholestérol (mg.ml ⁻¹)	Dehydrocholestérol (mg.ml ⁻¹)	Acétate de cholestérol (mg.ml ⁻¹)	Sitostérol (mg.ml ⁻¹)
	X ± δ	X ± δ	X ± δ	X ± δ
<i>Caulerpa taxifolia</i>	5,76926 ± 0,00118	3,37820 ± 0,00095	0,68154 ± 0,000495	-
<i>Cystoseira sedoides</i>	6,57456 ± 0,00511	3,92626 ± 0,00466	0,49130 ± 0,00436	-
<i>Dictyota dichotoma</i>	1,73843 ± 0,00634	3,60656 ± 0,00301	0,11993 ± 0,00544	0,02107 ± 0,35123
<i>Laurencia Sp</i>	3,15520 ± 0,00280	1,97773 ± 0,00185	0,23476 ± 0,00386	-

X : moyenne des concentrations prédites, δ : déviation standard.

D'après le tableau II-16 on constate que les quatre espèces contiennent des concentrations qui varient de 6.57 à 1.73 mg.ml⁻¹ pour le cholestérol, de 3.92 à 1.97 mg/ml pour le dehydrocholestérol, de 0.68 à 0.11 mg.ml⁻¹ pour l'acétate de cholestérol. Le sitostérol est présent seulement dans l'espèce *Dictyota dichotoma* avec une faible teneur de 0.021 mg.ml⁻¹.

Pour confirmer les résultats obtenus, il faut considérer d'une part d'autres analyses indépendantes des différents extraits utilisés par IRTF-PLS et les comparer à d'autres méthodes d'analyses de référence de l'autre part.



Conclusion

Conclusion

L'exploitation du logiciel de calibration multicomposée Quant 2 d'OPUS est correctement lancée pour la première fois, au sein de notre équipe de recherche suite à cette étude.

La partie principale de ce mémoire a été consacrée au développement d'une calibration multicomposée pour la détermination simultanée des composés stéroliques dans les extraits d'algues.

Dans un premier temps, nous avons sélectionné les conditions opératoires appropriées pour effectuer cette étude et nous avons optimisé les différents paramètres analytiques de la calibration multicomposée.

Pour procéder à la calibration PLS-IRTF et obtenir les meilleures valeurs de prédiction, nous avons considéré seize solutions étalons contenant les quatre analytes (cholestérol, dehydrocholestérol, acétate de cholestérol, sitostérol). Les limites inférieures et supérieures des concentrations ont été sélectionnées pour chaque composante.

Différents modèles PLS ont été construits en considérant les gammes où l'intensité des pics est importante. La calibration a été établie en comptant deux types d'optimisation, le premier selon la région spectrale et le deuxième selon le rang pour différents prétraitements spectraux.

Les résultats des analyses consécutives démontrent que les modèles PLS développés sont adéquats pour la détermination simultanée des quatre analytes, en fournissant des faibles erreurs de la validation de 0.054, 0.098, 0.0768 et 0.0573, des coefficients de corrélation égaux à 99.96, 98.74, 99.49 et 98.4 pour des rangs de 6, 5, 4, 6 dans le cas de cholestérol, de dehydrocholestérol, d'acétate de cholestérol et de sitostérol, respectivement par l'application de prétraitements spectraux sélectionnés.

L'application concerne quatre extraits d'algues obtenus par extraction par solvant où mélange de solvants. Il s'agit de *caulerpa taxifolia*, *cystoseira sedoides*, *dictyota dichotoma* et *laurencia sp.*

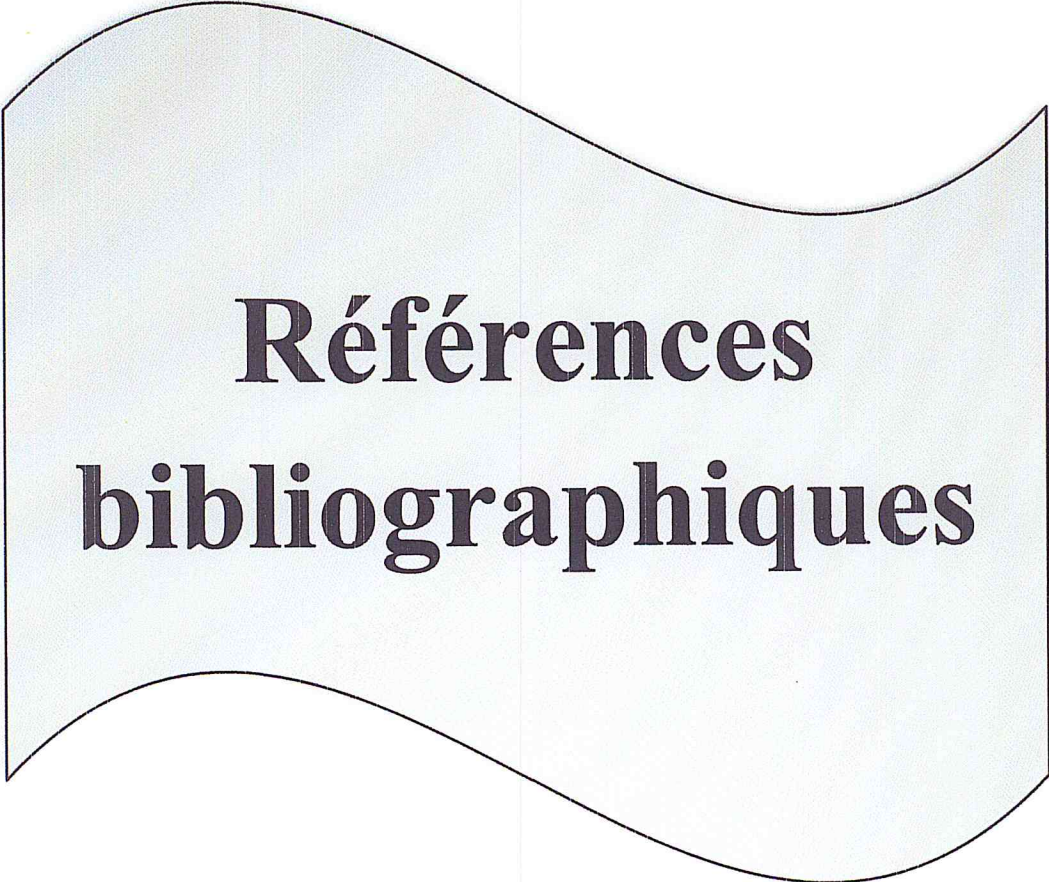
L'analyse directe (sans traitement préalable) des extraits d'algues diluées dans CHCl_3 a fourni des concentrations prédites qui ne sont pas cohérentes.

Pour améliorer les résultats, nous avons effectué une réaction de saponification suivie par une extraction liquide-liquide pour alléger la matrice et préconcentrer la fraction stérolique. Les valeurs des concentrations prédites pour le cholestérol, le dehydrocholestérol, l'acétate de cholestérol et le sitostérol dans les extraits d'algues obtenues après réaction de

Conclusion

saponification et extraction liquide-liquide varient de 6.57 à 1.73 mg.ml⁻¹ pour le cholestérol, de 3.92 à 1.97 mg/ml pour le dehydrocholestérol et de 0.68 à 0.11 mg.ml⁻¹ pour l'acétate de cholestérol. Le sitostérol est présent seulement dans l'espèce *Dictyota dichotoma* avec une faible teneur de 0.021 mg.ml⁻¹.

Les résultats obtenus sont préliminaires et méritent d'être confirmés par d'autres expériences.



**Références
bibliographiques**

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Radmer, R.J., Parker, B.C. «Commercial application of algae: opportunities and constraints». J. Phycol. 6(1994).
2. Ramade, A. « Eléments d'écologie appliquée », 4ème édition, Edition Dunod, (2009).
3. Volkman, J. K., Barrett, S. M. Blackburn, S. I., Mansour, M. P., Sikes, E. L., Gelin, F., «Microalgal biomarkers: a review of recent research developments», Org. Geochem., 29 (1998).
4. Garon-Lardiere, S. « Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales) ». Université De Bretagne Occidentale, (2004).
5. Cavalla, M, « Algues-Microalgues », (2000).
6. Boudouresque, C. F., Meinesz, A. et Verlaque, M., dans « Guide des algues des mers d'Europe : méditerranée », Ed. Delachaux et Niestlé, Paris (1992).
7. Ribier, J. et Godineau, J- C., « Les algues », Ed. Flammarion, la maison rustique, Paris, (1984).
8. Gayral, P., Cosson, J., «Connaître et reconnaître les algues marines», Ed. Ouest- France, (1986).
9. Kerr, R. G. and Baker, B. J., «Marine sterols», Nat. Prod. Rep., 8 (1991).
10. Volkman, J. K., Barrett, S. M. Blackburn, S. I., Mansour, M. P., Sikes, E. L., Gelin, F., « Microalgal biomarkers: a review of recent research developments», Org. Geochem., 29 (1998).
11. Hart, H., et J.M. Conia. « Introduction à la chimie organique » .Edition Dunod, Paris, (2000).
12. Artaud J., atrides M. C., Tisse C., Zahra J.P., Estienne J., « Études chromatographiques et spectroscopiques de stérols : application aux stérols d'algues », (1980).
13. Gibbons G.F, L. J.Goad and T.W.Goodwin, « The sterols of some marine red algae », Phytochemistry 6(1967).
14. Patterson Glenn W, « The distribution of sterols in algae, lipids », 6(1965-1967-1969).
15. Maurice Aknin, Joseph Miraldest and Jean-Michel Kornprobst, « Sterol and fatty acid distribution in red algae from the Senegalese coast », Comparative biochemistry and physiology, 96(1990).

Références bibliographiques

16. Meledath Govindan, Janice D.Hodge, Kevin A. Brown and Marcella Nunez-Smith, « Distribution of cholesterol in Caribbean marine », *algae, Steroids*, 58(1993).
17. Venkateswarlu B. Das, Y. K. V. N. Srinivas and A. V. Rama Rao; « 5 α -poriferast-9(11)-en-3 β -ol from the marine red alga, *Gracilaria Edulis* », *Phytochemistry* 31(1992).
18. Jorge A. Palermo, Alicia M. Seldes and Eduardo G. « Gros, Free sterols of the red alga *Gigartina skottsbergi* », *Phytochemistry* 23(1984).
19. Georges Combaut, Louis Codomier, Jean Teste and Marianne Pedersna, « The occurrence of C₂₈ sterols in red algae », *Phytochemistry* 20(1981).
20. Alcaide A, M. Barbier and P. Potier, A. M. Magueur and J. Teste, « Nouveaux résultats sur les stérols des algues rouges », *Phytochemistry* 8(1969).
21. Belisario Penna Lisboa, Ingrid Ganschow, John M. Halket and Francisca Pinheiro-Joventino, « The trace sterols of the red alga *laurencia papillosa* investigated by open tubular capillary column gas chromatography-mass spectrometry », *Comparative biochemistry and physiology part B: Biochemistry and molecular biology*, 73(1982).
22. Govenkara M. B. and S. Wahidulla, « Free sterols of the red alga *Chondria armata* (Kütz.) Okamura », *Botanica marina* 43(2000).
23. Jyh-Horng Sheu, Shiang-Yuh Huang, and Chang-Yih Duh, « Cytotoxic oxygenated desmosterols of red alga *Galaxaura marginata* », *Journal of natural product*, 59(1996).
24. Francisco C, G. Combaut, J. Teste, C. Tarchini and Carl Djerassi, Side chain-hydroxylated sterols of the red alga *asparagopsis armata*: Significant products or artifacts due to autoxidation?, *Steroids* 34(1979).
25. Georges Combaut, Yves Bruneau, Louis Codomier et Jean Teste, « Comparative sterols composition of the red alga *asparagopsis armata* and its tetrasporophyte *falkenbergia rufolanosa* », *Journal of natural products*, 42(1979).
26. Viqar Uddin Ahmad, Abadul Hayee Memon, Mohammad Shaiq Ali, Shaista Perveen and Mustafa Shameel, Somalenone, « A C₂₆ Sterol from the marine red alga *melanothamnus somalensis* », *Phytochemistry* 42(1996).
27. Stephen L. Brothers and Leal G. « Dickson, Sterols of *Goniotrichum elegans* », *Phytochemistry* 19(1980).

Références bibliographiques

28. Graeme A.Dunstan*, Malcolm R. Brown, John K.Volkman, « Cryptophyceae and rhodophyceae; chemotaxonomy, phylogeny and application », *Phytochemistry* 66(2005).
29. Leland L. Smith, AmiyaK.Dhart 1, James L.Gilchrist and Yong Yenglin, Sterols of the brown alga *Sargassumfluitans**1, *Phytochemistry* 12(1973).
30. Tang, Hai-feng; Yang-hua, Yi; Yao, Xin-sheng; Xu, Qiang-zhi; Zhang, Shu-yu; Lin, Hou-wen, « Bioactive steroids from the brown alga *sargassumcarpophyllum* », *Journal of Asian natural products research* 4(2002).
31. Zornitsa gancheva kamenarska, Stefka dimitrova dimitrova-konaklieva, Kamenljubomirovstefanov and Simeon simeonov popov, « A comparative study on the sterol composition of some brown algae from the black sea », *J.Serb.Chem.soc* 68(2003).
32. Sánchez-machado D.I, J.López-hirnández, P.Paseiro-losada and J.López-cervantes, « An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds », *Biomedical chromatography* 18(2004).
33. Robert duperon, Martine thiersault and paulettduparon, « Occurrence of steryl glycosides and acylatedsteryl glycosides in some marine algae », *Phytochemistry* 22(1983).
34. Betty matsuhira and Alejandro urzua, « Sterols of some Chilean algae », *Biochemical systematics and ecology* 12(1984).
35. HalaS .Aleasa, Jean-michel kornprobst and A.M.Rizk, « Major sterols composition of some algae from Qatar », *Phytochemistry* 39(1995).
36. P.Moreno, G.Petkov and G.Garsia, « Lipids, fatty acids and sterols of *cystoseiraabies-marina* » *Botanica marina* 41(1998).
37. Iatrides M.C, J.Artaud, M.Derbesy, J.Estienne, « Identification de constituants lipidiques dans des algues brunes sources d'alginate », *Ann.Fals.Exp.chim* 71(1978).
38. Beatriz G.Fleury,* Marcos V.G.Pereira, José R.P.DaSilvat Michel kaisin, ValériaL.Teixeira and Alphonse kelecom, « Sterols from Brazilian marine brown algae », *Phytochemistry* 37(1994).
39. Jyh-Horng sheu, Guey-horng wang, Ping-jyun sung, Yen-hung chiu, and chang-yih duh, « Cytotoxic sterols from the Formosan brown alga *turbinariaornata* », *Planta med* 63(1997).
40. Joan D.Newburger, J.Johnuebel , Miyoshi Ikawa, Kenneth K. Andersen and Robert B.Gagosian, « Sterols of *agarumcribosum*: desmosterol in a brown alga », *Phytochemistry* 18(1979).

Références bibliographiques

41. K.Stefanov, St.Dimitrova -Konaklieva, X.Frette, D.Christova, Ch.Nikolova and S.Popov, « Sterols and acylglycerols in the brown algae *zardiniaprototypusnardo* and *striaria attenuate* » Grev. From the black sea, *Botanica marina* 43(2000).
42. José-luis Giner and Gregory L.Boyer, « Sterols of the brown tide alga *aureococcusanophagefferens* », *Phytochemistry* 48(1998).
43. Georges combaut, Abidayacoubou, Louis pioveti and Jean-Michel kornprobst, « Sterols of the Senegalese brown alga *padina vickersiae* », *Phytochemistry* 24(1985).
44. Zornitsa kamenarska, Funda N, Yalcin , Tayfunersoz,IhsanÇalis, Kamenstefanov and simeonovpopov, «Chemical composition of *Cystoseira crinita* bory from the eastern Mediterranean,» (2002).
45. Tsenkamilkova, Georgitaley, Rumen christov, Stefkadimitrova-konaklieva and Simeon popov, «Sterols and volatiles in *Cystoseira barbata* and *Cystoseira crinite* from the black sea», *Phytochemistry* 45(1997).
46. José-Luis Giner, Xiaoyong li, Gregory L. Boyer, « Sterol composition of *Aureoumbra la gunensis*, the Texas brown tide alga», *Phytochemistry* 57(2001).
47. G.W. Patterson, « Sterols of *nitella* and *chara vulgaris*», *phytochemistry*,(1972).
48. Ivayloe lenkov, Tamara georgieva ,Petiaha djieva,Stefkadimitrova-konaklieva and Simeon popov. «Terpenoids and sterols in *cladophora vagabunda*», *phytochemistry* ,(1994).
49. Ia rubinstein, and L. Johngoad. «Sterols of the siphonous marine alga *codium fragile*» .*phytochemistry* (1973).
50. By Mary linklosty and Werner Bergmann.sterols of alga «The occurrence of ergasterol sterol in *chlorella pyranoidosa*», (1952).
51. Meledath govindan, Janice D.Hodge, KevinA.Brown and Marcella nunez-smith. «Distribution of cholesterol in Caribbean marine algae». *Steroid*, (1993).
52. Hala S. Aleasa, Jean Michel kornprobst and A.M.Rizk; « .Major sterol composition of some algae from Qatar» .*phytochemistry*, (1995).
53. William R.Nes and John E.Zaremba. « Proof of structure for 24β-Methylcholesterol in the alga *coccomyxa elongate* by ¹H-and ¹³C-NMR and mass spectroscopy» .*Journal of natural product* (1981).

Références bibliographiques

54. Robert valls, Jacquesartaud, Albertarchavlis, Nardovicente et Louis piovettd. «Composition stérolique de l'extrait de caulerpa taxifolia récemment introduite en méditerranée». *Oceanologica*, (1994).
55. Taka akiaratani, Masayoshiokano, Yumiko funaki ,and Fumie mizui.« Seasonal variation of sterol, Hydrocarbon and fatty acid fractions in *codium fragile* (sur) Hario» .Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries, (1981).
56. Glenn W.Patterson, Kyle C .Mckenna,William R .Lusby,and Mary A.Bisson.« Sterols of the charophyceae» .Journal of natural product, (1991).
57. Abdel-Fattah A.F. and M.Edress. « Seasonal changes in the constituents of *ulva lactuca*» phytochemistry, (1973).
58. Werner Bergmann and Robert J .Feeney. « sterols of algae .the occurrence of chondrilla sterol in *scenedesmus obliquus* », (1950).
59. Cranwell. P.A, G.H.M. Jaworski and H.M. Bickley.« Hydrocarbons,sterols,esters and fatty acids in six freshwater chlorophytes» .phytochemistry,(1989).
60. M. Aknin, R.Moellet-Nazaou, J.M.Kornprobst, E.M.Gaydou, A.Samb and J.Miralles. « sterol composition of twelve chlorophyceae from the Senegalese coast and their chemiotaxonomic sineficance» .phytochemistry, (1992).
61. José Luis Giner 1 and Carl Djerassi. «Evidance for sterol side-chain dealkylation in *chlamydomonas reinhardtii*» .phytochemistry, (1992).
62. Choi, KJ;Nakhost, Z;Barzana, E;Karel,M.« Lipid content and fatty acid composition of green algae *Scendesmus obliquus* grown in a constant cell density apparatus.» Food Biotechnology, (1987).
63. Takao Yokota, Seong Ki Kim, Yoshito Fukui, Nobutaka takahashi, Yasutomo Takeuchi and Tetsuo Takematsu. « Brassinosteroids and sterols from a green alga, *Hydrodictyon reticulatum*: configuration at C-24» , *Phytochemistry*,26(1987).
64. Orcutt .D.M and B.Richardson ; « sterol of *oocystis polymorpma*; a green alga. *Steroids*», (1970).
65. Gibbons G.F, L.J. Goad and T.W. Goodwin.« The identification of 28-isofucoesterol in the marine green algae *Enteromorpha intestinalis* and *Ulva lactuca*» .*Phytochemistry*, (1968).
66. Lorenzo De Napoli, Silvana Magno, Luciano Mayol, and Ettore Novellino. « Sterol composition of some Mediterranean green algae». *Phytochemostry*,(1982).

Références bibliographiques

67. Dan C. Wright, Linda R. Berg and Glenn W. Patterson. « Effect of cultural conditions on the sterols and fatty acids of green alga ». *Phytochemistry*, (1980).
68. Viqar Uddin Ahmad, Rahman Aliya, Shaista Perveen and Mustafa Shameel. « A sterol glycoside from marine green alga *Codium iyengari* » ; *Phytochemistry*, (1992).
69. Vassya Bankova, Kamen Stefanov, St. Dimitrova-Konaklieva, Gergana Keremedchieva, Xavie Frette, Christina Nikolova, Atanas Kujumgiev & Simeon Popov. « Secondary metabolites and lipids in *Charaglobularis Thuill.* », *Hydrobiologia*, (2001).
70. Rzama. A., E.J. Dufourc and B. Arreguy, « Sterols from green and blue-green algae grown on reused waste water », *Phytochemistry* 37(1994).
71. Naima el hattab, yasminadaghbouche, Mohamed el hattab, Louis piovetti Salvador garrigues, Miguel de la guardia. « FTIR-determination of sterols from the red alga *Asparagopsis armata* comparative studies with HPLC ». *Talanta*, (2006).
72. Naima el hattab, yasminadaghbouche, Mohamed el hattab, Louis piovetti Salvador garrigues, Miguel de la guardia, « Determination of total sterols in brown algae by fourier transform infrared spectroscopy », *Analytica Chimica Acta*, (2008).
73. PATTERSON. D.W, « Physiology and Biochemistry of sterols » Eds. G.W. Patterson et W.D. Nes, A.O.C.S. Monograph, Champaign IL (1991).
74. Piero pollesello, Renato toffanin, Erminio murano, Sergio paoletti, Roberto rizzo and Bjarne J.Kvam, « Lipid extracts from different algal species: ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopic studies as a new tool to differences in the composition of fatty acids, sterols and carotenoids » *Journal of applied phycology*, (1992).
75. Zornitsa Kamenarska, Funda N. Yalcin, Tayfun Ersöz, Ihsançalis, Kamen Stefanov and Simeon Popov, « Chemical composition of *Cystoseira crinita* bory from the eastern Mediterranean, *Z. Naturforsch.* » ,57(2002).
76. Szafran, Z., Pike R. M., & Singh, M. M. *Microscale Inorganic Chemistry; « A comprehensive Laboratory Experience »*. John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, (1991).
77. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse. « Caractérisation et quantification des minéraux

Références bibliographiques

- argileux dans les sols expansifs par spectroscopie infrarouge aux cellules du laboratoire et du terrain», (2010).
78. Beebe K, R. Pell, M. B. Scasholtz, *Chemometrics, Guide pratique*, Wiley, New York, (1998).
79. Chemometrics World - John Wiley & Sons, Ltd.: <http://www.wiley.co.uk/wileychi/chemometrics/>.
80. Homepage of chemometrics info on multivariate calibration data analysis.
81. Chemometrics (Martin Huehne) : <http://tmec.nectec.or.th/thfi/chemom.htm>.
82. Fuller M.P., Ritter G.L., and Drapper C.S. « Partial Least-squares Quantitative Analysis of Infrared Spectroscopic Data » Part I: Algorithm Implementation et part II : Application to detergent Analysis *Applied Spectroscopy*,42(1988).
83. Draper. N, H. Smith, *analyse de régression appliquée*, deuxième ed, Wiley, New York, (1981).
84. Massy. W, « régression de composants principaux dans la recherche statistique exploratoire», *J. AM. Stat. Assoc.* 60 (1965).
85. Webster.J, R. Gunst, maçon de R., « analyse de régression de racine latente, *Technometrics* » 16 (1974).
86. Helland.I, la régression des moindres carrés partielle, *Commun. Stat., B*, simulations Comput. 17 (1988).
87. K.C. Li, «régression inverse découpée en tranches pour la réduction de dimension», *J. AM. Stat. Assoc.* 86 (1991).
88. M. Pierre, ruisseaux de R., « régression de continuum : régression des moindres carrés d'embranchement de prévision et partielle ordinaire séquentiellement construite croix-cross-validated de composant des moindres carrés et principal », *stat royale de J.Soc. B* 52 (1990).
89. Næcs.T, T. Isaksson, « choix des échantillons pour le calibrage en spectroscopie near-infrared. Principes généraux de la partie 1». illustrés par l'exemple, *APPL. Spectrosc.* 43 (1989).
90. Jong de S., H. Kiers, « régression principale de covariates. Partie, théorie, laboratoire intelligent de Chemometrics». *Système.* 14 (1992).
91. Primer. A, Bryan F.J. « *Manly.Multivariate Statistitcal Methods* » .ed: Chapman & Hall London.

Références bibliographiques

92. Hart B.K., Berry R.J., Griffiths P.R., Tucker Melissa D. ed: ShapperRonald E. ed: « Effects of resolution, spectral window, and background on multivariate calibrations used for open-path fourier - tranform infrared spectrometry Field analytical chemistry and technology », 3(1999).
93. Kurmer J., Barnes R., Wabuye B., Collier J. « Effects of spectral resolution on the identification of specific chemical compounds within complex spectral signatures Proceedings of SPIE» , 3533 (1999).
94. Che man Y.B., Z.A. Syahariza, M.E.S. Mirghani, S. Jinap , J. Bakar, « Analysis of potential lard adulteration in chocolate and chocolate products using fourier transform infrared spectroscopy» , Food Chemistry 90 (2005).
95. Armenta Sergio, Garrigues Salvador, La Guardia de Migel, Philippe Rondeau, « Attenuated totale reflection-fourier transform infrared analysis of the fermentation process of pineapple » AnalyticaChimicaActa 545 (2005).
96. Iwona Scibisz , Maryse Reich , Sylvie bureau , Barbara Gouble , Mathil de Causse , Dominique Bertrand c, Catherine M.G.C. Renard a. « Mid-infrared spectroscopy as a tool for rapid determination of internal quality parameters in tomato» . Food chemistry 125(2011).
97. Rohman A Sismindari, Y. Erwanto ,Yaakob B. Cheman , « analysis of pork adulteration in beef meatball using fourier transform infrared(FTIR) spectroscopy» .Meat science 88(2011).
98. Dubernet. M, «Analyse instantanée de la qualité des raisins et des mouts par IRTF», Cursos Rioja, France, (2002).

