

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE A. MIRA DE BEJAIA
FACULTE DE TECHNOLOGIE
DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCEDES

LPMTSR

Mémoire de Magister

Présenté par

M^{me} KARA-ABDELFFETTAH Dalila

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Génie des Procédés

Option: Génie Chimique

Thème :

Application de la chimiométrie pour l'étude de la détermination spectrophotométrique simultanée de composés phénoliques dans des mélanges binaire et ternaire

Soutenu le /12/2014

Devant le Jury composé de :

M ^f Benamor Mohamed	Professeur à l'université de Béjaïa	Président
M ^{me} Bourouina Saliha	Professeur à l'université de Béjaïa	Examinatrice
M ^{me} Belkacemi Hayat	MCA à l'université de Béjaïa	Examinatrice
M ^{me} Senhadji Ounissa	MCA à l'université de Béjaïa	Rapporteur
M ^f Kachbi Abdelmalek	MCB à l'université de Béjaïa	Invité

Remerciements

Le travail qui a fait l'objet de ce mémoire a été effectué dans le Laboratoire des Procédés Membranaires et des Techniques de Séparation et de Récupération (LPMTSR) de l'Université A. MIRA Béjaïa, sous la direction de Madame SENHADJI Ounissa, Maitres de conférences classe A à cette Université, que je tiens sincèrement à remercier pour son encadrement, ses conseils durant la réalisation de ce travail, sa disponibilité, sa compréhension et son soutien moral.

Mes remerciements vont également à Monsieur KACHBI Abdelmalek, Maitres de conférences classe B, à l'Université de Béjaïa, pour son aide précieuse dans le traitement des résultats, ses remarques et conseils très précieux, et pour sa disponibilité.

Je remercie le Professeur BENAMOR, pour avoir accepté de présider le jury, ainsi que les membres du jury : Mme BOUROUINA et Mme BELKACEMI pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens aussi à exprimer ma sympathie à l'ensemble des membres du laboratoire LPMTSR.

Mes remerciements s'adressent aussi au personnel technique du Bloc 11 pour leur disponibilité et leur aide.

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. La chimiométrie.....	4
I.1.1. Définition de la chimiométrie.....	4
I.1.2. Application de la chimiométrie en spectroscopie.....	5
I.1.3. Analyse en composantes principales ACP.....	5
I.1.3.1. Construction du modèle ACP.....	5
I.1.4. Régressions multivariées.....	7
I.1.4.1. Régression linéaire multiple RLM.....	8
I.1.4.2. Régression en composantes principales (RCP) (principal components regression PCR)	8
I.1.4.3. La méthode des moindres carrés partiels PLS.....	9
I.1.5. Quelques travaux sur l'application de méthodes chimiométriques sur des données spectroscopiques.....	12
I.1.6. Conclusion.....	22
I.2. Les extraits de plantes.....	23
I.2.1. Les polyphénols des végétaux.....	23
I.2.2. Méthodes de dosage des extraits de plantes.....	27
I.2.2.1. Analyse par couplage en ligne.....	28
I.2.2.1.1 Couplages de la HPLC avec les techniques spectroscopiques.....	28
I.2.2.1.2. La CPG et les couplages de la CPG avec les techniques.....	30
I.2.2.2. Identification des constituants après purification.....	32
I.2.2.3. Identification des composés par RMN ¹³ C sans séparation préalable.....	33
I.3. Analyse des polyphénols totaux.....	35
I.4. Dosage des acides phénoliques.....	36
I.5. L'analyse spectroscopique UV-Vis	37

CHAPITRE II

MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE ET TECHNIQUES D'ANALYSE

II.1. Produits chimiques, appareillages et logiciels utilisés.....	39
II.1.1. Produits chimiques.....	39
II.1.2. Appareillages.....	39
II.1.3. Logiciels.....	40
II.2. Protocoles expérimentaux.....	40
II.2.1 Étude de la variation de l'absorbance en fonction de la concentration du composé.....	40
II.2.2. Elaboration des courbes d'étalonnage pour chaque composé.....	41
II.2.3. La détermination simultanée de l'acide gallique et de l'acide caféique dans le mélange binaire, et dans le mélange ternaire avec la quercétine.....	42
II.2.3.1. Etape d'étalonnage.....	42
II.2.3.2. Etape test.....	44
II.2.3.3. Sélection du nombre optimum de facteurs.....	44
II.2.3.4. Paramètres statistiques.....	44

CHAPITRE III

RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION

III.1 Étude de la variation de l'absorbance en fonction de la concentration du composé.....	46
III.2. Elaboration des courbes d'étalonnage pour chaque composé.....	49
III.3. Etude des mélanges.....	51
III.3.1. Mélange binaire.....	52
III.3.1.1 Etape d'étalonnage.....	52
III.3.1.2. Résultats de la validation : étape test.....	55
III.3.2. Mélange ternaire.....	58
III.3.2.1. Etape d'étalonnage.....	58
III.3.2.2. Résultats de la validation : étape test.....	60
III.4. Conclusion.....	66
Conclusion générale	67

Liste des figures

Figure I.1 : Représentation graphique de l'analyse en composantes principales.....	7
Figure I.2 : Structure chimique de la quercétine.....	23
Figure I.3 : Processus de formation des acides phénoliques à partir de la phénylalanine.....	24
Figure I.4 : Structure chimique de l'acide caféique.....	25
Figure I.5 : Structure chimique de l'acide gallique.....	25
Figure I.6. Structures de l'acide gallique et d'un tannin gallique.....	27
Figure II.1. Représentation graphique de 14 échantillons d'étalonnage.....	43
Figure II.2. Diagramme de composition des échantillons d'étalonnage.....	44
Figure III.1 : Spectres d'absorption UV des échantillons de l'acide gallique.....	46
Figure III.2 : Spectres d'absorption UV de l'acide caféique à différentes concentrations.....	47
Figure III.3. Spectres d'absorption des échantillons de la quercétine	48
Figure III.4. Courbe d'étalonnage des spectres d'absorption de l'acide gallique	49
Figure III.5. Courbes d'étalonnage des spectres d'absorption de l'acide caféique : à 217 nm, 288 nm et 312 nm.....	50
Figure III.6. Courbes d'étalonnage des spectres d'absorption de la quercétine : à $\lambda=256$ nm et $\lambda=373$ nm.....	51
Figure III.7. Spectres d'absorption des échantillons d'étalonnage du mélange binaire.....	54
Figure III.8: Courbes de PRESS en fonction du nombre de composantes principales PLS pour le mélange binaire.....	55
Figure III.9. Spectres d'absorption UV des échantillons test du mélange binaire.....	56
Figure III.10 : Concentration prédite des échantillons test, en fonction de leur concentration mesurée.....	58
Figure III.11. Spectres d'absorption des échantillons d'étalonnage du mélange ternaire.....	60
Figure III.12 : Courbes de PRESS en fonction du nombre de composantes principales.....	62
Figure III.13. Spectres d'absorption UV-Visible des échantillons test du mélange ternaire...	63
Figure III.14.a : Concentration prédite en acide caféique des échantillons test, en fonction de leur concentration mesurée.....	65
Figure III.14.b : Concentration prédite en acide gallique des échantillons test, en fonction de leur concentration mesurée.....	65
Figure III.14.c : Concentration prédite en quercétine des échantillons test, en fonction de leur concentration mesurée.....	65

Liste des abréviations

A: Absorbance ou densité optique

ACP: Analyse en composantes principale

A_{\max} : Absorbance maximale

C: Concentration

CP: Composante principale

CPs: Composantes principales

LV: Variable latente

LVs: Variables latentes

MCR: Multivariate Curve Resolution

ORAC Oxygen Radical Absorbance Capacity

PLS : Moindres carrés partiels (Partial Least Squars)

PRESS : Somme des carrés des erreurs de prévision

RCP: Régression en composantes principales

REP: Erreur relative de prédiction

RLM : Régression linéaire multiple

RMSD : Racine de la moyenne des carrés des différences

RMSECV : Racine de la moyenne des carrés des erreurs de la validation croisée

TAN : Total Acid Number

λ : Longueur d'onde (nm)

λ_{\max} : Longueur d'onde correspondant à l'absorbance maximale

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le contrôle de qualité des produits alimentaires et la détermination de leurs composition devient de plus en plus importante.

La teneur en antioxydants présente un critère très important pour certains produits de l'agriculture, car ces composés jouent un rôle important dans la prévention de certaines maladies tel que les maladies cardiovasculaires, les gastrites chroniques et certains cancers, comme ils ont un effet antiprolifératif sur certaines lignées cancéreuses humaines [1], et ils sont aussi connus pour leur propriété anti-inflammatoire [2, 3].

En effet, les antioxydants sont des substances qui sont capables de ralentir le phénomène d'oxydation des produits naturellement oxydables à l'air, en augmentant le temps au bout duquel intervient une altération décelable de ce dernier. Ce sont d'ailleurs, des additifs largement utilisés dans l'industrie agroalimentaire [4].

Une grande famille présentant ces antioxydants sont les composés phénoliques, notamment les polyphénols [2]. Les composés phénoliques sont largement répandus dans les végétaux où ils sont souvent combinés à des sucres sous forme de glycosides ou d'esters comme c'est le cas des acides phénoliques et leurs aldéhydes correspondants, par exemple [5].

L'identification et le dosage de ces différents composés nécessite généralement une séparation préalable réalisée, le plus souvent par une méthode chromatographique, qui prends du temps à réaliser et qui nécessite le plus souvent un équipement couteux et l'usage de plusieurs solvants.

Les techniques de spectrophotométrie sont le plus souvent utilisées en deuxième lieu, pour l'identification des produits de la séparation chromatographique, parce que, généralement sans séparation préalable, les spectres d'absorption se chevauchent, ce qui rend le résultat d'analyse non-exploitable pour l'analyse quantitative.

Les méthodes chimiométriques (méthodes d'analyse multivariées) permettent justement le traitement de ce genre de données non-exploitables, ce qui donne la possibilité

de réaliser l'analyse des mélanges directement par spectroscopie sans avoir besoin de la chromatographie. Cela permet la réduction de la durée de l'analyse ainsi que son coût, et la simplifie considérablement. Tout ce qui vient d'être cité fait que l'analyse multivariées soit une approche très intéressante dans le domaine de la chimie et pour le contrôle de qualité dans l'industrie agroalimentaire.

D'ailleurs, de nombreux travaux ont été réalisés et ont donné des résultats très satisfaisants dans l'analyse quantitative, et plusieurs méthodes chimiométriques ont montré leurs efficacité, principalement : la régression en composantes principales PCR (*Principal Component Regression*) et la régression aux moindres carrés partiels PLS (*Partial Least Squares*) [6].

L'objectif de ce travail est la réalisation de modèles mathématiques permettant la détermination quantitative des composés phénoliques (acide gallique, acide caféique et quercétine) dans des mélanges préparés au laboratoire, sans avoir à les séparer au préalable. Ces modèles sont réalisés en utilisant une méthode d'analyse multivariées : la Régression aux Moindres Carrés Partiels (PLS), et ceci en exploitant leurs spectres d'absorption dans l'Ultraviolet-Visible.

Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique, composée de deux parties :

➤ La première partie est consacrée aux méthodes chimiométriques, définition, et présentation des méthodes les plus largement utilisées, et plus particulièrement la PLS, qui est la méthode chimiométrique utilisées au cours de ce travail pour l'exploitation et la modélisation des données spectrales. Dans cette partie, nous avons cité quelques travaux réalisés dans le domaine de la chimie en appliquant ces différentes méthodes.

➤ Dans la deuxième partie, sont présentées des généralités sur les polyphénols des plantes et les différentes classes de ces composés, et mentionne quelques méthodes utilisées pour leur extraction et dosage.

Le deuxième chapitre décrit la mise en œuvre expérimentale et les techniques de mesure : les produits chimiques utilisés, les instruments de mesure, ainsi que les logiciels utilisés. Dans ce chapitre, nous exposons aussi la préparation des solutions et la conception des mélanges.

Les résultats de cette étude, et leurs interprétations sont donnés dans le troisième qui comporte trois parties:

➤ L'étude des spectres d'absorption UV des composés phénoliques (acide gallique, acide caféique et quercétine) où nous avons déterminé l'intervalle de validité de la loi de Beer Lambert, les équations de régression et les coefficients de corrélation pour chaque composé.

➤ L'étude du mélange binaire acide gallique-acide caféique, la construction du modèle d'étalonnages multivariés PLS en se basant sur les spectres d'absorption UV. La fiabilité de ce modèle a été vérifiée en l'appliquant sur des échantillons test.

➤ Et enfin, l'étude du mélange ternaire avec un travail similaire à celui réalisé avec le mélange binaire mais avec un constituant supplémentaire : la quercétine.

Les résultats les plus importants et l'essentiel des aboutissements de ce travail, sont regroupés dans la conclusion générale.

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. La chimiométrie

I.1.1. Définition de la chimiométrie

La chimiométrie est un outil permettant l'exploitation de données physico-chimiques expérimentales ou connues. Elle est fondée sur la construction d'un modèle mathématique, puis son exploitation et ce en se servant des statistiques. Elle trouve son intérêt dans le traitement des systèmes complexes dits multivariés.

De nos jours, la chimiométrie, ou bien l'analyse multivariée, englobe l'ensemble des applications des méthodes statistiques et mathématiques tout en se servant de l'outil informatique, dans différents domaines : la chimie, la physique, l'économie et la sociologie, alors qu'au départ elle se limitait à l'analyse des données en chimie analytique, d'où cette appellation restrictive à ce domaine qui vient d'ailleurs de l'anglais : *chemometrics*, proposé par le Suédois Svante Wold et l'Américain Bruce Kowalski.

La chimiométrie consiste à élaborer un modèle mathématique liant deux blocs de variables : des variables \mathbf{X} dites indépendantes et qui sont facilement obtenues ou mesurées, et des variables \mathbf{Y} dites dépendantes et dont la détermination est beaucoup plus complexe. Ce modèle devrait permettre la détermination des valeurs des variables \mathbf{Y} rien qu'en ayant celles des \mathbf{X} . [6]

En chimie, la modélisation passe par deux étapes : l'étape d'étalonnage ou modélisation, et qui permet la détermination de la relation $\mathbf{Y} = f(\mathbf{X})$ liant les deux blocs de variables en utilisant des échantillons dits échantillons d'étalonnage et dont les valeurs \mathbf{X} et \mathbf{Y} sont connues. Les paramètres du modèle sont appelés coefficients de régression. La deuxième étape est appelée étape de prévision ou d'essai, les échantillons utilisés pour cette étape sont différents des échantillons d'étalonnage et sont appelés échantillons de prévision ou d'essai. Elle consiste à obtenir les variables indépendantes de ces échantillons, et de les utiliser en se servant du modèle élaboré pour prévoir les valeurs des variables dépendantes.

Une étape de traitement préalable des données est utile : centrer et réduire les données de \mathbf{X} et \mathbf{Y} . Centrer les données de chaque variable permet de minimiser l'influence des

variables aléatoires (bruit de fond) et il se fait en retranchant la moyenne de chaque variable, et réduire les données de chaque variable qui se fait en les divisant par son écart type, permet d'homogénéiser les variables du même bloc et de leurs donner un même ordre de grandeur.

I.1.2. Application de la chimiométrie en spectroscopie

Les méthodes chimiométriques peuvent se classer selon deux critères :

1. La nature descriptive de la méthode pour laquelle nous n'avons que les données spectrales, comme c'est le cas de l'analyse en composantes principales (ACP). Et d'autre part nous avons les méthodes prédictives qui nous permettent d'exploiter ces données à fin de prédire une variable qualitative ou quantitative. Parmi ces méthodes nous avons : la régression linéaire multiple (RLM), la régression en composantes principales (RCP) et la régression aux moindres carrés partiels (PLS).

2. Le deuxième critère est la linéarité de la méthode, qui est basée sur l'hypothèse qui suppose que des combinaisons linéaires de variables prédictives peuvent contenir toute l'information utile. Alors que les autres méthodes dites non linéaires ne prennent pas en considération cette hypothèse et elles appartiennent au domaine de l'intelligence artificielle. [7, 8,9]

I.1.3. Analyse en composantes principales ACP

Elle permet de réduire le nombre de données et l'extraction des informations, son principe est de trouver des combinaisons de variables, ou de facteurs, qui décrivent les importantes tendances des données. Elle permet aussi de détecter des sous-groupes d'observations distincts ou encore des observations erronées [6, 7, 10].

L'analyse en composantes principales a été largement utilisée dans le suivi des procédés de fabrication tel que dans les travaux de : Andersson et coll. [11], Blanco et coll. [12], Herkert et coll. [13] et Jouan-Rimbaud et coll. [14].

I.1.3.1. Construction du modèle ACP

Soit \mathbf{X} la matrice de données de dimensions $\mathbf{m} \times \mathbf{n}$; \mathbf{m} : nombre de lignes représentant les échantillons, et \mathbf{n} : nombre de colonne représentant les variables ou bien mesures.

L'analyse en composantes principales décompose \mathbf{X} suivant la formule (I.1) suivante :

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2 \mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_k \mathbf{p}_k^T + \dots + \mathbf{t}_r \mathbf{p}_r^T \quad (\text{I.1})$$

Où : r est le rang de la matrice \mathbf{X}

Le modèle ACP est le plus souvent limité à k composantes principales (\mathbf{t}_i), et la formule (I.1) s'écrit donc comme suit :

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2 \mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_k \mathbf{p}_k^T + \mathbf{E} \quad (\text{I.2})$$

Avec : \mathbf{E} matrice résiduelle contenant les facteurs présentant les petites variances ;

Pour la décomposition de \mathbf{X} ; r doit être inférieur ou égal à la plus petite dimension de \mathbf{X} , c.-à-d., $r \leq \text{minimum}\{\mathbf{m}, \mathbf{n}\}$. Les paires \mathbf{t}_i , \mathbf{p}_i sont ordonnées selon la quantité de variance capturée. Les vecteurs \mathbf{t}_i sont appelés composantes principales ou scores et contiennent des informations sur la façon dont les échantillons se relient entre eux. Les vecteurs \mathbf{p}_i sont appelés vecteurs de changement de base ou loadings et contiennent des informations sur la façon dont les variables se relient entre elles. [15]

L'élaboration du modèle ACP se fait en générale et par défaut après avoir centré et réduit des colonnes de la matrice \mathbf{X} ;

- Centrer les colonnes de \mathbf{X} : c'est soustraire la moyenne de chaque ;
- Réduire les colonnes de \mathbf{X} : c'est diviser chaque colonne par son écart type.

Ces deux opérations nous permettent d'obtenir une matrice \mathbf{X} de moyenne nulle (égale à 0) et de variance égale à un(1).

Dans le cas précédent, colonnes de \mathbf{X} centrées et réduites, les vecteurs de changement de base \mathbf{p}_i , sont des vecteurs propres de la matrice de covariance de \mathbf{X} ; et la décomposition ACP de \mathbf{X} nous donne :

$$\text{cov}(\mathbf{X})\mathbf{p}_i = \lambda_i \mathbf{p}_i \quad (\text{I.4})$$

Où λ_i est la valeur propre liée au vecteur propre \mathbf{p}_i . Les \mathbf{t}_i forment une série orthogonale ($\mathbf{t}_i^T \mathbf{t}_j = 0$ pour $i \neq j$), alors que les \mathbf{p}_i sont orthonormaux ($\mathbf{p}_i^T \mathbf{p}_j = 0$ pour $i \neq j$, $\mathbf{p}_i^T \mathbf{p}_i = 1$ pour $i = j$). [15]

Une représentation graphique de l'analyse en composantes principales (Figure I.1) nous explique les relations entre les différents paramètres du modèle ACP : \mathbf{t}_i , \mathbf{p}_i ; dans ce cas nous avons pris le cas de trois variables (x), qui constituent une base dans laquelle sont représentés les échantillons (i).

Et donc les vecteurs score \mathbf{t}_i sont les projection de \mathbf{X} sur les \mathbf{p}_i . Donc nous avons une relation linéaire :

$$\mathbf{X}\mathbf{p}_i = \mathbf{t}_i \quad (\text{I.5})$$

La décomposition ACP de la matrice X nous donne une deuxième base dont les axes sont appelés « axes principaux » et qui présentent les différentes directions de variation dans le nuage de points représenté par les échantillons. Les directions de ces axes principaux sont décrites par les composantes principales (CP) correspondantes.

Notons que le premier axe principal est représenté par la droite des moindres carrés du nuage de points qui représente la direction de la variation la plus importante.

Et le deuxième axe vient par la suite en considérant la direction de la deuxième variation importante, et ainsi de suite selon le cas et le nombre d'axes nécessaire.

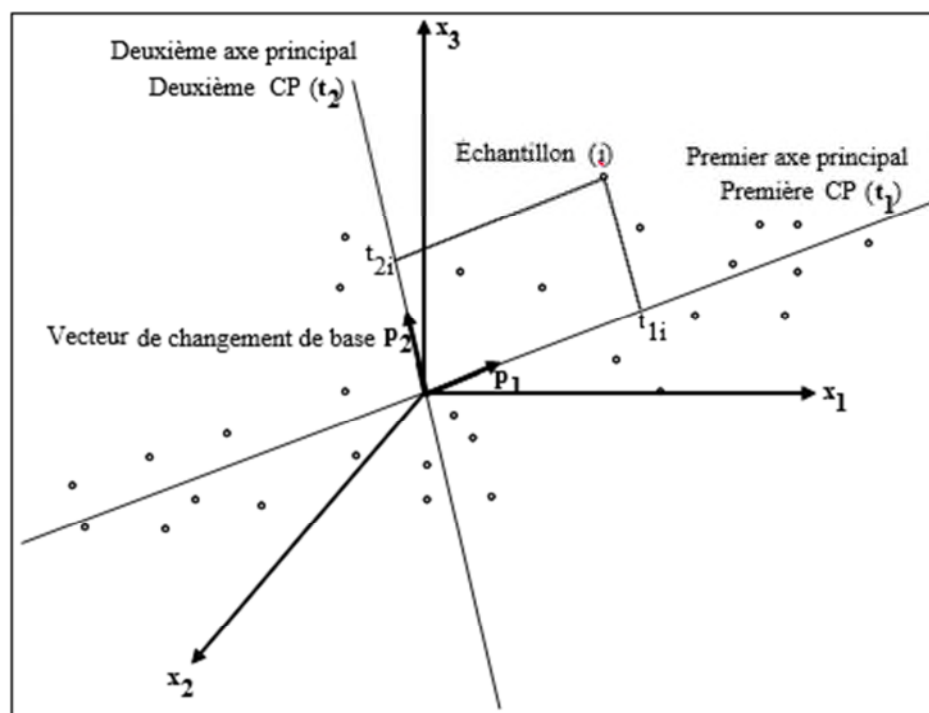


Figure I.1 : Représentation graphique de l'analyse en composantes principales

I.1.4. Régressions multivariées

Elle consiste à établir une relation mathématique qui devrait nous permettre de déduire les valeurs de y à partir des données expérimentales x_j .

Le plus souvent en étalonnage, nous sommes confrontés principalement à trois problèmes :

1. **Le manque de sélectivité** : pour l'analyse en spectroscopie UV/visible nous devons prendre en considération la totalité des spectres et donc des variables x_j (absorbances

aux longueurs d'onde), puisqu'aucune de ces dernières ne suffit pour l'interprétation de y (concentrations des différentes espèces).

2. **Les colinéarités (ou dépendances) :** la colinéarité désigne le fait que certaines variables x_j (absorbances à des pics bien déterminés), peuvent correspondre à des valeurs différentes de y (compositions des différents échantillons). Or, la méthode de régression linéaire multiple traditionnelle suppose qu'à chaque variable x_j correspond une seule et unique information ou bien valeur y . on dit que nous avons une redondance d'information entre les variables x_j ou bien intercorrélation.

Cette redondance, par contre présente deux avantages de grande importance pour une méthode d'étalonnage :

- ❖ Elle permet de diminuer la sensibilité de y au "bruit" ;
- ❖ Elle facilite la détection des points aberrants.

3. **Le manque de connaissance :** en effet, on est jamais sûr de comprendre la signification exacte des données.

En spectroscopie par exemple, le domaine qui nous intéresse, nous savons très bien que dans les mélanges, il peut bien y avoir des interactions qu'on ne comprend pas forcément et qui se traduisent par modification des données spectrales. [16]

I.1.4.1. Régression linéaire multiple RLM

L'application de cette méthode exige que le nombre de variables indépendantes soit inférieur au nombre d'observations pour avoir une solution unique et possible. Ce qui veut dire que, pour une application en spectroscopie par exemple, que le nombre des données des spectres soient inférieur au nombre des échantillons, ce qui n'est plus le cas, et qui nécessite la suppression de certaines variables pour que cette condition soit vérifiée. Le choix des variables à supprimer peut se faire suivant des méthodes bien précises [17].

I.1.4.2. Régression en composantes principales (RCP) (principal components regression PCR)

C'est une méthode de régression qui permet la prise en charge des problèmes posés par la Régression multiple linéaire (RLM).

Elle consiste en une représentation de \mathbf{X} en matrice des composantes \mathbf{T} dont les dimensions à de petites valeurs propres sont exclues.

La transformation est donnée par la relation suivante:

$$\mathbf{T} = \mathbf{X} \mathbf{P}$$

Avec : \mathbf{T} , \mathbf{X} et \mathbf{P} de dimensions $(n \times a)$, $(n \times m)$ et $(m \times a)$ respectivement.

Et la formule RLM s'écrit:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T} \mathbf{B} + \mathbf{E} \quad (18)$$

Avec : \mathbf{Y} , \mathbf{T} , \mathbf{B} et \mathbf{E} de dimensions $(n \times p)$, $(n \times a)$, $(a \times p)$ et $(n \times p)$ respectivement.

La solution :

$$\hat{\mathbf{B}} = (\mathbf{T}' \mathbf{T})^{-1} \mathbf{T}' \mathbf{Y} \quad (19)$$

Les variables de \mathbf{X} sont remplacées par de nouvelles variables qui ont de meilleures propriétés (orthogonalité) et couvrent également l'espace multidimensionnel de \mathbf{X} . L'inversion de $\mathbf{T}' \mathbf{T}$ se fait sans problèmes du fait de l'orthogonalité mutuelle des composantes principales. Les vecteurs \mathbf{t}_h correspondants à de petites valeurs propres ne sont pas pris en compte, pour éviter le problème d'influence de la colinéarité sur la solution [18]. La RCP résout le problème de colinéarité (en garantissant une matrice inversible dans le calcul de $\hat{\mathbf{B}}$, et la capacité d'éliminer certaines composantes principales générant certains bruits (erreurs aléatoires). Cependant, la RCP est une méthode à deux étapes et de ce fait, il y'a le risque que l'information (prédictive) utile existe dans les composantes principales éliminées et que certain bruit demeurera dans les composantes utilisées pour la régression [19].

I.1.4.3. La méthode des moindres carrés partiels PLS

C'est une méthode d'analyse des données proposée par Wold, Albano, Dunn III, Esbensen, Hellberg, Johansson et Sjöström (1983).

Elle est très utilisée dans le domaine de la chimie, particulièrement dans les applications concernant des données de chromatographie ou de spectrographie. La PLS est plus robuste par rapport aux méthodes classiques telles que la régression linéaire multiple RLM et la régression en composantes principales RCP, puisqu'elle cherche à déterminer parmi les variables prédictives (\mathbf{X}), les facteurs présentant le maximum de variance et réalisant la corrélation entre les variables prédictives (\mathbf{X}) et les variables de prévision (\mathbf{Y}), tandis que la RCP ne s'intéresse qu'à maximiser la variance, et la RLM à la corrélation.[16]

Son application passe par deux étapes : élaboration du modèle et son application.

a- Élaboration du modèle

Cette étape consiste à calculer les paramètres du modèle PLS.

Pour ce faire, il existe principalement deux algorithmes : SIMPLS et NIPALS (Non-Iterative Partial Least Squares), le plus souvent utilisé. [20]

L'algorithme NIPALS se base sur le calcul de certains paramètres qui sont : deux paramètres communs avec la RCP : les scores \mathbf{T} et les loadings \mathbf{P} , en plus de vecteurs appelés « poids » : \mathbf{W} ; de dimension identique à celle des loadings.

Tous les paramètres précédents sont calculés pour déterminer les facteurs de l'algorithme PLS, appelés « Variables Latentes » qui maximisent la quantité de la variation expliquée dans \mathbf{X} qui sont pertinents pour la prédiction de \mathbf{Y} .

Notons qu'un des avantages de la méthode PLS est qu'elle soit applicable même aux systèmes ayant plusieurs variables prédites \mathbf{Y} , et dans ce cas là nous devons aussi calculer les matrices scores \mathbf{U} et loadings \mathbf{Q} pour \mathbf{Y} . En plus d'un vecteur reliant les scores des deux blocs \mathbf{X} et \mathbf{Y} : \mathbf{b} appelé « vecteur de coefficients coefficient de régression de la relation intérieure ».

Le calcul de tous les paramètres précédents dans l'algorithme NIPALS se fait par itérations [15] :

Pour commencer, on prend :

$$\mathbf{u}_1 = \mathbf{y}_j ;$$

Avec : \mathbf{y}_j la colonne de \mathbf{Y} ayant la plus grande variance ;

Ou bien : $\mathbf{u}_1 = \mathbf{y}$; dans le cas d'une seule variable \mathbf{Y} .

Et pour la première variable latente, nous avons les formules suivantes :

Pour le bloc \mathbf{X} :

Le poids :

$$\mathbf{w}_1 = \frac{\mathbf{X}^T \mathbf{u}_1}{\|\mathbf{X}^T \mathbf{u}_1\|} \quad (\text{I.15})$$

Les scores :

$$\mathbf{t}_1 = \mathbf{X} \mathbf{w}_1 \quad (\text{I.16})$$

Et pour le bloc \mathbf{Y} :

Les loadings :

$$\mathbf{q}_1 = \frac{\mathbf{Y}^T \mathbf{t}_1}{\|\mathbf{Y}^T \mathbf{t}_1\|} \quad (\text{I.17})$$

Les scores :

$$\mathbf{u}_1 = \mathbf{Y} \mathbf{q}_1 \quad (\text{I.18})$$

Notons que dans le cas où le bloc \mathbf{Y} est univarié, les équations (I.17) et (I.18) ne sont pas nécessaires, et $\mathbf{q}_1 = 1$.

L'équation (I.15) est répétée tant que la marge des erreurs de \mathbf{t}_1 (équation (I.16)) est différente de la marge des erreurs de \mathbf{t}_1 de l'itération précédente. Et ce en utilisant \mathbf{u}_i obtenus à partir de l'équation (I.18).

Lorsque ces marges d'erreurs sont égales, et donc la convergence de l'algorithme est vérifiée, alors il passe à l'équation (I.19) ci-dessous pour le calcul des loadings du bloc \mathbf{X} :

$$\mathbf{p}_1 = \frac{\mathbf{X}^T \mathbf{t}_1}{\|\mathbf{X}^T \mathbf{t}_1\|} \quad (\text{I.19})$$

Les scores du bloc \mathbf{X} sont calculés, et les scores et les poids sont normés comme indiqué dans les équations suivantes:

$$\mathbf{p}_{1\text{nouveau}} = \frac{\mathbf{p}_{1\text{ancien}}}{\|\mathbf{p}_{1\text{ancien}}\|} \quad (\text{I.20})$$

$$\mathbf{t}_{1\text{nouveau}} = \mathbf{t}_{1\text{ancien}} \|\mathbf{p}_{1\text{ancien}}\| \quad (\text{I.21})$$

$$\mathbf{w}_{1\text{nouveau}} = \mathbf{w}_{1\text{ancien}} \|\mathbf{p}_{1\text{ancien}}\| \quad (\text{I.22})$$

On passe en suite à la détermination du coefficient de régression (b):

$$b_1 = \frac{\mathbf{u}_1^T \mathbf{t}_1}{\mathbf{t}_1^T \mathbf{t}_1} \quad (\text{I.23})$$

À la fin de cette procédure, on aura donc déterminé les scores et loadings concernant la première Variable Latente de l'algorithme PLS, et on passe donc à l'évaluation des résidus des \mathbf{X} et \mathbf{Y} :

$$\mathbf{E}_1 = \mathbf{X} - \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T \quad (\text{I.24})$$

$$\mathbf{F}_1 = \mathbf{Y} - b_1 \mathbf{t}_1 \mathbf{q}_1^T \quad (\text{I.25})$$

Pour la deuxième Variable Latente, on doit répéter tout l'algorithme à partir de l'équation (I.15) précédente, avec 2 comme indice, et ce en remplaçant \mathbf{X} et \mathbf{Y} par leurs résidus respectifs \mathbf{E}_1 et \mathbf{F}_1 .

b- Application de la PLS

L'objectif des modèles PLS est de "converger" vers la solution RLM plus rapidement que les modèles RCP.

En PLS, les facteurs (ou bien variables latentes) sont choisis tout en prenant en considération la corrélation existant entre ces derniers et la variable prédite, ce qui n'est pas le cas des modèles RCP.

Le choix du nombre optimal de composantes principales se fait ainsi : minimiser le nombre de facteurs en retenant uniquement les facteurs supplémentaires améliorant le *PRESS* de 2 % minimum (*PRESS* : somme des carrés des erreurs de prévision, dont la formule de calcul sera donnée dans le Chapitre II : Mise En Œuvre Expérimentale Et Techniques D'analyse).

I.1.5. Quelques travaux sur l'application de méthodes chimiométriques sur des données spectroscopiques

L'application de l'analyse multivariée aux résultats d'analyse chimique permet une meilleure interprétation de ces derniers et présente un grand intérêt dans tous les domaines d'application.

Tableau I.1. Quelques travaux réalisés en appliquant les différentes méthodes de chimiométrie dans le domaine de la chimie.

Auteurs	Résumé de la méthode utilisée	Référence
M. Benamor, et <i>al.</i> (2008)	Ils se sont intéressés à la détermination simultanée du calcium et du magnésium spectrophotométrie dérivée d'ordre un et deux. Cette méthode a été appliquée sur les vitamines, le sérum et l'eau et a présenté des erreurs inférieures à 2 %.	[21]

<p>N. Aguerssif, et <i>al.</i> (2008)</p>	<p>Ils ont utilisé deux méthodes : la spectrophotométrie UV-visible première dérivée, et la PLS-2 pour l'analyse de mélanges binaires d'aluminium et de fer.</p> <p>Ces deux méthodes ont donné des résultats de recouvrement similaires, et acceptables pour les échantillons synthétiques, offrant ainsi un moyen simple, rapide et non-couteux pour la résolution de ce mélange binaire, et sont applicables aux échantillons post-hémodialyse.</p>	<p>[22]</p>
<p>A. Kachbi, et <i>al.</i> (2010)</p>	<p>Ils ont appliqué la méthode des Moindres Carrés Partiel (PLS) à la spectrophotométrie Visible pour la détermination simultanée de : cobalt, nickel et cuivre dans les alliages industriels.</p> <p>Ce travail s'est basé sur la formation de complexes des métaux analysés avec le murexide. Cette méthode a présenté des résultats satisfaisants avec de bonnes valeurs de recouvrement.</p>	<p>[23]</p>
<p>P. Valera et <i>al.</i> (1996)</p>	<p>Utilisation de l'analyse discriminante pour la classification des échantillons de thé par leur composition chimique. L'analyse a été appliquée pour des échantillons de thé noir et de thé vert.</p> <p>Les échantillons des deux types de thé sont classés selon six variables présentant : l'extrait aqueux, la teneur en polyphénols totaux, la teneur en acides aminés libres, teneur en caféine, la teneur en théobromine et en théophylline. La corrélation entre ces variables a été étudiée en appliquant l'analyse linéaire discriminante.</p> <p>Cette méthode a montré une excellente corrélation entre les échantillons test et ceux de l'étalonnage.</p>	<p>[24]</p>
<p>Q. Chen et <i>al.</i> (2006)</p>	<p>Ils ont proposé une méthode pour la détermination simultanée des polyphénols totaux et de la caféine contenus dans le thé vert par spectroscopie Infra Rouge</p>	<p>[2]</p>

	<p>(NIR) en utilisant la PLS pour élaborer l'étalonnage. Une méthode rapide appliquée avec succès.</p> <p>Le nombre de composantes principales constituant le modèle a été choisi en fonction de la plus faible erreur quadratique moyenne de la validation croisée (RMSECV) dans l'étape d'étalonnage. Le modèle a été évalué d'après le coefficient de corrélation R entre les résultats de la prédiction et celles de référence pour les échantillons test.</p> <p>Ces coefficients étaient : R=0.9688 pour la caféine, et R=0.9299 pour les polyphénols totaux.</p>	
Q. Chen et al. (2006)	<p>Application de la méthode SIMCA, qui est une méthode d'analyse multivariable, à l'analyse spectroscopie proche infrarouge comme méthode d'analyse rapide pour l'identification des différentes variétés de thé.</p> <p>Cette étude a été appliquée à quatre variétés de thé provenant de quatre régions différentes, et le résultat était satisfaisant.</p>	[25]
B. Lu al. (2011)	<p>Détermination par spectroscopie Infra Rouge, des flavonoïdes et des acides phénoliques dans l'extrait des feuilles de bambou, en utilisant l'analyse multivariable.</p>	[12]
L. Xie et al. (2009)	<p>Classification de différents génotypes de tomate par application des moindres et d'autres méthodes d'analyse à la spectroscopie visible et le proche infra-rouge.</p> <p>La spectroscopie IR est une technique d'analyse qui s'applique au domaine de longueurs d'onde [400 – 1000] nm. Plusieurs méthodes chimiométriques ont été appliquées et leur performance comparée.</p> <p>Ces méthodes ont montré une performance de 100% et une rapidité dans l'analyse.</p> <p>Les résultats de cette étude sont encourageants pour l'application de cette technique dans l'industrie.</p>	[10]

<p>V.R. Sinija et <i>al.</i> (2009)</p>	<p>Estimation de la teneur en caféine dans le thé vert en poudre et granulé, par spectroscopie RT-NIR.</p> <p>Un modèle d'étalonnage a été élaboré pour la caféine pure dans le domaine NIR [4000-12000] cm^{-1}, et a été validé par usage d'échantillons test.</p> <p>La méthode PLS- dérivée d'ordre un a été combinée à la spectroscopie RT-NIR et démontré un excellent résultat avec un coefficient de corrélation R^2 dont la valeur est supérieure à 0,98 et une erreur standard de prédiction ne dépassant pas 2,0. Le nombre de CPs retenues pour le modèle était 6.</p> <p>La technique développée est une méthode de prédiction de la teneur en caféine très rapide, puisque l'analyse s'effectue dans 2 à 5 minutes.</p> <p>Cette technique a été validée par comparaison à la détermination de la caféine par spectroscopie UV.</p>	<p>[27]</p>
<p>R. Ferrer-Gallego et <i>al.</i> (2011)</p>	<p>Détermination des composés phénoliques de la peau de raisin durant la maturité par spectroscopie NIR.</p>	<p>[28]</p>
<p>C. Sârbu et <i>al.</i> (2012)</p>	<p>Analyse multivariable de données chromatographiques et spectroscopique pour la classification et la détermination des empreintes digitales des fruits du kiwi et pomélo.</p> <p>L'analyse des données a été effectuée avec l'application de méthodes multivariées exploratrice telle que la PCA, et LDA appliquée au scores correspondants aux premières composantes principales.</p> <p>L'analyse a été réalisée pour quatre sous-espèces de kiwi et trois de pomélo dans le but de déterminer la technique la plus efficace pour une classification simultanée. Les méthodes chimiométriques utilisées offrent des résultats persistants, mais il paraît que la combinaison de la PCA avec la LDA est la plus puissante.</p> <p>Tous les résultats obtenus ont mis en évidence les similarités et les différences existantes entre les</p>	<p>[29]</p>

	<p>différentes sous-espèces de kiwi et de pomélo.</p> <p>Les méthodes proposées, appliquée à la spectroscopie UV-Vis ou bien HPLC, permettent discrimination différents types, espèces et sous-espèces de fruits en une seule analyse simple et rapide.</p>	
L. Rigoni et <i>al.</i> (2014)	<p>Application des méthodes chimiométriques à la spectroscopie infra rouge pour la quantification des énantiomères de deux principes actifs : ibuprofène et epinephrine. L'erreur de prédiction dans le produit commercialisé était de 7,0 %.</p>	[30]
F. Marini et <i>al.</i> (2011)	<p>Ils ont appliqué les méthodes chimiométriques à l'analyse par HPLC de quatre acides phénoliques de l'huile d'olive : acide caféique, acide synergique, acide vanillique et acide p-hydroxybenzoïque. Leur travail trouve son intérêt dans le fait que les pics représentant ces quatre composés lors de la séparation s'interfèrent ce qui rend leur identification plus difficile. Pour élaborer le modèle mathématique ils ont utilisé une série de 38 échantillons d'étalonnage, et pour sa validation, 21 échantillons test sont utilisés.</p> <p>Ce travail leur a permis une analyse complète des 11 acides phénoliques habituellement trouvés dans l'huile d'olive en un temps très réduit (20nm) et avec une très grande précision : $R^2 > 0,95$ pour tous les constituants.</p>	[31]
F.M.V. Pereira et <i>al.</i> (2008)	<p>Ils ont proposé l'application de la PLS à l'analyse spectroscopique aux rayons X pour l'étalonnage des propriétés des vernis et peintures.</p> <p>Pour les vernis, ils ont choisi comme propriété la densité, et les résultats étaient acceptables : une erreur absolue inférieure à $0,055 \text{ gcm}^{-3}$ sur des densités allant de $0,88$ à $0,92 \text{ gcm}^{-3}$. Et pour les peintures, ils ont choisi d'étalonner la viscosité et l'erreur absolue variée entre $0,4$ et 8 KU pour des valeurs comprises entre 72 et 89</p>	[32]

	<p>KU.</p> <p>L'exploitation par PLS des résultats de l'analyse RX a permis aussi l'étalonnage des deux éléments : carbone et hydrogène.</p> <p>Cette méthode proposée permet de réduire le temps de contrôle de qualité des échantillons étudiés ainsi que les résidus de l'analyse.</p>	
Y. Felkel et <i>al.</i> (2010)	<p>Ils ont appliqué la PLS et la PCA aux résultats de spectroscopie IR pour l'analyse des huiles de moteur utilisés. Ils ont analysé le TAN, qui détermine l'acidité de l'huile et qui est une caractéristique très importante, elle peut être déterminée par différentes méthodes : titrage ; soit par phénolphtaléine ou bien titrage potentiométrique, ou encore par spectroscopie IR.</p> <p>Le modèle PLS a été établi en prenant en considération 5 composantes principales avec une erreur de prédiction sur les échantillons test inférieure à 5 %.</p> <p>Ces méthodes ont présenté une précision meilleure que celle du titrage potentiométrique (erreur de 12 %)</p>	[33]
A. M. Peres et <i>al.</i> (2011)	<p>Usage de méthodes d'analyse multivariées pour la classification de six variétés d'olives cultivées dans la région de Trás-os-Montes au Portugal.</p> <p>La fiabilité de cette méthode est supérieure à 76 %.</p>	[34]
R. Nescatelli et <i>al.</i> (2014)	<p>La fraction phénolique des huiles d'olive extra vierges est analysée par chromatographie, et des techniques chimiométriques de classification sont utilisées dans le but de pouvoir déterminer l'origine de cette huile.</p> <p>La PLS et d'autres méthodes sont utilisées pour l'exploitation des résultats de l'analyse chromatographique et ont présenté une fiabilité de 85 % dans l'étape test.</p>	[35]
W. Zheng et <i>al.</i> (2014)	<p>Ils ont proposé une méthode de classification des produits alimentaires (dont le café, l'huile, la viande et</p>	[36]

	des fruits) par combinaison de méthodes d'analyse spectroscopique et de plusieurs méthodes statistiques de classification dont la PLS. Les meilleurs résultats sont obtenus pour le café avec les différentes méthodes (une précision allant de 94,82 % à 100 % dans le cas de la PLS) et l'ensemble des méthodes a présenté des erreurs de prédiction inférieures à 15 %.	
L. Jiao et al. (2015)	La transformée de Fourier et la PCA sont utilisées pour l'exploitation des signaux chromatographiques dans l'analyse des empreintes génétiques de remèdes traditionnels chinois. Cette technique a permis la réduction du temps d'analyse.	[37]
H. Zhouang et al. (2014)	Classification de racines de <i>Cortex moutan</i> par HPLC de trois régions différentes de Chine. Les chromatogrammes étudiés présentent 14 pics de composés organiques et d'éléments métalliques. Ces résultats sont exploités par PCA, MLR, PLS et autres méthodes. Sept pics et huit métaux permettent la différenciation des échantillons selon leur région de cultivation.	[38]
A. Worachartcheewan et al. (2011)	Prédiction de l'activité anti-radicalaire des dérivés du curcuma. Une classification et étude quantitative ainsi que de la relation structure-activité de 22 échantillons extraits de curcuma a été réalisée. L'analyse PLS et MLR ont été utilisées pour le développement de modèle de régression pour les résultats de l'activité antioxydante et les résultats étaient excellents ($R^2 \geq 0,942$ et $RMSE \leq 0,175$).	[39]
J. Orzel, M. Daszykowski et al. (2014)	Ils proposent une méthode de dépistage du contenu en antioxydants dans les produits alimentaires en utilisant la régression PLS. Le pouvoir antioxydant total et la teneur en polyphénols totaux des extraits sont déterminés par ORAC et essais de Folin-Ciocalteu respectivement. L'erreur de prédiction était 6,29 % pour l'évaluation de	[40]

	la teneur en antioxydants totaux, et de 7,02 % pour les polyphénols totaux.	
M.C. Ortiz et <i>al.</i> (2003)	Ils ont proposé une technique basée sur l'étalonnage multivariées (PLS) pour la détection des faux-positives et faux-négatives (ISO 11843) dans les résultats d'analyse de plusieurs techniques : spectroscopie UV pour l'analyse des triazines (erreur relative de 1,7 % sur l'ensemble des échantillons) ; la voltamétrie pour le cuivre, le plomb, le sélénium et le cadmium (erreur relative maximale de 1,26 % pour l'ensemble de métaux); la spectroscopie à fluorescence pour le naphthalène (erreur absolue de 3,01 %).	[41]
H. Abdollahi (2001)	Ils ont utilisé la PLS pour la détermination simultanée de Cr(VI) et Fe(III) dans des solutions de mélanges synthétiques. Pour la complexation de ces métaux un mélange de réactifs de diphenyle carbazide et 1,10-phenanthroline dans une solution micellaire non ionique de Triton X-100 a été utilisé pour. 15 échantillons synthétiques ont été utilisés dans les intervalles (0,20–6,00) et (0,20–8,00) g/mL pour Cr(VI) et Fe(III) respectivement. L'application de la PLS a donné des résultats très encourageant avec une erreur relative standard de 1,5%.	[42]
H. Abdollahi et <i>al.</i> (2003)	Dans ce travail ils se sont intéressés à l'application de la PLS toujours pour la détermination simultanée de fer et de vanadium. Les intervalles de concentration de ces éléments dans la série d'échantillons sont : 0,20-15,00 mg/mL pour le fer et 0,20-8,00 mg/mL pour le vanadium. La PLS s'est montrée très utile puisqu'elle présentait une erreur relative standard totale de 2,2%.	[43]

<p>A. Afkhami et <i>al.</i> (2004)</p>	<p>Ils ont développé deux méthodes pour la détermination spectrophotométrique simultanée de Zn(II), Co(II) et Ni(II) : en appliquant la PLS et la dérivée successive des rapports des spectres</p> <p>L'analyse a été réalisée après la complexation de ces éléments avec le 1-(2-pyridylazo)2-naphthol en milieu micellaire.</p> <p>Les résultats obtenus par ces méthodes ont été satisfaisants.</p>	<p>[44]</p>
<p>K. Zarei et <i>al.</i> (2006)</p>	<p>Ils ont proposé l'application de la PLS à spectrophotométrie UV-Visible pour la détermination simultanée de fer(II), nickel(II) et cobalt(II) en les complexant avec le 1-(2-pyridylazo)-2-naphtol (PAN) dans un milieu micellaire.</p> <p>La PLS a permis une bonne résolution des spectres de ces complexes et donc la détermination simultanée de ces métaux.</p>	<p>[45]</p>
<p>L. Yuanqian et <i>al.</i> (2002)</p>	<p>Application de la PLS pour la détermination simultanée par spectrophotométrie de Zn, Cd and Pb. Cette méthode est basée sur la réaction de ces ions avec le réactif meso-tetra (4-trimethylammonium phenyl) porphyrin (TAPP) en formant des complexes colorés. La méthode proposée a été comparée à la SAA et appliquée avec succès sur des échantillons de boissons, de poudres de blé, maïs, et lait. Les valeurs de la moyenne de recouvrement étaient 89,6–103,2% avec des valeurs de la racine des carrés des différences R.S.D. de 2,8–7,1%.</p>	<p>[46]</p>
<p>Y. Ni et <i>al.</i> (2002)</p>	<p>Ils se sont intéressés à l'analyse simultanée par la spectrophotométrie des métaux: Co(II), Ni(II), Cu(II), Fe(III) et Cr(III) en utilisant le réactif complexant</p>	<p>[47]</p>

	<p>éthylène diamine tétra acétate (EDTA). Et ils ont appliqué plusieurs méthodes d'analyse multivariable aux résultats obtenus : les moindres carrés classiques CLS, la RCP, la PLS et les réseaux de neurones ANN. La fiabilité de ces méthodes a été comparée en se basant sur deux critères: les erreurs de prédiction et le recouvrement (%).</p> <p>Les modèles les plus intéressants étaient ceux de la PLS et de la RCP.</p>	
S. Wold et <i>al.</i> (1982)	<p>Ils ont appliqué la PLS et PCR à la spectrophotométrie UV visible pour la détermination du Fer, Cobalt, Nickel et du Cuivre, et ce par leur complexation avec du Cu(II) avec 1,5-bis(di-2-pyridilmethylene) thiocarbonohydrazide (DPTH).</p>	[48]
A. M. Rodriguez et <i>al.</i> (1998)	<p>Ont appliqué la PLS pour l'étude de la cinétique de la réaction entre resazurine et sulphide basée sur l'effet catalytique de Co^{2+}, Ni^{2+} et Cu^{2+}.</p>	[49]
J. Ghasemi et <i>al.</i> (2001)	<p>Ils ont appliqué la PLS aux résultats de l'analyse spectrophotométrie UV-visible pour l'étude de la complexation du Co(II), Ni(II) et Fe(III) avec 2-aminocyclo-1-pentene dithiocarboxylic acid (ACDA) en milieu micellaire : acetyl trimethylammonium bromide (CTAB).</p>	[50]
H. Abdollahi et <i>al.</i> (2003)	<p>Dans ce travail, ils se sont intéressés à la complexation de Fe(III), Co(II) et Cu(II) avec 1-nitroso-2-naphtol en milieu micellaire : Triton-X100, en vue de la détermination du Fer, Cobalt et du Cuivre, et ce par application de la PLS à la spectrophotométrie UV visible.</p>	[51]
J. M. Camina et <i>al.</i> (2004)	<p>Étude de la détermination du Cuivre, Zinc et Fer par complexation de Cu(II), Zn(II) et Fe(III) avec le 5-Br-PADAP[2-(5-Br-2-pyridylazo)]-5-diethylaminophenol. Ils ont appliqué la PLS aux résultats de l'analyse</p>	[52]

	spectrophotométrie UV visible.	
L. Hejazi et al. (2004)	Ils ont étudié par la spectrophotométrie UV visible la complexation du : Co(II), Ni(II) et Cu(II) avec le 1-(2-pyridilazo)-2-naphthol (PAN) en vue de leur détermination.	[53]

I.1.6. Conclusion

Les méthodes spectroscopiques sont très utilisées dans l'analyse de mélanges complexes et dans le suivi des différents procédés de transformation. Mais l'interprétation et l'exploitation de leurs résultats nécessite- le plus souvent - de recourir aux méthodes chimiométriques.

La synthèse bibliographique réalisée dans le cadre de ce travail nous montre qu'en plus d'autres méthodes chimiométriques, la régression aux moindres carrés partiels (PLS) est la méthode la plus utilisée pour la résolution des mélanges complexes quel qu'elle soit leur nature : minérale ou bien organique ou même encore la classification de certains produits.

En effet, la PLS permet de remédier à certains problèmes rencontrés pour les autres méthodes et permet ainsi d'obtenir de meilleurs résultats :

La RLM par exemple, présente deux problèmes :

1. Le nombre de variables de réponse (dans le cas de la spectroscopie, les absorbances) est supérieur au nombre d'observation (le nombre de spectres ou d'échantillons d'étalonnage) ;
2. La colinéarité des variables de réponse, ce qui nous donne des résultats de régression instables.

La RCP pour sa part, malgré qu'elle prenne en charge les deux problèmes rencontrés pour la RLM, elle présente un autre problème assez important. En effet cette méthode se base sur la réduction du nombre de variables de réponse : matrice des absorbances \mathbf{X} en variables latentes, mais cette étape ne prend pas en considération la matrice de concentrations \mathbf{Y} .

Dans ce présent travail, nous avons donc décidé d'utiliser la méthode des moindres carrés partiels PLS pour la résolution de deux mélanges : un mélange binaire composé de deux acides phénoliques qui sont l'acide caféique et l'acide gallique ; et un mélange ternaires contenant, en plus des deux constituants du mélange binaire, la quercétine.

I.2. Les extraits de plantes

I.2.1. Les polyphénols des végétaux

Définition

Les polyphénols sont des micronutriments très présents dans notre alimentation : fruits, légumes et plantes comestibles.

Plusieurs études expérimentales et épidémiologiques ont mis en évidence les effets bénéfiques de ces substances contre certaines maladies, dont les maladies cardiovasculaires, les cancers et les neuropathies dégénératives.

Ils sont partagés en plusieurs groupes en fonction de leurs structures chimiques [8], mais la grande majorité de ces corps se trouvent sous forme de complexes, engagés dans des combinaisons avec des substances non phénoliques telles que l'acide quinique et, surtout les glucides sous forme d'esters. Les polyphénols peuvent se dégrader et se transformer sous l'effet des enzymes [54]. Les plus importants polyphénols sont :

A. Les flavanes

Les flavanes renferme la catéchine, l'épicatéchine, et la leucocyanidine, présentes sous formes plus ou mois polymérisées, qui sont les tanins condensés.

B. Les flavonols

Les flavonols sont des composés phénoliques souvent présents sous forme d'hétérosides. Ce groupe de composés contient : la quercétine, le kaempférol, et la gossypétine [55].

✓ La quercétine

La quercétine est un polyphénol appartenant à la famille des flavonols, de formules chimique $C_{15}H_{10}O_7$, sa structure chimique est présentée dans la figure qui suit. Sa masse molaire est 302.24 g/mol.

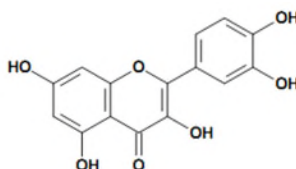


Figure I.2 : Structure chimique de la quercétine [56]

Elle peut se trouver sous sa forme libre comme elle peut se trouver sous forme d'hétéroside. L'une de ses formes c'est la rutine.

C. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des glucosides de flavonols.

D. Les acides phénoliques

Dans la plus part des végétaux, les acides phénoliques sont produits à partir de la phénylalanine, qui est désaminée pour produire l'acide cinnamique, qui est transformé sous l'effet de plusieurs enzymes pour donner les différents autres acides phénoliques, et ce selon un processus appelé « voie de l'acide shikimique », qui est présenté dans la figure I.2. Les enzymes entrant dans ce processus sont : la phénylalanine-ammoniaque-lyase (a), les hydroxylases des acides cinnamiques (b) et p-coumarique (c) ainsi que le système permettant la formation de l'acide benzoïque (d) [8].

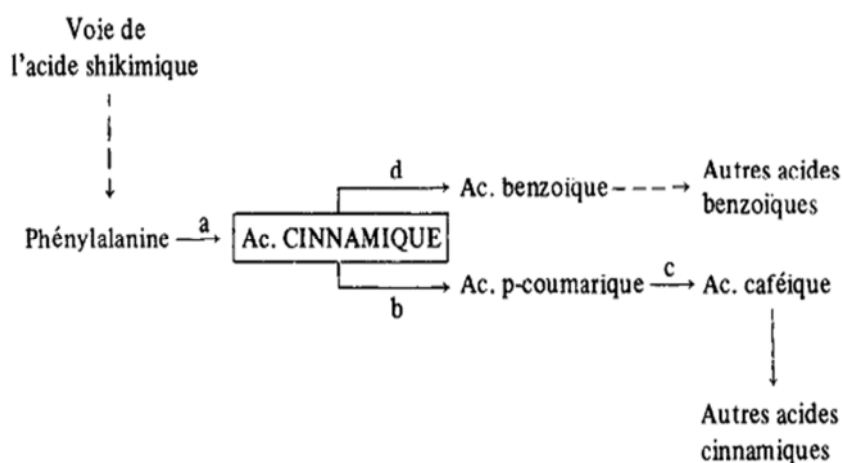


Figure I.3 : Processus de formation des acides phénoliques à partir de la phénylalanine

Les acides phénoliques sont divisés en deux classes:

➤ **Les acides hydroxy-cinnamique, dérivés de l'acide cinnamique**

Les dérivés de l'acide cinnamique comprennent, entre autres, les acides caféique, sinapique, férulique, et les coumarines. Les esters des acides hydroxycinnamiques et de l'acide quinique, les acides chlorogéniques (acide caféyl-3 quinique, acide caféyl-4 quinique et l'acide caféyl-5 quinique), l'acide p-coumaryl-3 quinique, l'acide férulyl-3 quinique, des esters du glucose comme le caféyl-1 glucose, le férulyl-1 glucose, le p-coumaryl-1 glucose et des dérivés estérifiés avec plusieurs molécules d'oses (glucose, rhamnose) et des coumarines [54].

✓ **Acide caféique**

C'est un dérivé de l'acide cinnamique, il se trouve dans plusieurs produits alimentaires d'origine végétales : dans des huiles comme l'huile d'olive vierge, dans laquelle il démontre une bonne résistance à l'oxydation radicalaire, l'huile de soja, les fruits : comme la grenadine, les prunes, dans les boissons et infusions comme le café, le thé, et les jus de fruits, dans les herbes tel que : l'origan, la sauge, le romarin, il existe aussi dans les légumes : la chicorée, l'artichaut, la tomate, la pomme de terre, et dans d'autres produits de l'agroalimentaire.

L'acide caféique se trouve généralement sous forme estérifié avec l'acide quinique, l'acide tartrique, l'acide shikimique, l'acide malique, ou bien du glucose. L'acide caféique existe aussi sous forme d'amidon avec la putrescine. Sa formule chimique est $C_9H_8O_4$, sa masse molaire : 180,157 g/mol, sa structure chimique est la suivante [4] :

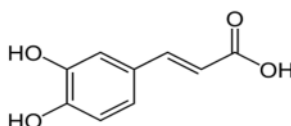


Figure I.4 : Structure chimique de l'acide caféique

➤ **Les acides hydroxy-benzoïques, dérivés de l'acide benzoïque**

Les acides hydroxy-benzoïques sont composés de l'acide gallique, l'acide protocatéchuique et l'acide p-hydroxy-benzoïque. Ils ont, souvent, des structures complexes comme les tannins hydrolysables, qui sont des tanins de l'acide gallique (gallotanins et ellagitanin) [56].

✓ **L'acide gallique**

L'acide gallique est un polyphénol appartenant à la famille des acides phénoliques, c'est l'acide 3, 4, 5-trihydroxy-benzoïque et est un membre de la classe des acides hydroxy-benzoïques. Sa formule chimique est : $C_7H_6O_5$, sa masse molaire : 170,119 g/mol, sa structure chimique est présentée sur la figure I.4 [56].

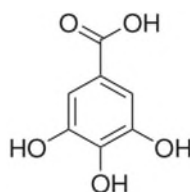


Figure I.5 : Structure chimique de l'acide gallique

Il est présent dans plusieurs végétaux, comme dans l'*E. arborea*, dans lequel il est très abondant [57], les noix de Galle, le sumac, l'écorce de chaine, les feuilles de thé, les raisins et autres végétaux [56]. Il se trouve aussi dans plusieurs produits alimentaires d'origine végétales comme la châtaigne et l'huile de soja, les fruits comme le pomélo, la grenadine, les prunes, le coing, les dattes, la banane, dans les infusions comme de thé. Il est aussi contenu dans les herbes tel que : les clous de girofle, l'origan, la sauge, le romarin et dans les légumes comme le chou-fleur, la tomate, la pomme de terre, et dans d'autres produits de l'agroalimentaire.

Il peut être sous forme condensée, formant des tanins galliques ou bien gallotanins, comme il peut se retrouver sous forme simple. L'acide gallique peut s'obtenir par hydrolyse acide (avec l'acide sulfurique) des gallotanins. Les esters de synthèse, obtenus à partir de l'acide gallique naturel des clous de girofle par exemple, sont utilisés comme antioxydants.

L'acide gallique est souvent utilisé comme référence pour l'évaluation de la teneur en polyphénols des végétaux [57].

Comme tous les antioxydants, il présente des propriétés anti-inflammatoires, anti-tumoral, pro-apoptotique, antibactériennes et antitumorales [56].

✓ **Les tannins hydrolysables**

Les tannins hydrolysables sont des oligo- ou poly-esters de sucre, en général le glucose, et de molécules d'acide-phénol. Ils sont classés selon la nature de l'acide-phénol :

- les tannins galliques qui possèdent un acide gallique (Figure I.5),
- les tannins éllagiques qui ont un acide hexahydroxyphénique. Les tannins éllagiques sont obtenus suite à un couplage oxydatif entre les molécules d'acide gallique.

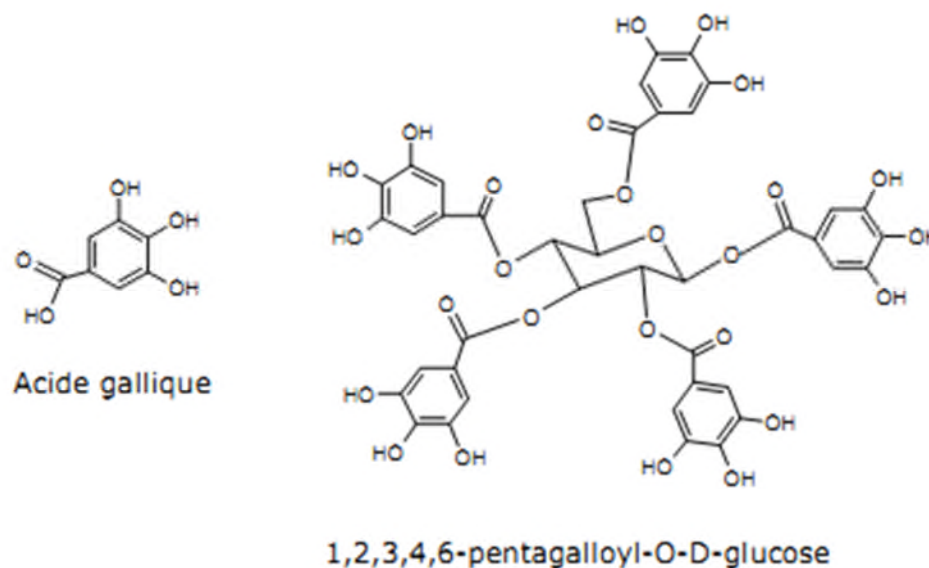


Figure I.6. Structures de l'acide gallique et d'un tannin gallique.

En général, les tannins hydrolysables ont un faible poids moléculaire. Cependant, des couplages oxydatifs entre tannins hydrolysables peuvent produire des polymères de poids moléculaires importants.

Seules les molécules de triesters ou de poids moléculaires supérieurs présentent les propriétés classiques des tannins.

Le terme « tannin hydrolysable » décrit leur sensibilité à l'hydrolyse acide. Ils sont notamment hydrolysés dans le tractus digestif des ruminants et leurs produits de dégradation sont absorbés. Ils peuvent être responsables d'intoxications, lors d'ingestion trop massive, et provoquent des lésions hépatiques et rénales, décrites chez les moutons [58] ou les bovins [59].

I.2.2. Méthodes de dosage des extraits de plantes

La valorisation et/ou la commercialisation des produits naturels quelle que soit leur application, est en général précédée d'une étape de caractérisation qui inclut l'étude de leur composition chimique. Ce travail délicat nécessite de disposer d'outils analytiques rapides et fiables, chacun d'eux possédant sa spécificité et son domaine d'application. Cependant, l'identification et la quantification des constituants d'un mélange naturel demeurent toujours des opérations délicates qui nécessitent souvent l'utilisation conjointe de plusieurs techniques analytiques complémentaires.

L'étude de la composition chimique d'un mélange naturel complexe peut être réalisée selon trois voies différentes:

A. Le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique avec une technique spectroscopique : la chromatographie sépare et quantifie les constituants, et la spectroscopie les identifie en combinaison de leurs données spectrales avec celles de produits connus, donc cette méthode serait applicable pour les échantillons dont les constituants sont connus, notamment dans le domaine de contrôle de qualité.

B. La deuxième, qui est nécessaire lorsque nous avons un mélange ayant des constituants de structures complexes et/ou très proches, ce qui rend leur identification complexe et difficile.

Elle se passe en deux étapes : une étape de purification de tous les composés par chromatographie suivie d'une étude spectroscopique.

C. Une troisième méthode, consiste en l'utilisation de la Résonance Magnétique Nucléaire du carbone ¹³ pour identifier les composés, ou même les quantifier en mélange sans séparation préalable ou bien après une étape de fractionnement minimale.

I.2.2.1. Analyse par couplage en ligne

I.2.2.1.1. Couplages de la HPLC avec les techniques spectroscopiques

La Chromatographie Liquide Haute Performance est une technique de séparation et d'analyse utilisée dans le cas de substances peu ou non volatiles et parfois thermolabiles ou polaires.

Son utilisation seule peut être suffisante dans le cas de mélanges pas très complexes, où nous avons une idée de leurs compositions, mais sinon, dans la plupart des cas, cette technique reste insuffisante, et ne sert donc qu'à séparer les différents constituants du mélange. Et il y a lieu donc de compléter le travail avec une technique spectroscopique pour identifier ces différents composés.

1. Les couplages HPLC-SM et HPLC-SM-SM

Le couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse présente une méthode très adaptée pour l'analyse des extraits de plantes et l'identification de certains de leurs constituants.

Qu'il s'agisse d'esters sesquiterpéniques de champignons [57], d'alcaloïdes, des différents composés phénoliques dans des extraits méthanoliques, ou bien de terpènes dans des extraits au dichlorométhane, ce type de couplage est très largement utilisé.

Cette technique a été aussi utilisée pour l'identification des constituants des huiles essentielles de différentes plantes, le Citrus par exemple [8].

Dans le cas de mélanges assez complexes, la spectrométrie de masse en tandem (SM-SM) couplée avec la HPLC est le plus souvent utilisée. Par exemple, pour la détermination de la streptomycine et de ses dérivés dans le lait et le miel ; ou bien pour l'analyse de procyanidines dans le chocolat [59].

2. Le couplage HPLC-CPG

Dans certains cas, la HPLC ne permet pas une séparation entière des différents constituants, c'est pour cette raison là qu'on procède à un couplage de différentes techniques chromatographiques ; la CPG permet de perfectionner le travail réalisé par la HPLC grâce à son seuil de détection plus important que la HPLC.

3. Le couplage HPLC-RMN¹H

La RMN du proton apporte des informations extrêmement précieuses sur la structure des molécules, mais présente l'inconvénient d'être beaucoup moins sensible que d'autres techniques spectroscopiques comme l'IR et surtout la SM.

Mais le développement technologique a permis de réduire le seuil de détection de RMN à des valeurs de l'ordre de nanogramme.

Le couplage HPLC-RMN¹H peut se faire selon deux modes :

A. Le flux stoppé (stopped flow); dès qu'il y ait élution d'un constituant donné et qu'il est détecté par la sonde du spectromètre, l'élution est arrêtée, le temps d'analyse, avant de reprendre pour les autres constituants.

B. Le flux continu (continuous flow) ; dans lequel l'acquisition des données se fait de façon continue pendant le passage du flux chromatographique (phase mobile avec solutés) à travers la cellule RMN.

Ce couplage a bien prouvé son efficacité dans plusieurs applications, dont l'identification des produits de dégradation issus de l'acide 5-aminosalicylique dans un médicament générique, et l'identification de flavonoïdes dans un extrait méthanolique de feuille de *Sorocea bomplandii* du Brésil [8].

Mais l'analyse de certains mélanges assez complexes tel que les huiles essentielles, n'a pas pu se réaliser à l'aide de cette méthode, ce qui a nécessité de recourir à la deuxième méthode réalisée en deux étapes : purification, puis identification, qui sera décrite dans une autre section.

I.2.2.1.2 La CPG et les couplages de la CPG avec les techniques spectroscopiques

1. La CPG

La CPG est connue par sa haute sensibilité et elle est très utilisée dans le cas mélanges de constituants volatils, mais aussi dans le cas de molécules pouvant devenir volatiles suite à des réactions de dérivation (acétylation, silylation) réalisées sans que ça altère leur structure ou que ça provoque leur décomposition [4].

Elle est très utilisée, notamment dans le domaine des huiles essentielles elle permet la séparation des constituants en utilisant une très petite quantité d'échantillon, inférieure au milligramme. De plus, elle permet une grande adaptabilité par un grand choix de phases stationnaires, de températures (isotherme ou programmée) et de débit de phase mobile, celle-ci pouvant être l'hélium, l'argon, l'azote, le dioxyde de carbone ou l'hydrogène.

Mais elle reste insuffisante pour une identification précise, notamment dans les cas des huiles essentielles, puisqu'en effet, le chromatogramme obtenu, et donc les différents pics et temps de rétention, dépendent de plusieurs facteurs opérationnels : nature de la phase stationnaire, programmation de la température, vieillissement de la colonne, et autres. Donc le paramètre le plus fiable pour l'exploitation du résultat sera les indices de rétention, qui sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane linéaires à température constante, ce qui présenterait un très long travail à réaliser.

Et donc les indices de rétention expérimentaux sont comparés avec ceux de composés de référence, mesurés sur deux colonnes capillaires de polarité différente. Cependant, pour un même composé, il est fréquent de constater des écarts, parfois importants, entre les indices obtenus au laboratoire et les indices publiés dans la littérature. C'est pourquoi, un composé ne peut être identifié uniquement par l'examen de ses indices de rétention sur deux colonnes, à l'exception de quelques monoterpènes usuels.

C'est pour ces raisons là et pour permettre une identification plus fiable par CPG des constituants des huiles essentielles, que divers couplages de la CPG avec des techniques spectroscopiques ont été développés.

2. Les couplages CPG-SM, CPG-SM(ICP), CPG-SM(ICN) et CPG-SM-SM

Le couplage CPG-SM en mode impact électronique (IE), CPG-SM(IE), est la technique utilisée en routine dans le domaine des huiles essentielles.

Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement constituent le spectre de masse de la molécule. Et l'identification d'un composé est faite par comparaison de son spectre à ceux des bibliothèques existantes [13], mais cette comparaison exige que les conditions opératoires soient les mêmes.

Le couplage de la spectrométrie de masse à la CPG sur deux colonnes de polarité différente, et l'exploitation de la combinaison spectres SM-indices de rétention, permet, en général l'identification d'un grand nombre de constituants dans les mélanges complexes dont les huiles essentielles [17].

Cette technique s'avère non efficace dans le cas des huiles essentielles riches en sesquiterpènes et diterpènes, c'est pour cette raison qu'un autre couplage de la SM est envisagé avec une technique « d'ionisation douce » telles que l'ionisation chimique positive (ICP) ou l'ionisation chimique négative (ICN), ces deux techniques produisent des ions quasi moléculaires correspondant à des ions qui ne sont pas visibles en mode impact électronique. Ainsi, la SM-ICP a permis, par exemple, de différencier les quatre stéréoisomères de l'isopulégol grâce à leur spectre de masse obtenu en utilisant l'isobutane comme gaz réactif [60]. La SM-ICP permet également de différencier les alcools et leurs esters par l'observation de leurs pics moléculaires.

D'autres techniques ont été mises en place pour palier aux problèmes rencontrés dans différents domaines et pour lesquels les autres procédés ne donné pas de solutions satisfaisantes : la spectrométrie de masse multidimensionnelle à double analyseur (SM-SM) [61] ou à triple analyseur. En effet, cette technique consiste à sélectionner les ions correspondants à un rapport m/z choisi au moyen d'un premier analyseur qui joue ainsi le rôle d'un filtre et à les envoyer sur un deuxième analyseur. Les fragments de l'ion secondaire constituent un deuxième spectre de masse qui diffère en fonction de l'origine de l'ion primaire [60].

3. La CPG bidimensionnelle

Une technique qui a été récemment mise en œuvre pour individualiser des composés co-éluant en CPG simple. Elle est utilisée dans le cas où la résolution des pics obtenus en CPG est insuffisante pour parvenir à une caractérisation complète de mélanges très complexes [56]. Elle est réalisée en mettant en ligne deux colonnes capillaires, placées dans deux fours. La première colonne est de dimension moyenne (25-30 mètres) et apolaire, la deuxième est plus courte (0,5-0,8 mètre) et polaire. Le dispositif permet de recueillir une fraction non résolue à la sortie de la première colonne pour la réinjecter ensuite dans la seconde colonne,

l'installation est munie de deux détecteurs et d'une vanne d'introduction entre les deux colonnes.

Cette méthode permet de séparer, identifier et quantifier des composés minoritaires pouvant co-éluer avec des composés plus importants.

Elle a été utilisée dans plusieurs domaines : la caractérisation des effluents pétrochimiques, l'analyse des médicaments, dans le domaine alimentaire, dans l'analyse fine des huiles essentielles complexes, qui contiennent de nombreux sesquiterpènes ou diterpènes, ou des sesquiterpènes oléfiniques qui co-éluent avec des monoterpènes oxygénés.

4. Les couplages CPG-IRTF et CPG-IRTF-SM

La spectroscopie infrarouge permet en la couplant à la CPG une identification des fonctions organiques présentes dans les constituants séparés, en comparaison aux spectres de la bibliothèque de spectres infrarouge, présentant ainsi un large domaine d'application ; la chimie organique.

L'efficacité de la spectroscopie infrarouge a été montrée notamment pour l'identification des molécules présentant des spectres de masse superposables tels que les stéréoisomères du farnésol et du menthol [62].

Par ailleurs, d'autres travaux, basés sur les spectres infrarouge et les indices de rétention sur colonne polaire et apolaire, ont permis la différenciation de certains composés dont deux alcools sesquiterpéniques : le 1-endo-bourbonanol et le 1,6-germacradièn-5-ol, qui présentent des spectres de masse identiques [58].

En effet l'installation de chromatographie est couplée en parallèle à la fois au détecteur IR et au spectromètre de masse.

I.2.2.2. Identification des constituants après purification

Cette méthode en deux étapes « purification-identification » est la première qui a été utilisée dans le domaine des huiles essentielles. Avec le développement technologique, elle a été remplacée par la voie A, mais elle reste utilisée dans le cas des mélanges et huiles essentielles complexes vu sa haute fiabilité.

Elle reste particulièrement utile dans le cas où il s'agit de nouvelles molécules à identifier ou de mélanges assez complexes tels que les extraits naturels.

Elle est donc réalisée en deux étapes :

❖ Séparation, par une méthode chromatographique ; permettant ainsi de fractionner le mélange. Cette étape peut être précédée d'une distillation pour séparer les produits lourds des produits légers.

❖ Identification en utilisant une méthode spectroscopique ; réalisée par comparaison du spectre obtenu pour chaque constituant séparé avec ceux de la littérature.

En effet, cette méthode est d'une grande fiabilité, et elle permet l'identification des constituants déjà décrits dans la littérature et les spectres sont connus.

De nombreux travaux ont été réalisés par cette méthode et ont donné des résultats très satisfaisants, ce qui montre l'intérêt de cette technique, dont une série de travaux, réalisés par Weyerstahl et al. [63], sur de nombreuses huiles très complexes, ont permis de déterminer leur composition chimique, tel que l'huile essentielle de Vétiver d'Haiti qui contient de nombreux composés minoritaires (sesquiterpènes) ayant des propriétés physico-chimiques et des données spectroscopiques voisines.

Ainsi, près de 170 composés sesquiterpéniques mono- ou polyfonctionnalisés, ont été identifiés. Certains de ces composés possèdent des squelettes originaux et rares tels que cyclopacamphane, spirovétivane, épi-, seco- et nor-eudesmanes, oppositane [60,64]

I.2.2.3. Identification des composés par RMN¹³C sans séparation préalable

La RMN¹³C a été utilisée en tant qu'outil d'analyse des mélanges naturels au départ pour l'identification des constituants des huiles essentielles.

Divers travaux ont concerné d'autres domaines d'investigation : produits alimentaires (huiles végétales, graisses animales, miels, ...), extraits végétaux, coupes pétrolières.

Et dans la plupart des cas, elle a été utilisée pour confirmer le résultat obtenu par une autre technique, notamment une technique chromatographique, de l'identification de certains constituants, ou encore pour vérifier la présence d'autres constituants. [65]

1. Intérêt de la RMN du carbone-13 (RMN¹³C) pour l'analyse des mélanges complexes

En RMN, les analyses sont réalisées à température ambiante, permettant ainsi d'éviter la dégradation ou transformation des molécules thermosensibles, qui est un problème très rencontré lors de la séparation par CPG ou bien lors de l'identification par SM, à cause de l'impact électronique résultant.

L'identification des constituants d'un mélange par RMN¹³C est basée sur la comparaison des déplacements chimiques dans le spectre du mélange avec ceux de composés

de référence contenus dans diverses bibliothèques de spectres. Avec cette méthode, les composés ne sont pas préalablement purifiés. Il est donc nécessaire que l'enregistrement du spectre du mélange et des spectres des composés de référence soit réalisé avec des conditions expérimentales optimisées et standardisées afin de permettre une bonne reproductibilité des résultats obtenus.

2. Attribution des signaux dans le spectre d'un mélange complexe

L'intérêt de la spectroscopie de RMN réside dans sa faculté à reconnaître un noyau déterminé par rapport à son environnement dans la molécule. La moindre modification structurale se traduit par des variations plus ou moins importantes de pratiquement tous les carbones de la molécule, donnant ainsi, des spectres différents et bien séparables pour les différents composés aussi proches soient leurs structures. Ce qui n'est pas possible avec les autres techniques.

En RMN le déplacement chimique est la donnée spectroscopique la plus utilisée pour identifier un composé connu dans un mélange. Et donc chaque molécule sera définie par une série de déplacements chimiques qui constituera son spectre « son empreinte digitale », à partir duquel elle pourra être identifiée.

Et pour avoir une reproductibilité des spectres plusieurs paramètres doivent être pris en compte, puisque la valeur du déplacement (en ppm par rapport à une référence interne) en dépend:

- ❖ Les conditions d'acquisition et de traitement du signal ; le champ magnétique B_0 de l'appareil utilisé, les séquences impulsionnelles.
- ❖ la nature du solvant, dans le cas de certaines molécules, la concentration et la présence d'autres molécules, comme par exemple les composés phénoliques dont les déplacements chimiques des carbones peuvent varier en fonction de la fonctionnalisation (alcool, composé carbonylé, oxyde) des autres composés oxygénés présents dans le mélange, à cause des liaisons hydrogènes susceptibles de se former [54].

C'est pour cette raison que l'acquisition des spectres doit se faire dans les mêmes conditions pour ceux de référence.

Un avantage de la RMN est que la haute sensibilité des spectromètres permet d'enregistrer les spectres avec une faible quantité de produit, et donc une faible concentration, ce qui a pour effet de supprimer les liaisons hydrogène potentielles.

Dans le domaine des huiles essentielles, plusieurs travaux ont été réalisés, dont ceux de Formàcek et Kubeczka [67], dans lesquels on se base sur comparaison des spectres de

l'huile essentielle obtenus, avec ceux de composés référés dans les bibliothèques, en prenant en considération bien évidemment, avec les conditions expérimentales.

Une méthode d'identification d'une huile essentielle basée sur l'étude du spectre de RMN 13C du mélange et sa comparaison avec des spectres de mono- et sesquiterpènes décrits dans la littérature a été mise au point par Ferreira et al.[66].

Un logiciel informatique a été élaboré dans ce but. Il prend en compte simultanément la valeur des différents déplacements chimiques observés dans le mélange et la multiplicité de chacun des carbones, préalablement déterminée par des séquences DEPT.

Il propose par la suite une identification des constituants en comparant les résultats aux données spectrales décrites dans la littérature.

D'autres travaux sur ont été réalisés, dans lesquels la RMN13C sert notamment à confirmer les résultats obtenus par CPG-SM.

Un autre domaine, l'industrie agro-alimentaire, dans lequel plusieurs produits ont faits objet de nombreuses études : les huiles végétales, les graisses animales, les miels, et autres, et qui ont permis de déterminer la distribution des différents acides gras sur le glycérol, la position et la stéréochimie des doubles liaisons, ainsi que la classe lipidique [19].

Toutes les méthodes citées précédemment présentent une grande précision, mais elles sont très coûteuses et elles nécessitent l'utilisation d'appareillage très sophistiqués et les manipulations sont très longues. Plusieurs méthodes ; plus simples à mettre en œuvre, sont proposées et développées dans le but de remédier à ces inconvénients.

I.3. Analyse des polyphénols totaux

Plusieurs méthodes sont utilisées dans le but de la détermination du contenu en polyphénols totaux, parmi lesquels on peut citer : la colorimétrie et le titrage par le permanganate de potassium. La spectroscopie Infra Rouge a été aussi utilisée pour la quantification de certains constituants du thé vert comme la caféine, les catéchines et l'acide gallique [60]. Elle a aussi été utilisée pour la prédiction du pouvoir antioxydant total du thé [67].

➤ L'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu :

Elle consiste en une réaction d'oxydation des phénols et une réduction du réactif de Folin-Ciocalteu constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), la solution obtenue est un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}), et par une mesure d'absorbance effectuée à la

longueur d'onde de 750 nm, par ajout de carbonate de sodium [57], et les résultats sont exprimés en acide tannique [68]. L'analyse peut aussi être réalisée à 540 nm avec l'acide gallique comme solution d'étalonnage [67].

Le traitement au réactif de Folin-Ciocalteu, des extraits de plantes, s'effectue sur l'extrait phénolique purifié avec l'acétate d'éthyle [8]. Ou bien par macération de la matière végétale dans une solution de méthanol à 50%. Le mélange réactionnel, composé de l'échantillon, du réactif de Folin-Ciocalteu et de carbonate de sodium doit être gardé à l'abri de la lumière pendant 30 min. Et le contenu en polyphénols totaux est déterminé en utilisant une courbe d'étalonnage spectrophotométrique réalisée avec l'acide gallique, et il est exprimé en mg équivalent d'acide gallique par matière sèche [16, 18]. Dans certains travaux, celui de J. Brzowska et al (1973) [54], et de Pollard, [69], la courbe d'étalonnage a été établie avec du phénol purifié, alors que l'extraction a été réalisée à l'aide de méthanol absolu.

Cette méthode n'est pas spécifique pour une famille d'antioxydant donnée, puisqu'elle permet un dosage de tous les antioxydants présents dans l'échantillon.

Mothadi et al. [63], dans le cadre du traitement des graines de colza, visant à éliminer les composés phénoliques contenus dans ses graines, ont procédé à un traitement thermique inactivant la myrosinase en présence de 0,3% de Na₂SO₄, un inhibiteur de l'anti-oxydation des composés phénoliques, suivi d'un lavage à l'éthanol. Le choix de cet alcool est basé sur le fait que l'acide sinapique libre ou lié représente presque la totalité des polyphénols du colza, et que la sinapine est soluble dans l'éthanol à 80%.

Ils ont constaté une diminution importante des quantités de polyphénols libres contrairement aux polyphénols liés, ce qu'ils ont expliqué par le fait que les polyphénols liés sont moins solubilisés dans l'alcool 80%.

I.4. Dosage des acides phénoliques

Vu leur importance avérée, plusieurs travaux ont été réalisés pour le dosage des acides phénoliques, parmi lesquels on peut citer :

➤ **SERVE et al. (1983) [5]** qui ont procédé à un dosage, dans le cadre d'une étude phyto-écologique, des acides et aldéhydes phénoliques de la végétation et du sol par chromatographie liquide haute performance.

Ils ont opté pour la chromatographie liquide haute performance (CLHP) vu ses avantages, comparé à la chromatographie gaz-liquide (CGL) et les autres techniques de

chromatographie concernant la rapidité et la sensibilité de la méthode pour la séparation et le dosage des composés phénoliques dans les extraits de plantes.

Leur travail a été réalisé avec un mélange ternaire constitué d'eau, d'acétonitrile et d'acide acétique comme solvant. Pour l'isolement des composés phénoliques des plantes, et dans le but d'éliminer de nombreuses substances perturbants les chromatogrammes et d'améliorer l'analyse en HPLC, ils ont procédé à une extraction à l'acétate d'éthyle.

Des solutions mères, de chaque échantillon, ont été préparées dans du méthanol et ont servi pour la préparation des mélanges de référence. L'étalonnage s'est fait par rapport à l'acide p-anisique. L'échantillon injecté en HPLC est composé de l'extrait à l'acétate d'éthyle dissous dans du méthanol, de la solution mère d'acide p-anisique et de l'éluant.

Ils ont trouvé que le mélange ternaire utilisé pour le dosage des composés phénoliques n'a pas permis une bonne résolution des pics dans les chromatogrammes, ce qu'ils ont expliqué par la viscosité de l'éluant qui a été augmentée par l'alcool utilisé (le méthanol), ce dernier a été remplacé par l'acétonitrile, qui a permis une meilleure séparation.

La quantification des composés a été réalisée par étalonnage des composés de référence par rapport à l'acide p-anisique. Cette méthode a montré qu'elle est très applicable dans ce cas.

I.5. L'analyse spectroscopique UV-Vis

Cette technique d'analyse est basée sur l'absorption des radiations lumineuses par l'échantillon à analyser dans le domaine de longueurs d'onde [200 - 800] nm.

C'est une technique utilisée notamment pour l'analyse quantitative puisqu'elle n'apporte pas d'information sur la structure du composé ou des composés analysés.

Ses résultats sont exploitables dans l'analyse quantitative grâce à la loi de Beer-Lambert qui permet la détermination de la concentration du composé et ce par mesure de son absorbance à sa longueur d'onde caractéristique.

De plus, la chromatographie liquide et l'électrophorèse capillaire ont favorisé le développement de détecteurs UV-Vis perfectionnés, à l'origine d'un mode très courant d'obtention des chromatogrammes, accompagné de possibilités d'identification et de quantification des composés.

L'analyse spectroscopique UV-Vis est une méthode d'analyse rapide et simple comparée aux autres techniques d'analyse. Mais le problème se pose pour l'analyse des

mélanges à cause des interférences entre les spectres d'absorption des différents constituants et l'additivité des valeurs d'absorbance.

L'exploitation des résultats d'analyse par application des méthodes chimiométriques permet de remédier à ces problèmes et dont une analyse quantitative des mélanges, et de développer une technique rapide et le plus souvent fiable. [70, 8, 54]

CHAPITRE II :
MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE ET
TECHNIQUES D'ANALYSE

CHAPITRE II

MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE ET TECHNIQUES D'ANALYSE

Ce travail a pour but le développement d'une méthode sensible pour la quantification de trois dérivés phénoliques dans des mélanges ternaires : les acides galliques et caféique, et la quercétine.

Dans ce chapitre nous allons présenter l'ensemble des travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire ; nous allons présenter les différents constituants utilisés, et les protocoles expérimentaux suivis.

II.1. Produits chimiques, appareillages et logiciels utilisés

II.1.1. Produits chimiques

Les trois produits sont sous forme de poudres. Ce sont des composés de nature hygroscopique, raison pour laquelle, ils doivent être séchés à l'étuve avant utilisation, jusqu'à stabilisation de la masse. Le séchage pendant une nuit a été suffisant pour les trois composés.

L'acide gallique est une poudre blanche, alors que celle de l'acide caféique est légèrement jaune, tandis que la quercétine est une poudre jaune.

Une fois les solutions préparées elles doivent être conservées au réfrigérateur et à l'abri de la lumière puisqu'elles sont très sensibles à la chaleur et la lumière.

Les échantillons destinés pour l'analyse spectroscopique doivent être analysés dès leur préparation.

Des solutions mères de chaque composé sont préparées, en tenant compte des limites de solubilité de chacun dans le solvant utilisé. Pour servir, par dilution, à la préparation des différents échantillons.

Les solutions des deux acides phénoliques sont préparées avec de l'eau bi-distillée, alors que celle de quercétine, puisqu'elle est très faiblement soluble dans l'eau (6 mg.L^{-1} à $16 \text{ }^\circ\text{C}$, est préparée avec de l'éthanol absolu ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) ; de pureté 99,9 %.

II.1.2. Appareillages

➤ Un spectrophotomètre « SHIMADZU UV-2101PC » à double faisceaux couplé avec un micro-ordinateur, pour le tracé des différents spectres d'absorption UV en utilisant des cuves en quartz de trajet optique de 10 mm. Les spectres d'absorption sont réalisés avec un pas de 0,5 nm.

- Les mesures du pH sont effectuées à l'aide d'un pH-mètre de type MARTINI Instrument.
- Les pesés sont effectuées à l'aide d'une balance SCALTEC de précision 0.0001 g.
- Un conductimètre.
- Pour le prélèvement des volumes de l'ordre du microlitre, une micropipette « Transferpette BRAND », ayant un domaine de 20 à 200 μ l.

II.1.3. Logiciels

Les logiciels utilisés : UV-2101PC pour ouvrir et lire les spectres d'absorption obtenus; Microsoft Office Excel 2007 pour le traitement des résultats; PLS-Toolbox et Matlab pour la programmation de la méthode de régression PLS.

II.2. Protocoles expérimentaux

II.2.1 Étude de la variation de l'absorbance en fonction de la concentration du composé

Dans le but de déterminer les longueurs d'onde caractéristiques de chaque composé, et de voir l'évolution de son absorbance en fonction de sa concentration, nous avons procédé à une étude de chacun de ces composés phénoliques séparément, et des spectres d'absorption sont obtenus pour différentes concentration de ces derniers.

L'étude spectrale des différents échantillons a été réalisée dans le domaine de l'UV-Vis ([200 -800] nm) avec un pas de 0,5 nm. Les spectres d'absorption des différents échantillons ont été établis par rapport au solvant utilisé pour les préparer.

Les droites d'étalonnage sont établies aux longueurs d'ondes (λ_{\max}) caractéristiques des constituants, ces longueurs d'onde (λ_{\max}) sont déterminées à partir du spectre d'absorption de la solution du composé correspondant à l'absorbance la plus élevée sur ce spectre.

Le domaine de concentration est déterminé par la concentration la plus importante donnant un spectre d'absorption ayant des absorbances pas trop élevées, ne dépassant pas 2 unités d'absorbance, et dont le spectre est assez résolu.

✓ L'acide gallique

Une solution mère de concentration 100 ppm est préparée par dissolution d'une masse d'acide gallique de 20 mg, dans une fiole jaugée de 200 ml, dans l'eau bi-distillée ayant un pH de 6,71 et une conductivité de 1,6 μ S/cm.

Plusieurs dilutions sont faites pour avoir une idée sur l'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration, déterminer le domaine de concentration et la longueur d'onde caractéristique (λ_{\max}). Les spectres d'absorption sont tracés par rapport à l'eau utilisée pour la préparation de ces solutions.

✓ L'acide caféique

Une solution mère de concentration de 60 ppm est préparée dans une fiole jaugée de 200 ml, avec 12 mg d'acide caféique, et l'eau bi-distillée de pH de 6,71 et une conductivité de 1,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Cette solution mère a servi pour la préparation des échantillons à analyser.

L'analyse spectrale a été aussi réalisée par rapport à cette eau bi-distillée.

✓ La quercétine

Pour la réalisation de cette partie, nous avons préparé une solution mère d'une concentration de 125 ppm, par dissolution de 12,5 mg de quercétine dans 100 ml d'éthanol absolu. A partir de cette solution, nous avons préparé des dilutions que nous avons analysées par la suite, et leurs spectres établis par rapport à l'éthanol comme référence.

II.2.2. Elaboration des courbes d'étalonnage pour chaque composé

Le but de cette partie est la détermination des domaines de linéarité pour chaque composé ; c.à.d. l'intervalle de validité de la loi de Beer Lambert.

Nous avons d'abord procédé à un séchage à l'étuve des échantillons à utiliser pour la préparation des solutions. Ensuite, des solutions mères, de chacun des trois composés phénoliques ont été préparées à partir desquelles, nous avons préparé, dans des fioles jaugées de 25 ml des étalons ayant des concentrations bien précises. Les spectres d'absorption dans l'UV-Vis de chacun de ces étalons ont été tracés ce qui a permis d'évaluer la variation des absorbances de chaque composé en fonction de sa concentration.

Courbes d'étalonnage

Pour chacun des trois composés, une courbe d'étalonnage a été obtenue dans le but de déterminer l'intervalle de linéarité, et donc de validité de la loi de Beer-Lambert, et ce en traçant la variation de l'absorbance maximale, correspondant à la longueur d'onde caractéristique (λ_{\max}), en fonction de la concentration du composé considéré.

Les longueurs d'onde (λ_{\max}) sont déterminées à partir du spectre d'absorption obtenu dans la première partie du travail.

II.2.3. La détermination simultanée de l'acide gallique et de l'acide caféique dans le mélange binaire, et dans le mélange ternaire avec la quercétine

L'analyse chimique comporte habituellement deux étapes. D'abord, trouver une relation $Y = f(X)$ entre deux groupes de variables, les variables Y sont dépendantes et les variables X sont indépendantes, sachant que les valeurs X et Y sont connues. Ceci est l'étape d'étalonnage ou modélisation. Les échantillons utilisés pour cette étape sont appelés échantillons d'étalonnage. Les paramètres du modèle sont appelés coefficients de régression. La méthode de la validation croisée sera utilisée en utilisant les échantillons d'étalonnage pour éviter une sur- (ou sous-) modélisation. La deuxième étape est celle où les variables indépendantes sont obtenues pour des échantillons différents de ceux utilisés dans la première étape. Ces variables avec les coefficients de régression permettent de prévoir les valeurs des variables dépendantes. C'est l'étape de prévision (test ou d'essai). Les échantillons utilisés dans cette étape sont appelés échantillons de prévision (test ou d'essai).

Avant l'étalonnage, il est préférable de centrer et réduire les données de X et Y . Centrer les données de chaque variable en retranchant sa moyenne pour minimiser l'influence des variables aléatoires (bruit de fond), et réduire les données de chaque variable en les divisant par son écart type pour que les variables du même bloc soient homogènes, de même ordre de grandeur.

II.2.3.1. Etape d'étalonnage

A. Mélange binaire acide gallique-acide caféique

Pour l'élaboration du modèle d'étalonnage de ce mélange, nous avons préparé une série de 14 échantillons d'étalonnage dont les concentrations, en acide gallique et caféique. Les concentrations de chaque composé dans ces étalons doit appartenir au domaine de linéarité de chaque composé respectivement.

Dans cette série d'étalon, la concentration d'un constituant doit varier de la borne inférieure (C_{min}) du domaine choisie pour sa concentration, jusqu'à la valeur maximale (C_{max}) de celui-ci et ce, par un pas de concentration déterminé par la formule suivante :

$$\Delta C = \frac{C_{max} - C_{min}}{13}$$

Avec :

ΔC : le pas de variation de la concentration du composé d'un échantillon à l'autre ;

C_{min} : concentration minimale du composé ;

C_{max} : concentration maximale du composé.

La variation de la concentration d'un composé doit se faire d'une manière croissante, alors qu'elle doit être décroissante pour l'autre ; et ce pour éviter d'avoir des mélanges trop chargés et des absorbances trop élevées ; c.-à-d., l'échantillon contenant la concentration maximale de l'acide gallique, par exemple, doit contenir la concentration minimale de l'acide caféique.

Le schéma suivant illustre la variation de la composition des différents étalons :

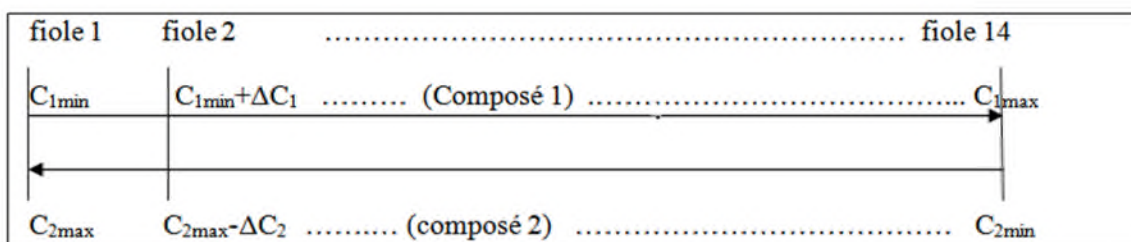


Figure II.1. Représentation graphique de 14 échantillons d'étalonnage

Nous avons préparé les mélanges binaires selon la figure II.1 de façon à avoir des amplitudes des spectres comprises entre 1 et 2,5. De cette manière, la linéarité de loi de Beer-Lambert sera vérifiée, aussi la sensibilité et la précision seront importantes.

B. Mélange ternaire

Pour un mélange ternaire, l'étape d'étalonnage nécessite la préparation d'une série de 21 échantillons pouvant être présentés sur un triangle isocèle illustré par la figure II.2.

Les intervalles de concentration de chaque constituant sont choisis dans le domaine de linéarité de ce dernier, et d'une manière à avoir des absorbances pas trop élevées.

Pour chaque constituant, nous avons six niveaux de concentration. Si on suppose que l'intervalle de concentration choisi pour un constituant est $[C_{min} - C_{max}]$, l'écart de concentration entre deux niveaux est déterminé par la formule suivante :

$$\Delta C = \frac{C_{max} - C_{min}}{5}$$

Avec :

ΔC : le pas de variation de la concentration du composé d'un échantillon à l'autre ;

C_{min} : concentration minimale du composé ;

C_{max} : concentration maximale du composé.

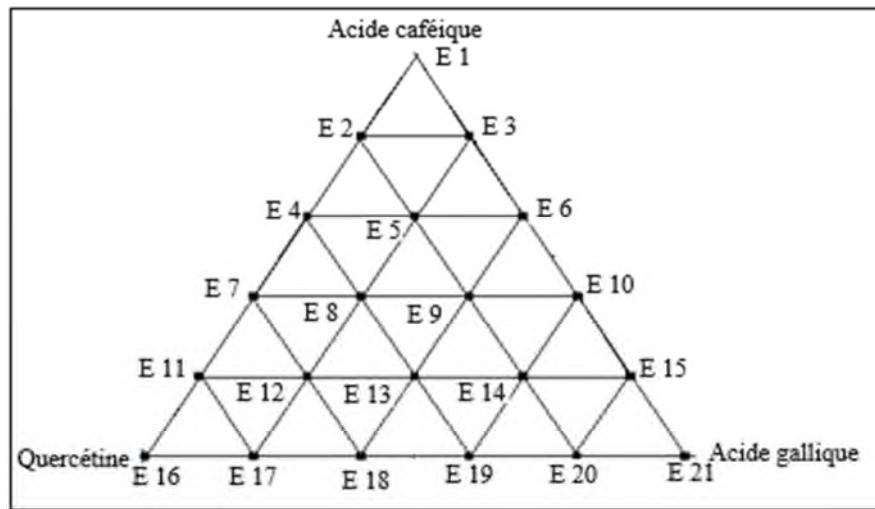


Figure II.2. Diagramme de composition des échantillons d'étalonnage

II.2.3.2. Etape test

Une fois l'étape d'étalonnage réalisée, nous devons passer à l'étape test pour vérifier la validité du modèle élaboré, et ce en préparant des échantillons appelés échantillons test dont les compositions appartiennent aussi aux domaines choisis pour les échantillons d'étalonnage.

II.2.3.3. Sélection du nombre optimum de facteurs

Le nombre de composantes principales pour le modèle PLS est déterminé en utilisant la méthode de la validation croisée, et est choisi par rapport à la valeur du *PRESS* : somme des carrés des erreurs de prévision.

Il ne sera retenu que les facteurs faisant diminuer la valeur du *PRESS* de 2% minimum.

Le *PRESS* est donné par la formule suivante :

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (\hat{c}_i - c_i)^2 \quad (II.3)$$

II.2.3.4. Paramètres statistiques

Le pouvoir prédictif du modèle PLS élaboré est évalué en utilisant quatre paramètres calculés pour chacun des constituants du mélange étudié: le *RMSD*, le *REP*, R^2 , et le *Recouvrement*.

Ces paramètres nous exprime des erreurs de prédiction, obtenus en comparant les concentrations prédites de chaque échantillon aux concentrations de référence.

Les notations utilisées dans les formules de calcul de ces paramètres, qui seront données dans ce qui suit sont les suivantes :

- ✓ c_i : Concentration de référence du composé dans l'échantillon i ;
- ✓ \hat{c}_i : Concentration prédite du composé dans l'échantillon i par la méthode PLS ;
- ✓ \hat{c}'_i : Concentration prédite du composé dans l'échantillon i par l'équation linéaire entre c_i et \hat{c}_i ;
- ✓ \bar{c} : La moyenne de la concentration de référence dans la série de prévision ;
- ✓ Et enfin n : le nombre d'échantillons utilisés dans la série de prévision.

A. La racine carrée de la moyenne des carrés des différences **RMSD**

Ce paramètre exprime l'erreur moyenne de chaque composant dans l'analyse. Il est calculé selon la formule suivante :

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{c}_i - c_i)^2}{n}} \quad (\text{II.4})$$

B. L'erreur relative de prédiction **REP**

Il montre le pouvoir prédictif de chaque composant et est calculé comme suit :

$$REP(\%) = \frac{100}{\bar{c}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{c}_i - c_i)^2}{n}} \quad (\text{II.5})$$

C. Le coefficient de détermination **R²**

Il correspond au carré du coefficient de corrélation R et il permet d'évaluer la variance expliquée par la régression :

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{c}'_i - \bar{c})^2}{\sum_{i=1}^n (\hat{c}_i - \bar{c})^2} \quad (\text{II.6})$$

D. Le recouvrement en pourcentage **Recouvrement (%)**

Plus le recouvrement est proche de 100%, plus le résultat est d'autant plus fiable.

$$\text{Recouvrement} (\%) = \frac{\hat{c}_i}{c_i} \times 100 \quad (\text{II.7})$$

CHAPITRE III :
RESULTATS EXPERIMENTAUX ET
DISCUSSION

CHAPITRE III

RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous allons présenter l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus lors du travail réalisé, et nous allons les interpréter en essayant d'en tirer le maximum d'informations.

III.1 Étude de la variation de l'absorbance en fonction de la concentration du composé

Dans cette partie, nous présentons les spectres d'absorption UV des trois composés phénoliques étudiés, en fonction de leur concentration.

Les spectres d'absorption caractéristiques des différents échantillons, montrent que les absorbances s'annulent au-delà de 375 nm pour les acides phénoliques (acides gallique et caféique), et au-delà de 450 nm pour la quercétine.

✓ L'acide gallique

Des concentrations des échantillons utilisés sont les suivantes : 0,01 ppm ; 0,1 ppm ; 1 ppm ; 10 ppm ; 20 ppm ; 30 ppm ; 40 ppm et 50 ppm.

Les spectres d'absorption des solutions préparées sont montrés sur la figure III.1.

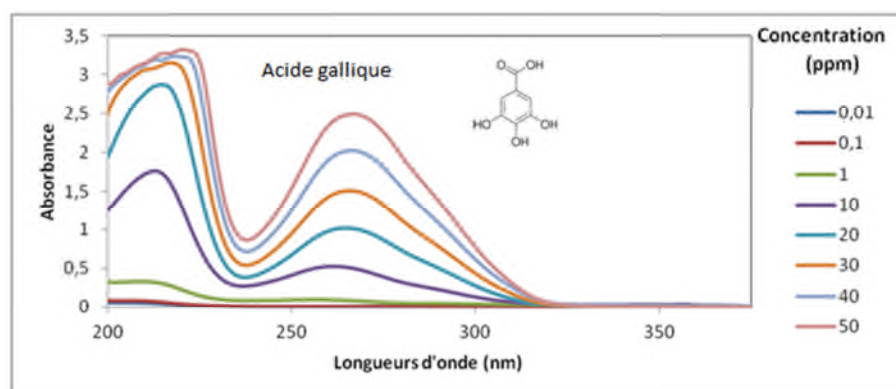


Figure III.1 : Spectres d'absorption UV des échantillons de l'acide gallique

Les spectres présentent deux bandes bien séparées, la première s'étale sur le domaine de longueurs d'onde allant de 200 nm jusqu'aux environs de 236 nm, alors que la deuxième s'étale de 236 nm jusqu'aux environs de 320 nm, valeur au-delà de laquelle l'absorbance des différents échantillons de l'acide gallique est nulle.

Sur ces spectres, nous constatons un léger effet bathochrome dû à la dilution, et au niveau de la première bande, nous constatons des absorbances trop élevées pour les solutions

les plus concentrées, qui atteignent une valeur de 3,31 à la longueur d'onde d'absorption maximale qui est 220 nm pour la solution de 50 ppm ; c'est pour cela que nous avons choisi la longueur d'onde d'absorbance maximale de la deuxième bande. Cette valeur est, d'après les résultats spectraux, égale à 267 nm, avec une absorbance de 2,48 pour une concentration de 50 ppm. La courbe d'étalonnage est établie à cette dernière longueur d'onde, ce qui sera décrit dans ce qui va suivre.

✓ L'acide caféique

A partir de la solution mère de concentration de 60 ppm en acide caféique, nous avons préparé des solutions diluées de concentrations : 0,05 ppm ; 0,1 ppm ; 1 ppm ; 10 ppm ; 20 ppm et 30 ppm.

Les spectres d'absorption sont présentés sur la figure III.2.

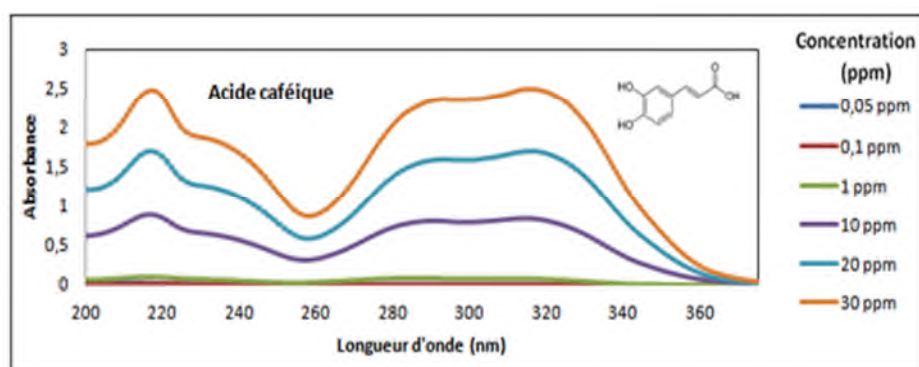


Figure III.2 : Spectres d'absorption UV de l'acide caféique à différentes concentrations

Tout comme l'acide gallique, nous observons un léger effet bathochrome dû à la dilution.

Ces spectres présentent deux domaines :

✓ le premier, s'étale de la longueur d'onde 200 nm jusqu'à 260 nm ; présentant un maximum d'absorbance vers 217 nm ;

✓ le deuxième, s'étale de 260 nm jusqu'à 360 nm, longueur d'onde au-delà de laquelle l'absorbance s'annule pour tous les échantillons. Dans ce domaine, nous notons la présence de deux bandes non résolues ; la première se situant aux environs de 288 nm, et le second, ayant une absorbance légèrement plus élevée, vers 312 nm.

Les absorbances maximales des deux pics, à 217 nm et à 312 nm sont pratiquement identiques.

✓ La quercétine

A partir de la solution mère de quercétine à 125 ppm, nous avons préparé des solutions à différentes dilutions et l'analyse spectrale, dans le domaine de longueurs d'onde [200-500] nm, nous a permis d'évaluer la concentration maximale à 25 ppm dans le but d'éviter d'avoir des absorbances trop élevées.

Les échantillons préparés ont les concentrations suivantes : 1,5 ppm ; 4,5 ppm ; 3 ppm ; 8 ppm ; 9 ppm ; 12 ppm ; 15 ppm ; 18 ppm ; 20 ppm et 25 ppm.

Les spectres d'absorption UV de la quercétine présentent deux pics caractéristiques situés à 256 nm avec une absorbance de 1,82 pour la solution de 25 ppm ; et 373 nm dont l'absorbance est de 1,94 pour la même solution. Nous constatons que les absorbances à ces deux longueurs d'onde sont pratiquement égales pour chaque solution, comme le montre la figure III.3 ci-dessus.

Nous constatons une surcharge et des absorbances trop élevées des spectres dans l'intervalle de longueurs d'onde [200-230] nm (une absorbance de 3,31 à la longueur d'onde 207 nm pour la solution de concentration 25 ppm), cette surcharge est due aux interactions et au fait que l'éthanol qui est utilisé comme solvant absorbe dans le domaine [200 - 245] nm avec une absorbance qui atteint 0,5 à 221 nm et qui est considérablement plus importante dans les longueurs d'onde inférieures (elle est de 2 à 200 nm).

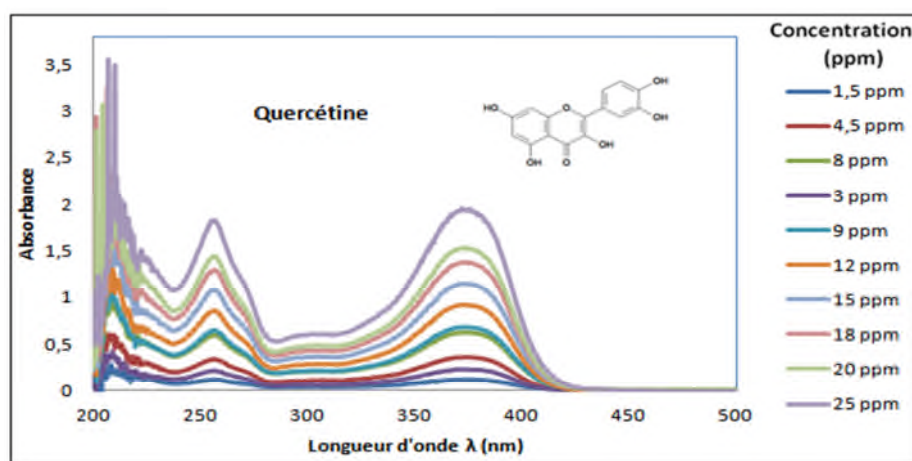


Figure III.3. Spectres d'absorption des échantillons de la quercétine

III.2. Elaboration des courbes d'étalonnage pour chaque composé

Dans le but de déterminer les domaines de linéarité pour chacun des composés étudiés (intervalle de validité de la loi de Beer Lambert), nous avons élaboré leurs courbes d'étalonnage.

Pour chaque constituant, la courbe d'étalonnage est établie à sa longueur d'onde caractéristique (λ_{\max}).

✓ L'acide gallique

La longueur d'onde pour laquelle la courbe d'étalonnage est établie est 267 nm.

Le domaine de concentration d'étude est [0,05-70] ppm, mais le domaine pour lequel la droite d'étalonnage est établie est [0,01-50] ppm car au-delà de cette valeur nous perdons la linéarité de la droite d'étalonnage.

Les concentrations des échantillons étalons sont les suivantes : 0,01 ppm ; 0,1 ppm ; 1 ppm ; 10 ppm ; 20 ppm ; 30 ppm ; 40 ppm ; et 50 ppm.

La courbe d'étalonnage est présentée sur la figure III-4. Nous constatons l'alignement presque parfait des points expérimentaux sur la droite de régression, avec un coefficient de régression très proche de l'unité ($R^2 = 0,9998$).

Nous pouvons donc conclure que la loi de Beer-Lambert est vérifiée dans le domaine de concentration choisi, à savoir [0,01-50] ppm.

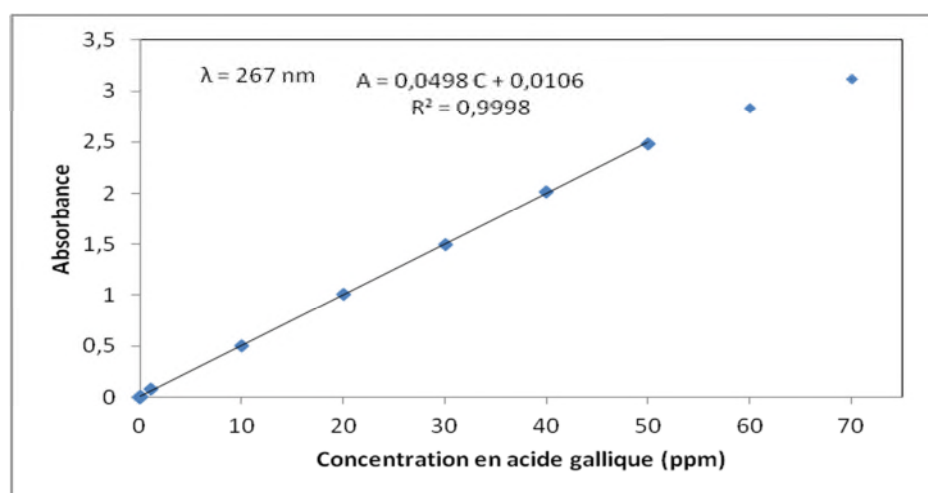


Figure III.4. Courbe d'étalonnage des spectres d'absorption de l'acide gallique

✓ L'acide caféique

Contrairement à l'acide gallique, nous avons établie, pour l'acide caféique, des courbes d'étalonnage à chacune de ses trois longueurs d'onde maximales puisque ses spectres d'absorption présentent des pics bien distincts avec des absorbances très rapprochées pour chaque échantillon.

Le domaine de concentration étudié est [0,05-60] ppm, mais nous avons constaté qu'à partir de la concentration de 30 ppm l'aspect linéaire des trois droites d'étalonnage est perdu.

Les concentrations des échantillons étalons utilisés pour l'élaboration de ces droites d'étalonnage sont les suivantes : 0,05 ppm ; 0,1 ppm ; 1 ppm ; 10 ppm ; 20 ppm ; et 30 ppm.

Les points expérimentaux, et les courbes de tendance sont présentés sur les figures III.5. ci-après.

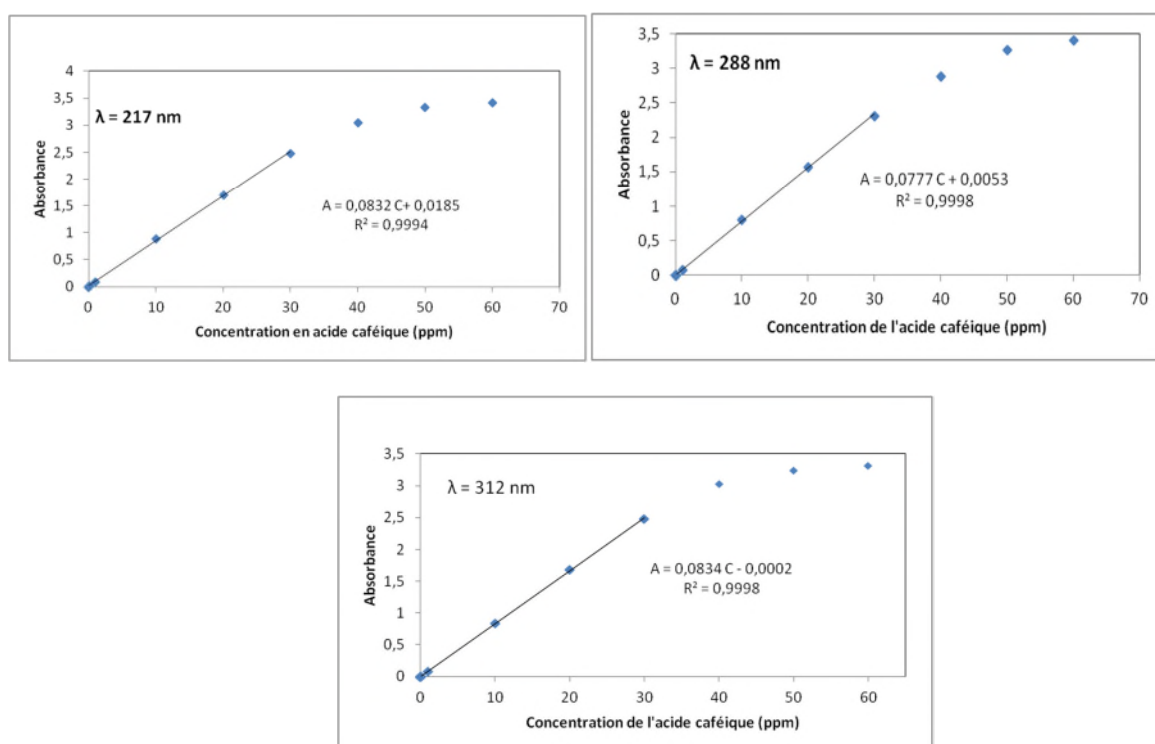


Figure III.5. Courbes d'étalonnage des spectres d'absorption de l'acide caféique : à 217 nm, 288 nm et 312 nm.

Nous constatons pour ces courbes d'étalonnage, des coefficients de régression très élevés : $R^2 = 0,9994$ pour $\lambda = 217$ nm et $R^2 = 0,9998$ pour $\lambda = 288$ nm et 312 nm, et que les points expérimentaux sont bien alignés sur celle-ci.

Ce qui confirme la validité de la loi de Beer-Lambert dans ce domaine de concentration qui est [0,05-30] ppm et ce pour les trois longueurs d'onde.

✓ La quercétine

Nous avons établie deux courbes d'étalonnage : à la longueur d'onde 256 nm et à 373 nm. Le domaine de concentrations choisi est [1,5 – 25] ppm.

Les concentrations des échantillons utilisés sont les suivantes : 1,5 ppm ; 4,5 ppm ; 3 ppm ; 8 ppm ; 9 ppm ; 12 ppm ; 15 ppm ; 18 ppm ; 20 ppm ; et 25 ppm.

Elles sont présentées sur la figure III.6.

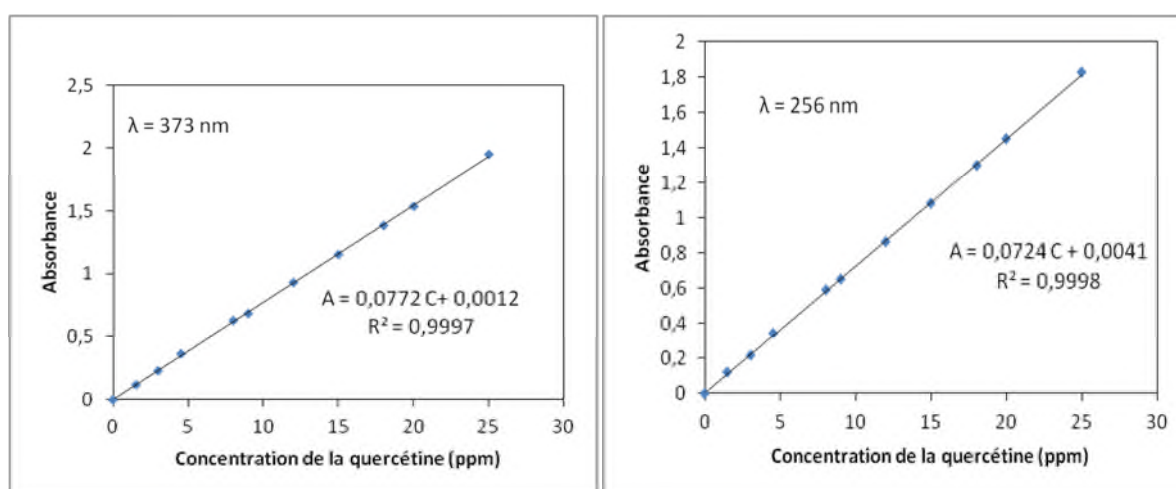


Figure III.6. Courbes d'étalonnage des spectres d'absorption de la quercétine : à $\lambda=256 \text{ nm}$ et $\lambda=373 \text{ nm}$

L'alignement des point expérimentaux sur les deux droites d'étalonnage est très visible, et comme les deux précédents cas, les coefficients de corrélation sont très proches de l'unité ($R^2 = 0,9997$ et $0,9998$). Cela confirme la validité de la loi de Beer-Lambert dans le domaine de concentrations choisies pour les deux longueurs d'onde.

III.3. Etude des mélanges

La régression aux moindres carrés partiels est une méthode numérique qui passe par deux étapes : étalonnage et test ou prédiction.

L'application de cette méthode nécessite la préparation de deux séries d'échantillons : l'une pour l'étalonnage dont les échantillons sont appelés échantillons d'étalonnage ou bien étalons, elle est constituée de 14 échantillons pour les mélanges binaires, et de 21 échantillons pour les mélanges ternaires. Elle sert à l'élaboration du modèle mathématique.

La deuxième série d'échantillons sert à la validation du modèle élaboré et à mesurer son pouvoir prédictif, elle est constituée d'échantillons appelés échantillons test qui sont différents de ceux de l'étalonnage, et qui ont des compositions comprises dans les domaines choisis pour les échantillons d'étalonnage.

III.3.1. Mélange binaire

III.3.1.1 Etape d'étalonnage

Pour l'étude spectrale d'un mélange binaire, nous avons préparé des solutions aqueuses contenant les deux acides : gallique et caféique et dont les concentrations sont comprises dans les domaines de linéarité. Les domaines de concentration que nous avons choisis sont les suivants :

- ✓ Acide gallique : [2-50] ppm ;
- ✓ Acide caféique : [3-30] ppm.

Les compositions des différents mélanges sont déterminées d'après la relation II.1 du chapitre II. Ces compositions sont présentées dans le tableau III.1 suivant :

Tableau III.1. Composition des étalons du mélange binaire (acide gallique/acide caféique)

Echantillon d'étalonnage N°	Concentration (ppm)	
	A. Caféique	A. Gallique
E _E 1	3	50
E _E 2	5	46,3
E _E 3	7	42,6
E _E 4	9	38,9
E _E 5	11,1	35,2
E _E 6	13,2	31,5
E _E 7	15,3	27,8
E _E 8	17,4	24,1
E _E 9	19,5	20,4
E _E 10	21,6	16,7
E _E 11	23,7	13
E _E 12	25,8	9,3
E _E 13	27,9	5,6
E _E 14	30	2

a. Spectres des échantillons d'étalonnage

Les spectres d'absorption des échantillons d'étalonnage préparés sont présentés sur la figure III-1. Ces spectres délimitent quatre domaines de longueurs d'onde distincts:

- ✓ [200-229] nm ;
- ✓ [229-245] nm ;
- ✓ [245-280] nm ;
- ✓ [280-375] nm.

Des intersections nettes des différents spectres apparaissent aux trois points de longueurs d'onde : 229 ; 245 et 280 nm, qui délimitent ces quatre domaines, les absorbances à ces longueurs d'onde sont : 1,901 ; 1,485 ; 2,029 respectivement. Au niveau de ces points on constate une inversion de l'ordre d'absorbance des échantillons comme le montre la figure III.7.

Dans le premier et le troisième intervalle de longueurs d'onde, on trouve que l'échantillon ayant l'absorbance minimale dans la série est l'étalon N°14 qui contient l'acide caféique à sa concentration maximale qui est de 30 ppm.

Dans le premier intervalle, les absorbances sont trop élevées et de plus en plus rapprochés, les absorbances maximales sont comprises entre 3,144 et 3,371 pour les douze premiers échantillons, par contre l'absorbance de l'échantillon N° 13 est de 2,910 à $\lambda=215$ nm et celle de l'échantillon N°14, qui est la plus faible, est de 2,617 à la même longueur d'onde.

Dans le troisième intervalle, nous constatons que les absorbances des échantillons d'étalonnage varient proportionnellement avec la composition en acides ; plus la concentration en acide gallique de l'échantillon d'étalonnage est importante, plus l'absorbance est élevée. D'ailleurs, l'absorbance maximale dans ce domaine se situe à 267 nm, dont la valeur maximale est de 2,451 et qui est attribuée à l'échantillon d'étalonnage N°1 dont la concentration est maximale en acide gallique avec 50 ppm. Cette longueur d'onde correspond à la longueur d'onde caractéristique de l'acide gallique.

Cet ordre de grandeur des absorbances est inversé dans le deuxième et le quatrième intervalle ; plus la concentration de l'échantillon d'étalonnage en acide caféique est importante, plus son absorbance l'est aussi. D'ailleurs, dans ces deux domaines de longueur d'onde, à savoir : [229-245] nm et [245-280] nm, les absorbances maximales sont celle de l'échantillon N°14 dont la composition est maximale en acide caféique (30 ppm).

Dans le deuxième intervalle, on ne détecte pas de longueur d'onde d'absorption maximale, mais dans le quatrième, l'existence de deux pics est bien évidente. Ces maximums

d'absorbances se situent aux alentours de : 318 nm et 291 nm, avec des absorbances maximales, qui sont celles de l'échantillon d'étalonnage N°14 de 2,454 à 318 nm, et 2,336 à 293 nm, qui correspondent aux longueurs d'onde caractéristiques de l'acide caféique, en tenant compte de l'effet bathochrome de la dilution que nous avons noté précédemment.

En résumé, dans l'analyse spectrale, l'acide phénolique le plus abondant dans l'étalon impose son aspect spectral pour l'échantillon d'étalonnage analysé.

Les aspects spectraux des différents l'échantillon d'étalonnage permettent d'exclure toute réaction chimique entre ces deux composés mis en contact, puisque nous n'avons présence d'aucun nouveau pic caractéristique pour aucun échantillon.

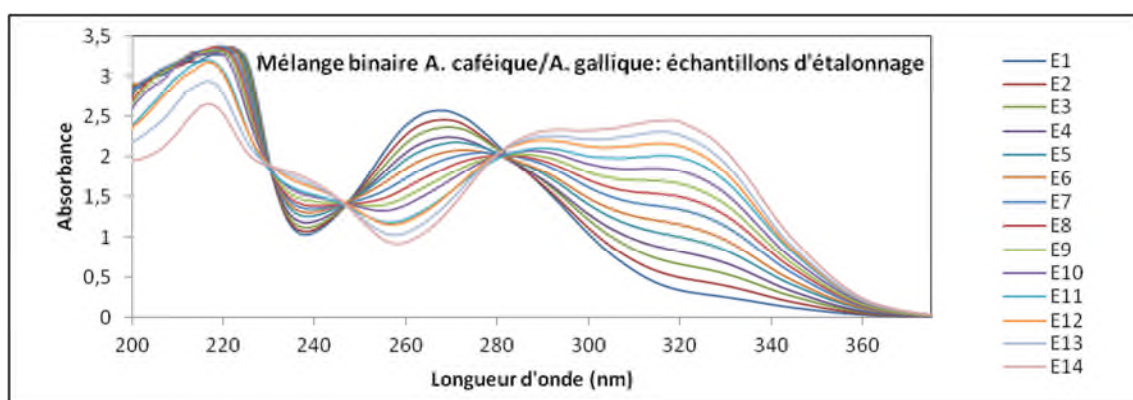


Figure III.7. Spectres d'absorption des échantillons d'étalonnage du mélange binaire

b. Validation croisée : sélection du nombre optimum de composantes principales

Dans la figure III.2, nous avons tracé la variation de *PRESS* en fonction du nombre de CPs dans le modèle PLS. Le nombre optimal de composantes principales retenues par le modèle est déterminé suivant le critère donné au paragraphe II.2.4.3. L'ensemble des résultats obtenus (nombre de CPs et *PRESS*) sont rassemblés dans le tableau présenté dans le paragraphe « Paramètres statistiques ».

Le modèle d'étalonnage du mélange binaire acide gallique-acide caféique est construit en utilisant la série d'échantillons d'étalonnage préparés précédemment, et sa fiabilité est vérifiée en utilisant 7 échantillons test, ce qui sera présenté par la suite.

Nous avons élaboré le modèle PLS du mélange binaire en utilisant l'intervalle de longueurs d'onde : [230 - 375] nm, avec un pas de mesure des absorbances de 0,5 nm, ce qui nous donne un nombre de variable de 291 variables.

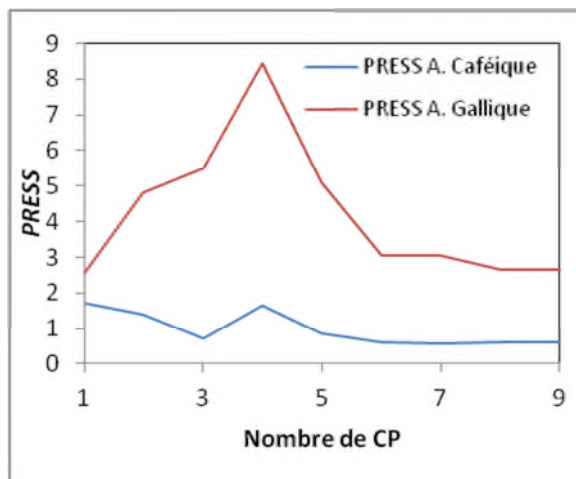


Figure III.8: Courbes de *PRESS* en fonction du nombre de composantes principales PLS pour le mélange binaire.

D'après la figure III.2, une seule CP est retenue pour l'acide gallique, et trois (3) CP pour la détermination de l'acide caféique.

Les valeurs de *PRESS* correspondantes sont respectivement 2,537 pour l'acide gallique et 0,733 pour l'acide caféique.

III.3.1.2. Résultats de la validation : étape test

Une fois l'étape d'étalonnage réalisée, nous sommes passés à l'étape test appelée encore étape de validation ou d'essai, elle sert à vérifier la validité du modèle élaboré dans l'étape d'étalonnage.

La série test est constituée de sept échantillons synthétiques préparés de la même manière que ceux de l'étalonnage et dont les compositions appartiennent aussi aux domaines de concentrations choisis pour les échantillons d'étalonnage.

a. Présentation des résultats spectraux

Les compositions de ces échantillons sont indiquées dans le tableau III.2.

Tableau III.2. Composition des échantillons test du mélange binaire

Echantillons test N°	Concentration (ppm)	
	A. Caféique	A. Gallique
E _T 1	4,00	48,15
E _T 2	8,00	40,75
E _T 3	12,15	33,35
E _T 4	16,35	25,95

E_T5	20,55	18,55
E_T6	24,75	11,15
E_T7	28,95	3,80

Les spectres d'absorption de ces derniers sont présentés sur la figure III.9.

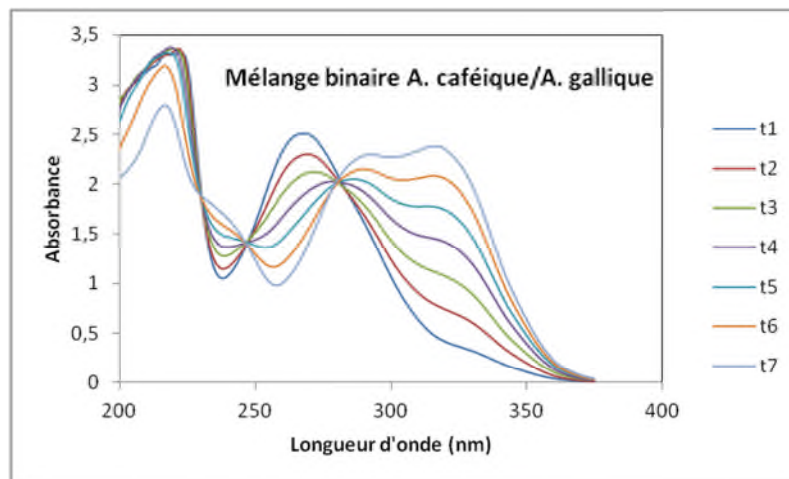


Figure III.9. Spectres d'absorption UV des échantillons test du mélange binaire

Nous constatons que les spectres des échantillons test du mélange binaire, présentent le même comportement que ceux de l'étalonnage ; plus le mélange est riche en acide caféique, plus les absorbances à ses longueurs d'onde caractéristiques sont importantes, ce qui est le cas pour les échantillons test N°7, 6 et 5 par exemple. Nous constatons que les absorbances pour ces échantillons sont importantes dans les domaines de longueur d'onde [231-245] nm et [279-375] nm. L'échantillon test N°7 dont la concentration en acide caféique est de 28,95 ppm et qui est la plus importante des concentrations des échantillons test en acide caféique, présente les absorbances les plus importantes dans la série des échantillons test, avec des absorbances maximales de : 2,377 à 316 nm et 2,295 à 293 nm.

Cette constatation est valable aussi pour l'acide gallique, les échantillons test dont la composition en acide gallique est plus importante (échantillon test N°1, 2 et 3), présentent des absorbances maximales dans le domaine de longueur d'onde [245-179] nm. En effet, la concentration en acide gallique de l'échantillon test N°1 est la plus importante dans la série test (48,15 ppm), et son absorbance est la plus importante aussi, avec une absorbance maximale de 2,509 à la longueur d'onde 268 nm qui est caractéristique de l'acide gallique en tenant compte du léger effet bathochrome de la dilution dont nous avons parlé précédemment.

b. Détermination simultanée des constituants dans les mélanges de la série test

Comme cité précédemment, l'étape test permet d'étudier le comportement des modèles d'étalonnage obtenus quand nous les appliquons sur des échantillons qui n'ont pas participé à la construction de ces modèles. Cette étape permet de vérifier le pouvoir prédictif et la fiabilité des modèles en calculant les critères statistiques : Recouvrement, R^2 , $RMSD$ et REP .

Dans le tableau III-3, nous donnons les valeurs prédites et les taux de recouvrement du mélange binaire acide gallique-acide caféique. Les valeurs de recouvrement en (%) obtenues en utilisant la PLS sont comprises respectivement dans [97,83 - 109,83] pour l'acide gallique avec une marge d'erreur ne dépassant pas 9,83 %, et [99,45 - 100,69] pour l'acide caféique et sa marge d'erreur maximale est de 0,69 %.

Tableau III.3 : Résultats de la prédiction du mélange binaire de la série test par la PLS.

Echantillon test N°	Valeur prédite (ppm)		Recouvrement (%)	
	A. Caféique	A. Gallique	A. Caféique	A. Gallique
1	4,027	48,18	100,69	100,06
2	7,956	40,91	99,45	100,39
3	12,108	33,51	99,65	100,47
4	16,352	25,64	100,01	98,79
5	20,564	18,39	100,07	99,14
6	24,876	10,91	100,51	97,83
7	28,867	4,17	99,71	109,83

Les résultats statistiques de la détermination simultanée des deux composés dans le mélange binaire en utilisant la PLS sont présentés dans le tableau III.4. Ces résultats permettent de vérifier la fiabilité et mesurer le pouvoir prédictif du modèle étudié.

Tableau III.4 : Paramètres statistiques du mélange binaire : acide caféique-acide gallique

Composé	Nombre de CPs	$PRESS$	$RMSD$	R^2	REP (%)
A. Caféique	3	0,733	0,062	0,9999	0,381
A. Gallique	1	2,537	0,231	0,9998	0,889

En résumé pour le mélange binaire, le nombre de CPs retenues dans le modèle PLS pour la détermination de l'acide caféique est 3, alors qu'une seule composante suffit pour l'acide gallique.

Le tableau précédent (III.4) regroupe les différents critères statistiques permettant d'évaluer le pouvoir prédictif et la fiabilité du modèle PLS établi : *RMSD* (la racine de la moyenne des carrés des différences entre la valeur prédite et la valeur de référence) et *REP* (l'erreur relative de prédiction) ont de très petites valeurs, 0,062 et 0,231 pour le *RMSD*, et 0,381 et 0,889 pour le *REP*.

La figure III.10, suivante, présente la concentration prédite des échantillons test en fonction de leur concentration mesurée. Elle montre l'alignement, sur la première bissectrice, des différents points représentant les échantillons test, et ce pour les deux constituants : l'acide gallique et l'acide caféique. D'ailleurs, c'est une chose évidente étant donné que les coefficients de corrélation R^2 , cités dans le tableau III.4, entre les valeurs prédites et mesurées des concentrations des échantillons test sont très proches de l'unité : 0,9999 pour l'acide caféique, et 0,9998 pour l'acide gallique.

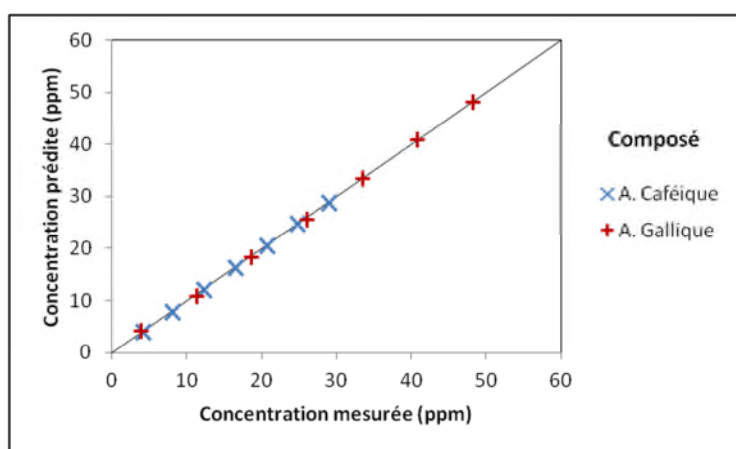


Figure III.10 : Concentration prédite des échantillons test, en fonction de leur concentration mesurée

III.3.2. Mélange ternaire

III.3.2.1. Etape d'étalonnage

Une série de 21 échantillons d'étalonnage a été préparée pour l'élaboration du modèle mathématique. L'analyse a été réalisée dans le domaine de longueurs d'onde de [200 - 500] nm.

Les domaines de concentration choisis pour les trois constituants sont les suivants :

- ✓ Acide Caféique: [6 - 21] ppm ;
- ✓ Acide Gallique: [10 - 35] ppm ;
- ✓ Quercétine: [6,4 - 17,5] ppm.

Les compositions de ces échantillons d'étalonnage sont données dans le tableau suivant :

Tableau III.5. Composition des échantillons d'étalonnage du mélange

Echantillon d'étalonnage N°	Concentration (ppm)		
	A. Caféique	A. Gallique	Quercétine
E _E 1	21	10	6,4
E _E 2	18	10	8,62
E _E 3	18	15,2	6,4
E _E 4	15	10	10,84
E _E 5	15	15,2	8,62
E _E 6	15	20	6,4
E _E 7	12	10	13,06
E _E 8	12	15,2	10,84
E _E 9	12	20	8,62
E _E 10	12	25,2	6,4
E _E 11	9	10	15,28
E _E 12	9	15,2	13,06
E _E 13	9	20	10,84
E _E 14	9	25,2	8,62
E _E 15	9	30	6,4
E _E 16	6	10	17,5
E _E 17	6	15,2	15,28
E _E 18	6	20	13,06
E _E 19	6	25,2	10,84
E _E 20	6	30	8,62
E _E 21	6	35,2	6,4

a. Spectres des échantillons d'étalonnage

Les spectres d'absorption UV-Vis obtenus pour les échantillons d'étalonnage des mélanges ternaires sont présentés sur la figure III.5.

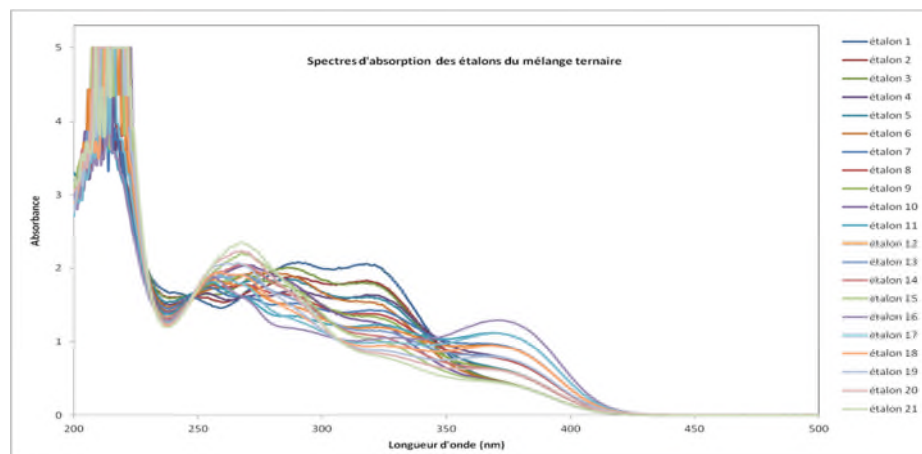


Figure III.11. Spectres d'absorption des échantillons d'étalonnage du mélange ternaire

L'ensemble de ces spectres permet de distinguer trois domaines :

- ✓ Dans le domaine [200 - 230] nm, nous avons des absorbances trop élevées pour les différents échantillons d'étalonnage, raison pour laquelle elle n'est pas prise en considération dans l'élaboration du modèle mathématique. Cette absorbance importante est explicable, en prenant en compte le caractère additif des absorbances dans les mélanges, par le fait que les spectres d'absorption des trois constituants, pris séparément, présentent des valeurs très élevées dans ce domaine, avec :
 - 3,307 à 219 nm pour l'acide gallique à 30 ppm, et qui présentent des absorbances supérieures à 2,5 dans l'intervalle [200 - 227] nm ;
 - 1,716 à 216 nm pour l'acide caféique à 20 ppm ;
 - Et 3,252 à 206 nm pour la quercétine à 18 ppm, et qui présente une surcharge dans ce domaine comme indiqué dans l'étude individuelle précédente.
- ✓ Le domaine [230 - 250] nm, les valeurs des absorbances sont acceptables (entre 1 et 2), mais la variation n'est pas très claire, ce qui rend cette partie non exploitable.

- ✓ Dans le domaine de longueurs d'onde [250 - 450] nm, nous constatons la présence de quatre pics d'absorption pour l'ensemble des échantillons d'étalonnage:
- A 266,5 nm (une absorbance de 2,657), qui correspond à la longueur d'onde caractéristique de l'acide gallique (267 nm), pour l'échantillon d'étalonnage N°21 contenant la concentration maximale de ce composé ;
 - A 291 nm et 316 nm (avec des absorbances de 2,464 et de 2,775 respectivement), nous avons deux pics d'absorption de l'échantillon d'étalonnage N°1 dont la concentration est maximale en acide caféique. Ces deux longueurs d'ondes sont pratiquement identiques aux longueurs d'onde caractéristiques de l'acide caféique qui sont : 288 nm et 312 nm ;
 - Enfin, pour l'échantillon d'étalonnage N°16, à 372,5 nm (une absorbance de 1,500) qui est la longueur d'onde caractéristique de la quercétine (373 nm), ce qui s'explique par le fait que cet échantillon est constitué majoritairement de la quercétine.

Comme c'est le cas pour le mélange binaire, les spectres des échantillons d'étalonnage du mélange ternaire ne présentent aucun nouveau pic d'absorption, ce qui exclue toute réaction chimique entre les trois composés.

b. Validation croisée : sélection du nombre optimum de composantes principales

La figure III.12 présente la variation de la valeur de *PRESS* en fonction du nombre de CPs dans le modèle PLS pour la série d'échantillon d'étalonnage du mélange ternaire.

Le nombre optimal de composantes principales retenues par le modèle est celui qui correspond à la valeur minimale de *PRESS*.

Le modèle d'étalonnage du mélange binaire acide gallique-acide caféique est construit en utilisant la série d'échantillons d'étalonnage préparés précédemment, et sa fiabilité est vérifiée en utilisant 7 échantillons test, ce qui sera présenté dans la partie « résultats de la validation ».

L'intervalle de longueurs d'onde choisi pour l'élaboration du modèle PLS du mélange ternaire est : [250-430] nm, les mesures sont effectuées avec un pas de 0,5 nm, ce qui nous donne un nombre de variable de 361 variables.

D'après la figure III.12, deux composantes principales sont retenues, pour le modèle PLS, dans la détermination simultanée des trois composés.

Les valeurs de *PRESS* correspondantes sont 0,031, 0,039 et 0,083 pour la quercétine, l'acide gallique, et l'acide caféique respectivement.

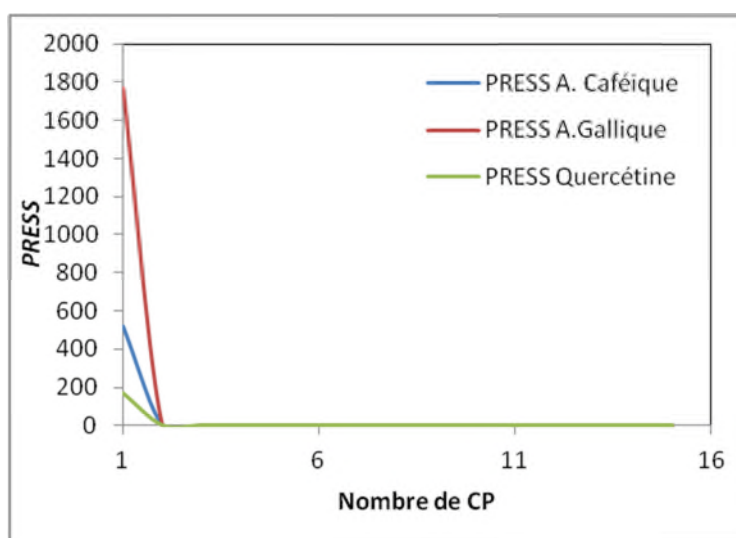


Figure III.12 : Courbes de *PRESS* en fonction du nombre de composantes principales

III.3.2.2. Résultats de la validation : étape test

Tout comme pour le mélange binaire, une fois l'étape d'étalonnage réalisée et le modèle mathématique élaboré, nous avons préparé les échantillons test (sept échantillons) pour réaliser l'étape de prévision et vérifier la validité du modèle.

Ces échantillons sont des échantillons synthétiques préparés de la même manière que ceux de l'étalonnage et leurs compositions appartiennent aussi aux domaines de concentrations choisis pour les échantillons d'étalonnage. Ces compositions sont indiquées dans le tableau III.6.

Tableau III.6. Composition des échantillons test du mélange ternaire

Echantillons test N°	Concentration (ppm)		
	A. Caféique	A. Gallique	Quercétine
E _T 1	19,00	11,73	7,14
E _T 2	15,00	15,07	8,62
E _T 3	12,00	15,07	10,84
E _T 4	10,00	16,80	11,58
E _T 5	9,00	25,07	8,62
E _T 6	6,00	15,07	15,28
E _T 7	6,00	30,13	8,62

a. Présentation et discussion des résultats de l'analyse spectroscopique

Les spectres d'absorption sont présentés dans la figure III-13. Ces spectres présentent le même comportement des échantillons d'étalonnage :

- ✓ L'échantillon N°1 par exemple, qui contient une concentration presque maximale en acide caféique (19 ppm), et des concentrations minimales en acide gallique (11,73 ppm) et en quercétine (7,14 ppm), présente deux pics identiques à ceux de l'acide caféique : 288 nm avec une absorbance de 1,984, et à 318 nm d'une absorbance de 1,893.
- ✓ L'échantillon N°6, contient une concentration presque maximale de quercétine qui est de 15,28 ppm, une concentration minimale en acide caféique (6 ppm) et une concentration assez faible en acide gallique (15,07 ppm). Son spectre d'absorption présente un pic d'absorption maximale à 370 nm avec une absorbance de 1,113. Cette longueur d'onde est légèrement inférieure à de la quercétine.
- ✓ L'échantillon N°7, contenant une concentration très importante en acide gallique (30,13 ppm) et des concentrations minimales en acide caféique (6 ppm) et en quercétine (8,62 ppm) présente une absorbance maximale égale à 2,212 à 267 nm qui caractérise l'acide gallique.

Ces constatations confirment que dans ces mélanges nous n'avons pas d'interaction chimiques entre les trois composés, puisque nous ne constatant la présence d'aucune nouvelle longueur d'onde caractéristique, et que chaque composé tend à imposer son aspect spectral pour les mélanges dans lesquels sa concentration est importante.

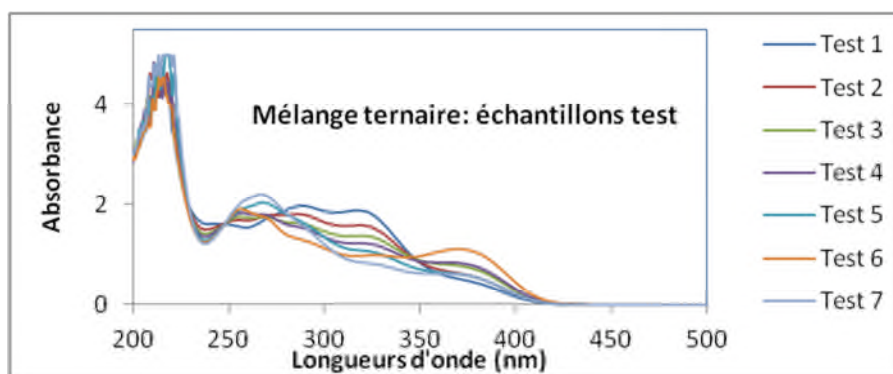


Figure III.13. Spectres d'absorption UV-Visible des échantillons test du mélange ternaire

b. Détermination simultanée des constituants dans les mélanges de la série test

Les valeurs prédites et les taux de recouvrement du mélange ternaire acide gallique-acide caféique-quercétine sont rassemblés dans le tableau III.7.

Les valeurs de recouvrement en (%) obtenues en utilisant la PLS sont comprises dans les intervalles : [98,75-100,85] pour l'acide caféique, [98,35-102,07] pour l'acide gallique et [98,52-100,90] pour la quercétine. Ces valeurs sont très proches de 100% pour la prédiction des concentrations des trois composés dans le mélange ternaires, ce qui prouve la fiabilité du modèle construit, puisque le paramètre recouvrement signifie la reproductibilité des concentrations contenues dans ces échantillons test.

Tableau III.7 : Résultats de la prédiction du mélange ternaire de la série test par la PLS.

Echantillon test N°	Valeurs prédites (ppm)			Recouvrement (%)		
	A. Caféique	A. Gallique	Quercétin e	A. Caféique	A. Gallique	Quercétin e
1	19,00	11,98	7,03	99,97	102,07	98,52
2	15,05	14,82	8,70	100,34	98,35	100,88
3	11,99	15,04	10,86	99,91	99,79	100,23
4	9,87	16,85	11,63	98,75	100,32	100,39
5	9,02	24,90	8,70	100,21	99,35	100,90
6	6,02	15,13	15,24	100,34	100,44	99,73
7	6,05	30,21	8,54	100,85	100,27	99,12

Tableau III.8 : Paramètres statistiques du mélange ternaire acide caféique-acide gallique-quercétine

Composé	Nombre de CPs	<i>PRESS</i>	<i>RMSD</i>	R^2	<i>REP</i> (%)
A. Caféique	2	1,096	0,056	0,999	0,507
A. Gallique	2	2,054	0,152	0,999	0,827
Quercétine	2	0,958	0,069	0,999	0,681

D'après le Tableau III.8, deux CPs sont nécessaires et suffisantes pour la détermination des trois constituants du mélange. Les valeurs de *RMSD* et *REP* sont très petites (entre 0,056 et 0,152 pour *RMSD* et entre 0,507 et 0,827 pour *REP*) ce qui signifie que les erreurs de prédiction sont très minimes, ce qui se voit très clairement sur les figures III.14.a, III.14.b et III.14.c ci-dessus, sur lesquelles, les points représentant les concentrations prédites

des mélanges test en fonction de leur concentrations mesurées en chaque constituant sont bien alignés sur la première bissectrice ou bien très proche d'elle.

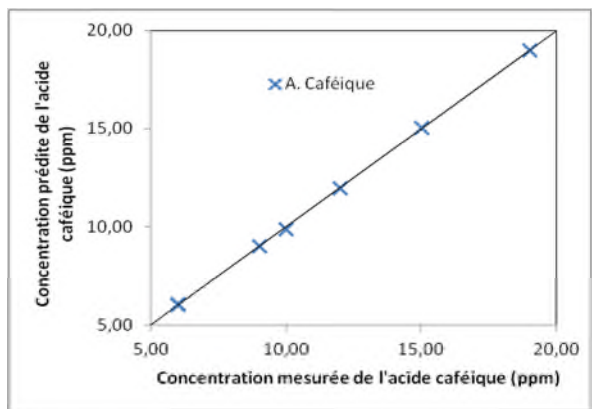


Figure III.14.a : Concentration prédite en acide caféique des échantillons test, en fonction de leur concentration mesurée

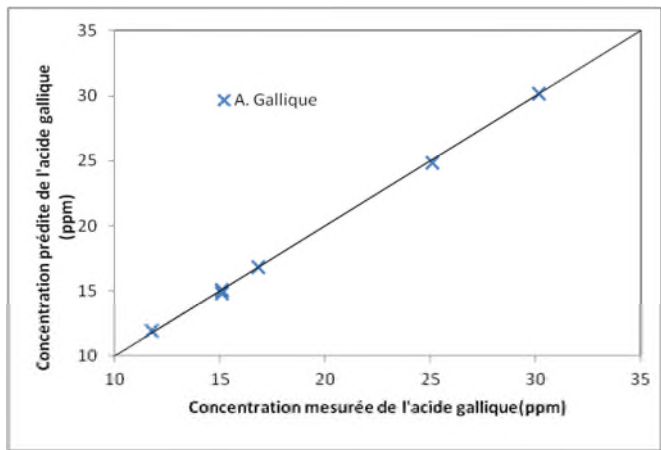


Figure III.14.b : Concentration prédite en acide gallique des échantillons test, en fonction de leur concentration mesurée

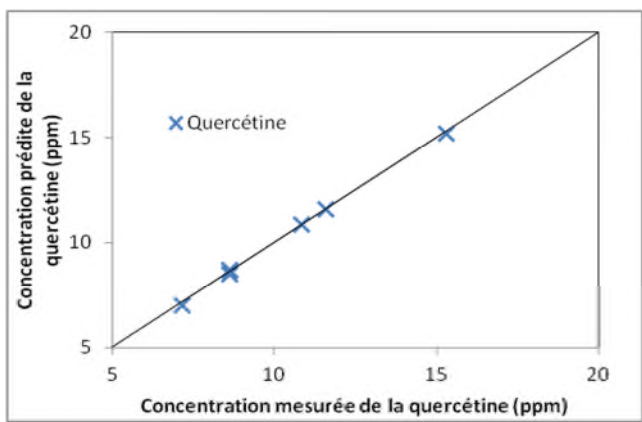


Figure III.14.c : Concentration prédite en quercétine des échantillons test, en fonction de leur concentration mesurée

III.4. Conclusion

Nous nous sommes intéressés dans ce chapitre à l'application de la régression aux moindres carrés partiels PLS pour la résolution de données de spectres d'absorption UV/visible d'un mélange binaire : acide caféique-acide gallique, et ternaire : acide caféique-acide gallique-quercétine.

Nous avons tout d'abord, construit le modèle PLS pour chaque mélange, le modèle du mélange binaire a été construit en utilisant quatorze échantillons d'étalonnage, alors que pour le mélange ternaire, vingt et un échantillons d'étalonnage sont nécessaires.

Le nombre de composantes principales nécessaires et suffisantes à la détermination de chaque constituant a été déterminé en utilisant la méthode de la validation croisée.

Les paramètres des deux modèles PLS établis ont été déterminés. Les résultats obtenus montrent que le nombre optimal de composantes principales des modèles PLS sont 2 pour le mélange ternaire, et pour le mélange binaire, 1 pour l'acide gallique et 3 pour l'acide caféique.

L'étape test nous a permis d'évaluer le pouvoir prédictif des modèles d'étalonnage obtenus. Les valeurs moyennes de *REP* en % sont respectivement 0,635 dans le cas du mélange binaire et 0,672 dans le cas du mélange ternaire. Les valeurs des différents paramètres statistiques des deux modèles montrent que la méthode PLS convient bien à la résolution de ce type de mélanges, avec : R^2 supérieur à 0,9998 pour le mélange binaire, et de 0,999 pour les différents constituants du mélange ternaire, et un *RMSD* moyen de 0,1465 pour le mélange binaire et de 0,0923 pour le ternaire.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Le but du présent travail est l'élaboration d'une méthode de détermination simultanée rapide, efficace et moins onéreuse, de trois composés phénoliques (l'acide gallique, l'acide caféique et la quercétine) largement présents dans les ressources agroalimentaires et connus pour leurs pouvoirs antioxydants, par la spectrophotométrie UV-Vis, en utilisant les méthodes chimiométriques.

L'essentiel des aboutissements de cette étude est donné comme suit:

1. L'étude des solutions de chaque composé pur, nous a permis d'arriver aux résultats suivants :

➤ Nous avons établie les spectres d'absorption dans l'UV-Vis de chaque composé phénolique, et nous avons pu déterminer se longueurs d'onde d'absorption maximales :

- pour l'acide gallique : deux longueurs d'onde λ_{\max} , la première à 220 nm et qui n'est pas exploitable car elle présente des absorbances trop élevées (supérieure à 3), la deuxième à 267 nm et c'est à cette dernière que nous avons établie la courbe d'étalonnage.
- pour l'acide caféique nous constatons la présence de trois longueurs d'onde λ_{\max} : la première à 217 nm, la deuxième à 288 nm et la troisième à 312 nm. A ces trois longueurs d'onde nous constatons que les absorbances sont l'égerment différentes : 2,483 ; 2,320 et 2,477 respectivement pour la solution de concentration 30 ppm, c'est pour cette raison que nous avons établie les courbes d'étalonnage à ces trois longueurs d'onde.
- pour la quercétine : nous notons la présence de deux pics d'absorption correspondants respectivement aux longueurs d'onde (λ_{\max}) 256 nm et 373 nm, et une partie des spectres ([20 – 230] nm) qui n'est pas exploitable car elle présente une surcharge et des absorbances trop élevées (supérieures à 3). Les deux longueurs d'onde (λ_{\max}) présentent des absorbances très rapprochées : 1,823 et 1,940 respectivement pour la solution à 25 ppm, et une variation

relative de l'absorbance vis-à-vis des concentrations, c'est pour ces raisons que nous avons établie les courbes d'étalonnage à ces deux longueurs d'onde.

➤ Nous avons pu déterminer les intervalles de linéarité qui sont : [0,01-50] ppm, [0,05-30] ppm et [1,5 – 25] ppm pour l'acide gallique, l'acide caféique et la quercétine respectivement, aux longueurs d'onde citées précédemment.

➤ Pour les équations de régressions des trois composés, les coefficients de corrélation sont très proches de 1, ce qui signifie une grande précision de la courbe d'étalonnage.

2. L'étude spectrale du mélange binaire des acides gallique et caféique nous a permis de constater que quand un constituant est majoritaire dans un échantillon, il impose son aspect spectral et les absorbances maximales de cet échantillon se situent aux longueurs d'ondes d'absorption maximales de ce composé. Ce qui nous permet aussi de dire qu'aucune réaction chimique n'as lieu entre les deux composés puisque nous n'avons apparition d'aucune nouvelle longueur d'onde maximale et ce pour les échantillons des deux séries : étalonnage et test.

3. Cette étude spectrale a permis aussi l'élaboration de deux modèles d'étalonnage PLS, le premier comporte trois composantes principales avec une valeur de *PRESS* égale à 0,733 pour la détermination quantitative de l'acide caféique et le deuxième comporte une seule composante principale avec un *PRESS* égal à 2,537 pour la détermination quantitative de l'acide gallique.

4. L'application de ce modèle aux mélanges test a démontré sa fiabilité puisque ses erreurs de prédiction des deux composés sont faibles avec un recouvrement compris entre 97,83 % et 109,83 % pour l'acide gallique, et entre 99,45 % et 100,69 % pour l'acide caféique. Les paramètres statistiques utilisés pour mesurer le pouvoir prédictif de chaque modèle dans la détermination de chaque composé sont : l'erreur moyenne de prédiction du composé *RMSD* et l'erreur moyenne relative de prédiction du composé *REP*(%):

- Pour l'acide caféique : *REP* (%) : 0,381 ; *RMSD* : 0,062 et $R^2 = 0,9999$;
- Pour l'acide gallique : *REP* (%) : 0,889 ; *RMSD* : 0,231 et $R^2 = 0,9998$.

5. Pour l'étude du mélange ternaire, nous constatons toujours que la partie des spectres qui s'étale sur le domaine [200 - 230] nm n'est pas exploitable puisqu'elle présente des absorbances trop élevées (supérieure à 3) et une surcharge des spectres. Nous notons aussi la présence des quatre pics caractéristiques des trois composés uniquement ce qui élimine

la possibilité de présence de nouveau composé dans le mélange résultant de réaction entre les différents constituants. Ces constatations sont aussi valables pour les échantillons d'étalonnage que pour ceux de l'étape test.

6. L'application de la PLS aux résultats spectraux des échantillons d'étalonnage du mélange ternaire : acide caféique, acide gallique et quercétine, a permis d'élaborer un modèle d'étalonnage à deux composantes principales pour les trois constituants du mélange avec des valeurs de PRESS de 0,083 pour l'acide caféique ; 0,039 pour l'acide gallique; et 0,031 pour la quercétine.
7. Le modèle d'étalonnage réalisé pour ce mélange aussi, a présenté une excellente fiabilité dans la prédiction des concentrations des mélanges test avec des recouvrements compris entre : 98,75 % et 100,85 % pour l'acide caféique, 98,35 % et 102,07% pour l'acide gallique, et 98,52 % et 100,90% pour la quercétine. Ces paramètres statistiques sont les suivants :
 - Pour l'acide caféique : REP (%) : 0,507 ; RMSD : 0,056 et $R^2 = 0,999$;
 - Pour l'acide gallique : REP (%) : 0,827 ; RMSD : 0,152 et $R^2 = 0,999$;
 - Pour l'acide gallique : REP (%) : 0,681 ; RMSD : 0,069 et $R^2 = 0,999$.
8. La méthode de la validation croisée est utilisée dans le but d'éviter le problème de sur-modélisation (sur-ajustement), elle permet de calculer la valeur de *PRESS* en fonction du nombre de composantes principales retenues par le modèle.

En guise de perspective, nous proposons l'application des modèles établis à des mélanges plus complexes contenant d'autres composés pour évaluer leur effet et vérifier la robustesse de ces modèles afin de les perfectionner. Le but étant une application des modèles retenus, aux mélanges réels de substances synthétiques ou naturelles.

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] A Adlouni et al., Impact de l'huile d'argan sur le cancer de la prostate : étude de l'effet antiprolifératif des polyphénols, *Revue francophone des laboratoires*, Novembre 2009.
- [2] Q. Chen, J. Zhao, X. Huang, H. Zhang, M. Liu, *Simultaneous determination of total polyphenols and caffeine contents of green tea by near-infrared reflectance spectroscopy*; *Microchemical Journal* 83 (2006) 42–47
- [3] F. Amezouar, W. Badri, M. Hsaine, N. Bourhim, H. Fougrach, *Evaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire de Erica arborea L. du Maroc*, *Pathologie Biologie* 61 (2013) 254–258
- [4] F. Avlessi, J. Dangou, V.D. Wotto, G.A. Alitonou, D.K. Sohounhloue, C. Menut, *Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de Clausena anisata(Wild) Hook*, *C. R. Chimie* 7 (2004) 1057–1061
- [5] L. Serve et al, *Journal of Chromatography*, 259 (1983) 319-328
- [6] *La régression PLS ; Théorie et pratique*, Michel Tenenhaus, éditions Technip, Paris, 1998, ISBN 2-7108-0735-1
- [7] P. Gemperline, *Practical Guide to Chemometrics*, 2^{ème} édition, CRC Press, NY, USA, 2006.
- [8] D. Palomba, G. E. Vazquez, M. F.Díaz ; *Prediction of elongation at break for linear polymers*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 139 (2014) 121–131
- [9] K. Hasegawa, K. Funatsu; *Application of orthogonal L-shaped PLS to chemogenomics data and its chemical interpretation from predictive and orthogonal regression coefficients*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 139 (2014) 64–69
- [10] L. Xie, Y. Ying, T. Ying, *Classification of tomatoes with different genotypes by visible and short-wave near-infrared spectroscopy with least-squares support vector machines and other chemometrics*, *Journal of Food Engineering* 94 (2009) 34–39
- [11] M. Andersson, M. Josefson, F. W. Langkilde, K. G. Wahlund, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999, 20, 27-37.

- [12] M. Blanco, J. Coello, F. Gonzalez, H. Iturriaga, S. Maspoch, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1993, 82, 834-837.
- [13] T. Herkert, H. Prinz, K. A. Kovar, *Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2001, 51(1), 9-16.
- [14] D. Jouan-Rimbaud, M. S. Khots, D. L. Massart, I. R. Last, K. A. Prebble, *Anal. Chim. Acta*, 1995, 315(3), 257-266.
- [15] Thèse de Doctorat, Kachbi A., *Étalonnages multivariés de données spectroscopiques et analyses de mélanges complexes*, Université A. Mira, Bejaia, 2011.
- [16] Y. Zhang, T. Fearn; *A linearization method for partial least squares regression prediction uncertainty*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 140 (2015) 133–140
- [17] U. Depczynski, K. Jetter, K. Molt, A. Niemoller, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1999, 47, 179-187.
- [18] D. Belsley, E. Kuh, R. Welsch, *Regression Diagnostics: Identifying influential data and sources of collinearity*, Wiley, NY, USA, 1980.
- [19] P. Geladi, K. J. Esbensen, *Chemometrics*, 1990, 4, 337-354.
- [20] S. De Jong, *SIMPLS: an alternative approach to partial least squares regression*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 1993, 18, 251-263.
- [21] M. Benamor, N. Aguerssif, (2008)
- [22] N. Aguerssif, M. Benamor, A Kachbi, M. T. Draa, *Simultaneous determination of Fe(III) and Al(III) by first-derivative spectrophotometry and partial least-squares (PLS-2) method – Application to post-haemodialysis fluids*, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 22 (2008) 175–182
- [23] A. Kachbi, M. Benamor, N. Aguerssif, *Simultaneous Spectrophotometric Determination of Co^{2+} , Ni^{2+} and Cu^{2+} in Industrial Alloys Using Partial Least Squares Method*, *Current Analytical Chemistry* 6 (2010) 88-93
- [24] P. Valera, F. Pablos, A.G. Gonzhlez, *Classification of tea samples by their chemical composition using discriminant analysis*, *Talanta* 43 (1996) 415-419

- [25] Q. Chen, J. Zhao, H. Zhang, X. Wang, *Feasibility study on qualitative and quantitative analysis in tea by near infrared spectroscopy with multivariate calibration*; *Analytica Chimica Acta* 572 (2006) 77–84
- [46] N. Aguerssif, M. Benamor, A. Kachbi, *Simultaneous determination of Fe(III) and Al(III) by first-derivative spectrophotometry and partial least-squares (PLS-2) method Application to post-haemodialysis fluids*, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 22 (2008) 175–182.
- [27] V.R. Sinija*, H.N. Mishra, *FT-NIR spectroscopy for caffeine estimation in instant green tea powder and granules*; *LWT - Food Science and Technology* 42 (2009) 998–1002
- [28] R. Ferrer-Gallego, J.M. Hernández-Hierro, J.C. Rivas-Gonzalo, M.T. Escribano-Bailón, *Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy*, *LWT - Food Science and Technology* 44 (2011) 847-853
- [29] C. Sârbu, R.D. Nascu-Briciu, A. Kot-Wasik, S. Gorinstein, A. Wasik, J. Namiesnik, *Classification and fingerprinting of kiwi and pomelo fruits by multivariate analysis of chromatographic and spectroscopic data*, *Food Chemistry* 130 (2012) 994–1002
- [30] L. Rigoni, S. Venti, M. Bevilacqua, R. Bucci, A.D. Magrì, A.L. Magrì, F. Marini, *Quantification of the enantiomeric excess of two APIs by means of near infrared spectroscopy and chemometrics*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 133 (2014) 149–156
- [31] F. Marini, A. D'Aloise, R. Bucci, F. Buiarelli, A.L. Magrì, A.D. Magrì, *Fast analysis of 4 phenolic acids in olive oil by HPLC-DAD and chemometrics*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 106 (2011) 142–149
- [32] F.M.V. Pereira, M.I.M.S. Bueno, *Calibration of paint and varnish properties: Potentialities using X-ray Spectroscopy and Partial Least Squares*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 92 (2008) 131–137
- [33] Y. Felkel, N. Dörr, F. Glatz, K. Varmuza, *Determination of the total acid number (TAN) of used gas engine oils by IR and chemometrics applying a combined strategy for variable selection*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 101 (2010) 14–22
- [34] A.M. Peres, P. Baptista, R. Malheiro, L.G. Dias, A. Bento, J.A. Pereira, *Chemometric classification of several olive cultivars from Trás-os-Montes region (northeast of Portugal)*

using artificial neural networks, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 105 (2011) 65–73

[35] R. Nescatelli, R.C. Bonanni, R. Bucci, A.L. Magrì, A.D. Magrì, F. Marini, *Geographical traceability of extra virgin olive oils from Sabina PDO by chromatographic fingerprinting of the phenolic fraction coupled to chemometrics*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 139 (2014) 175–180

[36] W. Zhenga, X. Fu, Y. Ying, *Spectroscopy-based food classification with extreme learning machine*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 139 (2014) 42–47

[37] L. Jiao, Z. Xue, G. Wang, X. Wang, H. Li, *Application of Fourier transform to preprocessing chromatographic fingerprints of traditional Chinese medicine*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 140 (2015) 141–148

[38] H. Zhuang, Y. Ni, S. Kokot, *Combining HPLC–DAD and ICP-MS data for improved analysis of complex samples: Classification of the root samples from Cortex moutan*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 135 (2014) 183–191

[39] A. Worachartcheewan, C. Nantasenamat, C. Isarankura-Na-Ayudhya,

S. Prachayasittikul, V. Prachayasittikul, *Predicting the free radical scavenging activity of curcumin derivatives*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 109 (2011) 207–216

[40] J. Orzel, M. Daszykowski, *A rapid validation of the antioxidant capacity of food commodities based on their fluorescence excitation emission spectra as applicable to coffee and peppermint extracts*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 137 (2014) 74–81

[42] H. Abdollahi, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 442, 327–336.

[43] H. Abdollahi, J. Zolgharnein, G. H. Azimi, D. Jafarifar, *Talanta*, 2003, 59, 1141–1151.

[44] A. Afkhami, M. Bahram, A. R. Zarei, *Microchim. Acta*, 2004, 148, 317–326.

[45] K. Zarei, M. Atabati, Z. Malekshabani, *Anal. Chim. Acta*, 2006, 556, 247–254.

[46] L. Yuanqian, H. Jingmei, Y. Jingguo, Z. Boa, H. Yuanqing, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 461, 181–188.

[47] Y. Ni, S. Chena, S. Kokot, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 463, 305–316.

- [48] S. Wold, H. Martens, H. Wold, *The multivariate calibration problem in chemistry solved by PLS method Proceedings, conference on Matrix Pencils*, Heidelberg, 1982.
- [49] A.M.G.Rodriguez, A.G.TORRES, J.M.C.PAVON et C.B.OJEDA, *Talanta* 47 (1998) 463.
- [50] J. Ghasemi, A. Niazi et A.Safavi, *Analytical Letters* 34 (2001) 1389.
- [51] H. Abdollahi, M. S. Panahi et M. R. Khoshayand, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, October (2003) 207.
- [52] J.M.Camina, M.S.Boeris, L.D.Martinez, J.M.Luco et E.J.Marchevsky, *Chem. Anal.* 49 (2004) 717.
- [53] L.Hejazi, D.E.Mohammadi, Y.Yamini et R.G.Brereton, *Talanta* 62 (2004) 185.
- [54] J. Brzozowska P. Hanower, J. Tanguy, *Polyphenols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel*, *Phytochemistry*, 1973, Vol. 12, 2353 - 2357.
- [55] IARC Monographs, volume 73, Quercetin
- [56] C.-H. Yoon et al., *Revue du rhumatisme* 80 (2013) 271–278
- [57] *Recueil International des Méthodes d'Analyses – OIV, Indice de Folin-Ciocalteu*, OIV-MA-AS2-10 : R 2009
- [58] K. L. Cheng, K. Ueno et T. Imamura, *Handbook of Organic Analytical Reagents*, CRC
- [59] H. El Hajjouji et al., *Bioresource Technology* 99 (2008) 4958–4965
- [80] *Identification spectrométrique de composés organiques*, Silverstein ; Webster ; Kiemle, éditions De Boeck & Larcier, 2^{ème} édition, 2009, ISBN 978-2-8041-5507-0
- [61] N. Dupuy, C. Wojciechowski, J. P. Huvenne, *Sciences des aliments*, 1999, 19(6), 677-686.
- [62] K. Zarei, M. Atabati, Z. Malekshabani, *Anal. Chim. Acta*, 2006, 556, 247–254.
- [63] Dj, Mothadi et al, *Con Insl. Food Sci. Technol. J.* Vol. 19, No.3, pp. 95-103, 1986
- [64] *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*, Dominique Bertrand ; Eric Dufour, éditions TEC & DOC, 2000, ISBN 2-7430-0375-8
- [65] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, J. Pages, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 384(2), 207-214.

[68] H.A.Dantas Filho, E.S.DE Souza, V.Visani et S.R.DE Barros, *J. Braz. Chem. Soc.* 16 (2005) 58.

[69] P. C. Nascimento, C. L. Jost, M. V. Guterres, L. D. DelFabro, L. M. Carvalho, D. Bohrer, *Talanta*, 2006, 70, 540–545.

[70] S. De Jong, B. M. Wise, N. L. Ricker, *J. Chemometrics*, 2001, 15(2), 85-100.

Étude de la détermination spectrophotométrique simultanée de composés dans des mélanges binaire et ternaire

Résumé

Nous avons appliqué la PLS pour l'exploitation des données d'analyse spectroscopique UV-Visible de deux mélanges d'antioxydants phénoliques : un mélange binaire de deux acides phénoliques l'acide gallique et l'acide caféique, et un mélange ternaire contenant en plus des deux acides phénoliques la quercétine.

L'étape d'étalonnage est réalisée sur la base de résultats d'analyse de 14 échantillons d'étalonnage pour le mélange binaire et 21 pour le mélange ternaire.

La détermination du nombre de composantes principales pour chaque modèle est réalisée en appliquant la méthode de validation croisée qui permet aussi d'éviter la sur-modélisation. L'étape test réalisée en utilisant une série de sept échantillons pour chaque mélange, nous permet de vérifier la fiabilité du modèle d'étalonnage élaboré. Cette fiabilité est vérifiée par deux critères principaux : le recouvrement en % et l'erreur relative de prédiction *REP* en %. Les valeurs du critère recouvrement sont comprises entre 97,83 % et 109,83 % pour le mélange binaire, et entre 98,35 % et 102,07 % pour le mélange ternaire. Par ailleurs, les valeurs de *REP* maximales sont : 0,889 % pour le mélange binaire et 0,827 % pour le cas du mélange ternaire. Ces résultats montrent des erreurs de prédiction très minimales et qui sont plus faibles dans le cas du mélange ternaire.

Mots clés : PLS, antioxydants, analyse spectroscopique.

Simultaneous spectrophotometric determination study of compounds in binary and ternary mixture

Abstract

The PLS method has been applied to the calibration of UV-Visible spectroscopic analysis data of two mixtures of phenolic antioxidants: a binary mixture of two phenolic acids gallic acid and caffeic acid, and a ternary mixture containing the two phenolic acids and quercetin.

The calibration step is performed by analyzing 14 samples for the binary mixture and 21 to the ternary mixture.

Determining the number of principal components for each model is achieved by applying the cross-validation method which allows also avoiding over-modeling. The test step performed using a series of seven samples for each mixture allows us to verify the reliability of the developed calibration model. This reliability is verified by two main criteria: the recovery in% and prediction relative error (*REP*) in%. Recovery criterion values are between 97.83 % and 109.83 % for the binary mixture and between 98.35 % and 102.07 % for the ternary mixture. Furthermore, the maximum *REP* values are 0.889 % for the binary mixture and 0.827 % in the case of the ternary mixture. These results show very minimal prediction errors which are lower in the case of the ternary mixture.

Keywords: PLS, antioxidants, spectroscopic analysis.

دراسة التحليل الكمي لمكونات مزيج ثنائي وثلاثي

ملخص

طبقتنا PLS على نتائج التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية والمرئية لمزيجين من مضادات الأكسدة الفينولية : مزيج ثنائي من اثنين من الأحماض الفينولية حمض الغاليك و حمض الكافيك، و مزيج ثلاثي يحتوي على الكرسيتين إضافة إلى الحمضين الفينوليين السابقين.

تم تنفيذ مرحلة المعايرة على أساس نتائج تحليل 14 عينة للمزيج الثنائي و 21 عينة للمزيج الثلاثي. اجراء مرحلة الاختبار تم باستخدام سلسلة من سبع عينات لكل مزيج بحيث يسمح لنا بالتحقق من مدى صحة النتائج المحصلة من تطبيق نماذج المعايرة المحصل عليها. و هذا ما يتم التحقق منه بالاعتماد على معيارين رئيسيين: *Recovery* (%) والخطأ النسبي للتنبؤ *REP* (%). قيم المعيار *Recovery* محصورة بين 97.83 % و 109.83 % بالنسبة للمزيج الثنائي و بين 98.35 % و 102.07 % للمزيج الثلاثي. وعلاوة على ذلك، فإن قيم *REP* القصوى هي 0.889 % للمزيج الثنائي و 0.827 % في حالة المزيج الثلاثي. تظهر هذه النتائج أن أخطاء التنبؤ ضئيلة جدا و هي أقل في حالة المزيج الثلاثي.

كلمات استدلالية: مضادات الأكسدة، مركبات فينولية.