

# Sommaire

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>2</b>
<b>I. Présentation de l'agence nationale des plantes médicinales et aromatiques (INPMA).....</b>	<b>3</b>
<b>II. Les plantes aromatiques et médicinales.....</b>	<b>4</b>
1. Généralités.....	4
2. Aspect économique : .....	5
3. Aspect environnementale .....	5
<b>III. Généralité sur la plante étudiée : (Lavandula Stoechas. L).....</b>	<b>6</b>
1. Systématique et écologie de la lavande stoechade.....	6
2. Propriétés thérapeutiques et pharmacologique de la lavande a toupet.....	7
3. Compositions chimique de l'extrait méthanoïque de la lavande stoechad.....	7
<b>IV. Extraction par les ultrasons.....</b>	<b>8</b>
1. Principe de l'ultrason.....	8
2. Les paramètres influents.....	11
<b>V. Méthodologie des plans d'expériences.....</b>	<b>11</b>
1. Principe .....	11
2. Vocabulaire de base des plans d'expériences.....	13
3. Modélisation par régression linéaire multiples.....	15
4. Conditions d'application des plans d'expériences.....	16
5. Validation du modèle postulé.....	16
6. Plan de surface de réponse de type Box-Behnken.....	18
<b>PARTIE MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>20</b>
<b>I. Matériel végétal utilisé.....</b>	<b>21</b>
<b>II. Protocole expérimentales.....</b>	<b>21</b>
1. L'extraction assistée par ultrasons.....	21

2. Dosage des composés phénolique.....	23
<b>II. Etude d'optimisation.....</b>	<b>24</b>
1. Définir le problème.....	24
2. Déterminer les objectifs : .....	24
3. Définir les sorties (les réponses) :.....	25
4. Définir les entres (les facteurs) : .....	25
5. Choix d'une stratégie.....	25
<b>PARTIE RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>29</b>
<b>I. Résultat de l'étude d'optimisation.....</b>	<b>30</b>
<b>II. Analyse des résultats de l'étude d'optimisation.....</b>	<b>30</b>
1. Analyse des réponses .....	30
2. Analyse de la variance et manque d'ajustement .....	31
3. Analyse des résidus.....	32
4. Estimation et statistiques des coefficients.....	33
5. Optimisation des réponses.....	34
6. Modèle mathématiques.....	34
7. Vérification du modèle par des points tests.....	37
8. Conclusion de l'étude d'optimisation.....	37
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>39</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>40</b>

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : L'institut national des plantes médicinales et aromatiques (INPMA).....	3
<b>Figure 2</b> : produits des plantes aromatique.....	4
<b>Figure 3</b> : Fleures de la plante <i>Lavandula stoechas.L</i> .....	6
<b>Figure 4</b> : Culture de la plante <i>Lavandula stoechas.L</i> .....	6
<b>Figure 5</b> : gammes de fréquence.....	9
<b>Figure 6</b> : Cycles de compression et raréfaction induits par les ondes sonores.....	9
<b>Figure 7</b> : implosion des bulles et libération du matériel végétal.....	10
<b>Figure 8</b> : Méthodologie des plans d'expériences.....	12
<b>Figure 9</b> : Principe de base des plans d'expérience.....	13
<b>Figure 10</b> : Domaine expérimental.....	14
<b>Figure 11</b> : L'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine d'étude forme la surface de réponse.....	14
<b>Figure 12</b> : Plan de Box-Behnken pour 3 facteurs.....	19
<b>Figure 13</b> : sonicateur à bain d'eau.....	21
<b>Figure 14</b> : filtration du mélange.....	22
<b>Figure 15</b> : Mélange matière végétale/éthanol.....	22
<b>Figure 16</b> : Tubes réactionnel après 2 heures.....	23
<b>Figure 17</b> : spectrophotomètre type (Selecta, E.U).....	23
<b>Figure 18</b> : Courbe d'étalonnage d'Acide Galique.....	24
<b>Figure 19</b> : Diagramme d'Ishikiwa.....	25
<b>Figure 20</b> : graphe comparant les rendements mesurés aux rendements.....	31
<b>Figure 21</b> : graphe comparant les TCP mesurés aux TCP calculés.....	31
<b>Figure 22</b> : Diagramme des résidus en fonction des valeurs prévues du rendement.....	32
<b>Figure 23</b> : Diagramme des résidus en fonction des valeurs prévues du TCP.....	32
<b>Figure 24</b> : Optimisation des conditions de fabrication par la fonction de désirabilit.....	35
<b>Figure 25</b> : Courbes d'isoreponses.....	36
<b>Figure 26</b> : surface de réponses correspondantes aux facteurs Ratio et Temps.....	37

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : composition chimique de l'extrait éthanolique <i>Lavandula stoechas.L</i> .....	7
<b>Tableau 2</b> : table d'analyse de la variance.....	17
<b>Tableau 3</b> : mélange des tubes de la gamme d'étalonnage d'Acide Galique.....	23
<b>Tableau 4</b> : Paramètres fixés et leurs valeurs.....	26
<b>Tableau 5</b> : Facteurs variables et leurs domaines de variation.....	26
<b>Tableau 6</b> : caractéristique du plan.....	27
<b>Tableau 7</b> : Matrice d'expérience.....	27
<b>Tableau 8</b> : Plan d'expérimentations.....	28
<b>Tableau 9</b> : Résultats des essais du plan d'expérimentations.....	30
<b>Tableau 10</b> : analyse de la variance de la réponse 'rendement'.....	31
<b>Tableau 11</b> : analyse de la variance de la réponse 'TCP'.....	31
<b>Tableau 12</b> : analyse du manque d'ajustement de la réponse 'rendement'.....	32
<b>Tableau 13</b> : analyse du manque d'ajustement de la réponse 'TCP'.....	32
<b>Tableau 14</b> : statistiques des deux réponses .....	33
<b>Tableau 15</b> : les effets du modèle de la réponse 'Rendement' .....	33
<b>Tableau 16</b> : les effets du modèle de la réponse 'TCP'.....	34
<b>Tableau 17</b> : Valeurs expérimentales et prédite pour le point test.....	38

# *Liste des acronymes*

**PMA** : Plantes médicinales et aromatiques

**INPMA** : Institut national des Plantes médicinales et aromatiques

**HCEFLCD** : Le Haut Commissaire aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la  
Désertification.

**Ac.G** : Acide gallique.

**E.D** : Eau distillée

**F.C** : Folin-Ciocalteux

**R<sup>2</sup>** : Coefficient de détermination.

**R<sup>2</sup><sub>A</sub>** : Coefficient de détermination ajusté.

**Rdt** : Rendement.

**TCP** : Taux des composés phénoliques.

# Introduction

Le secteur des plantes aromatique et médicinales (PAM) au Maroc est l'un des plus riches au monde, en raison de sa diversité (4200 espèces dont 800 endémiques), parmi lesquelles près de 400 espèces sont reconnues pour leur usage médicinale et/ou aromatique, ainsi que pour leur potentiel de développement, en particulier pour l'exportation. Actuellement le Maroc est classé le 12<sup>ème</sup> exportateur mondial des plantes aromatiques et médicinales (PAM) avec près de 25 millions de dollars pour les PAM cultivées et 37 millions de dollars pour les PAM cueillies en milieu naturel. Le Maroc a encore un grand potentiel d'expansions vers un marché mondial estimé à 15 milliards de dollars.

La **Lavande à Toupet** (*Lavandula.stoechas.L*) est une des PAM les plus caractéristiques de la région méditerranéenne notamment le Maroc, un exemple éloquent d'une valeur considérable pour l'économie. Cependant les techniques d'extraction de la Lavande restent inefficaces en termes de rendement et de coût.

Le présent travail a pour objectif d'optimiser les facteurs agissant sur le procédé d'extraction assistée par ultrasons de la Lavande, afin de chercher les valeurs optimales de ces facteurs permettant de maximiser le rendement de l'extraction aussi bien que le taux des composés phénoliques.

Ce travail a été accompli en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse qui nous a permis de faire une étude d'optimisation du procédé d'extraction de la lavande par sonication et de trouver un point optimal pour l'extraction assistée par ultrasons et qui a été validé statistiquement.

# *Etude Bibliographique*



## I. Présentation de l'agence nationale des plantes médicinales et aromatiques (INPMA):

Les Plantes Médicinales et Aromatiques (PAM) constituent une ressource importante au Maroc avec des grands enjeux économiques, sociétaux et scientifiques. Cette ressource doit affronter des contraintes réglementaires nationales et internationales de plus en plus rigoureuses, et une compétition féroce venant de l'Asie et de l'Amérique du sud. Le rôle joué par l'institut national des plantes médicinales et aromatiques (INPMA) est primordial pour la filière PAM, en tant qu'Institut de recherche et de développement, il agit à tous les niveaux, par ses laboratoires spécialisés et bien équipés, possédant une expertise reconnue. Il assure l'accompagnement technique des intervenants dans le secteur des PAM, aidant les producteurs de biomasses à certifier « Bio » leur production et à faire une première transformation selon les normes du marché international avec une caractérisation de leurs produits semi-finis destinés à l'industrie.

L'INPMA fournit un effort particulier pour la domestication des plantes à forte valeur économique car l'exploitation des plantes spontanées ne peuvent plus faire face à la forte demande du marché, apporte la preuve scientifique à l'efficacité de certains molécules extraites des plantes, dépose des brevets d'invention, assure la formation continue de toutes les catégories des intervenants (associations, coopératives, professionnels et étudiants..).



**Figure 1** : L'institut national des plantes médicinales et aromatiques (INPMA)

Le domaine d'activité de l'INPMA concerne toute la filière des Plantes Médicinales et Aromatiques et les substances naturelles, à savoir :

- Effectuer et promouvoir des travaux de Recherche/Développement;
- Organiser des séminaires, des conférences et des expositions dans le domaine des plantes médicinales et aromatiques, ainsi que dans les autres domaines utilisant les produits naturels;



- Valoriser et promouvoir les plantes médicinales et aromatiques, via l'utilisation et l'intégration des produits naturels dans les différents secteurs socio-économiques par la création de pépinières de projets ;
- Créer des zones pilotes d'exploitation des plantes médicinales et aromatiques à l'échelle nationale dans le cadre des petites et moyennes entreprises (PME) et des petites et moyennes industries (PMI);
- Établir des relations de coopération avec les organismes nationaux et internationaux et coordonner à l'échelle nationale les activités relatives aux plantes médicinales et aromatiques.

## II. Les plantes aromatiques et médicinales :

*« L'histoire des plantes aromatiques et de leur utilisation...se perd dans la nuit des temps et se trouve étroitement liée à chaque civilisation »*

*JEAN VALNET(2007)*

### 1. Généralités :

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales «P.A.M.» est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires.



**Figure 2 :** produits des plantes aromatiques

La Chine, berceau de la phytothérapie, l'Inde, le Moyen –Orient, notamment au cours de l'ère arabo-musulmane, l'Egypte, la Grèce, les romains, constituent des civilisations phares pendant lesquelles les plantes aromatiques et médicinales ont connu une place de premier plan. Ce savoir traditionnel ancestral se transmet de génération en génération est devenu aujourd'hui une mine d'informations extrêmement précieuses pour les chercheurs au domaine des P.A.M. Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques les plus modernes n'ont fait que

confirmer le bien-fondé des vertus thérapeutiques de la plupart des plantes aromatiques et médicinales utilisées [1-3].

La demande mondiale en P.A.M et leurs dérivés pour l'agro-alimentaire, la phytothérapie, les parfums et les produits cosmétiques naturels n'a fait qu'augmenter. Ainsi que dans les pays en voie de développement, elles jouent un rôle important dans la pharmacopée traditionnelle et l'alimentation.

Aux cours de la dernière, décennie l'industrie médicale mondiale utilisant les P.A.M a augmenté de façon exponentielle au cours de ces dernières décades suite à la révolution « bio »; «environnement sain» et «développement durable».

## 2. Aspect économique :

Par ses contrastes géographiques, le Maroc offre une gamme variée de bioclimats méditerranéens permettant une flore sauvage riche constituée de 41 écosystèmes avec environ 4200 espèces à endémisme très marqué. Les espèces à vertus aromatiques et/ou médicinales sont estimées à 600 espèces dont 80 exploitées. Le Maroc est caractérisé par plusieurs P.A.M spontanées et cultivées à savoir : le romarin, le thym, le lichen, le laurier sauce, le caroubier, l'origan, la lavande, le lentisque, le myrte...

Les cultures biologiques occupent des surfaces variant entre 1000 et 5000 ha toutes espèces confondues.

En effet le Maroc est classé actuellement le 12ème exportateur mondial des P.A.M avec près de 25 millions de dollars pour les P.A.M cultivées et 37 millions de dollars pour les P.A.M sauvages avec des quantités moyennes cédées annuellement d'environ 33.000 tonnes pour 25 millions Dhs.

## 3. Aspect environnemental :

Sous l'influence des facteurs climatiques, socio- culturels et économiques, certaines P.A.M spontanées deviennent de plus en plus rares. La protection des ressources phytogénétiques du pays est nécessaire et n'est pas contraire à une bonne exploitation et une bonne valorisation des P.A.M.

Le développement de la production des P.A.M en intensif contribue à satisfaire la demande et préserver la nature. En effet, Le "H.C.E.F.L.C.D" qui gère les espaces forestiers a souhaité valoriser ces espaces qui regorgent d'une végétation riche et variée en contribuant à sa préservation et en lui permettant d'offrir des produits qui créent des emplois et de la richesse au profit de la population locale et ce en adoptant une nouvelle démarche pour leur exploitation.

### III. Généralités sur la plante étudiée : (*Lavandula Stoechas. L*)

#### 1. Systématique et écologie de la Lavande stoechade :

##### ▪ Systématique:

<b>Règne</b>	: Plantae
<b>Division</b>	: Magnoliophyta
<b>Classe</b>	: Magnoliopsida
<b>Ordre</b>	: Lamiales
<b>Famille</b>	: Lamiaceae
<b>Sous-famille</b>	: Nepetoideae
<b>Genre</b>	: <i>Lavandula</i>
<b>Non botanique</b>	: <i>Lavandula stoechas</i>
<b>Nom commun</b>	: Lavande stoechade



**Figure 3 :** Fleures de la plante *Lavandula stoechas.L*

La lavande à toupet (*Lavandula stoechas.L*) est une plante originaire du bassin méditerranéen. C'est un arbrisseau compact aux tiges quadrangulaires d'une hauteur de 0.5 -1 m, qui porte des feuilles persistantes, étroites et tomenteuses de couleur grise, qui fleurit au printemps sur les coteaux siliceux. Au printemps, elle donne des fleurs surmontées d'une touffe violette qui peuvent persister jusqu'à l'automne. De la famille des lamiacées, cette lavande est aromatique mais peu utilisée en parfumerie parce qu'elle dégage une odeur camphrée. C'est une remarquable plante d'agrément, aux fleurs originales. <sup>[3-7]</sup>.



**Figure 4 :** Culture de la plante *Lavandula stoechas.L*

## 2. Propriétés thérapeutiques et pharmacologique de la lavande stoechade (L.S):

La popularité de la lavande en aromathérapie signifie que la plupart des gens sont conscients de ses effets relaxants et sédatifs. Les résultats de plusieurs études confirment son efficacité comme relaxant. Les chercheurs ont testé les propriétés sédatives de l'huile essentielle de lavande stoechade et ses principaux constituants, le linalol et l'acétate de linalyle, sur des souris.

Après l'inhalation de l'huile essentielle de lavande, les niveaux d'activité des souris, préalablement injectés avec de la caféine pour induire une hyperactivité, retournent aux niveaux quasi-normale

En outre, il a été montré que l'extrait aqueux-éthanolique des fleurs de L.S (600 mg/kg-dose-) montre une activité anticonvulsive et antispasmodique chez les souris de laboratoire.

Une application moins connu de l'huile essentielle de la lavande est le soulagement de la douleur. Il a été utilisé traditionnellement sur les piqûres d'abeilles et des brûlures. Plusieurs études ont été menées pour l'évaluation des propriétés antiseptique cicatrisantes et antidouleur de la lavande, ainsi que des activités insecticides des extraits d'huiles essentielles à partir des feuilles et des fleurs de L.S contre le quatrième stade larvaire des moustiques ont été déterminées. [8-10].

## 3. Compositions chimique de l'extrait éthanolique de la lavande stoechade :

Dans cette étude on s'intéresser à l'extrait aqueux-éthanolique de *Lavandula.stoechas.L* dont la composition chimique est déterminée par la méthode de criblage phytochimique qui a été réalisés selon les techniques analytiques décrites dans la littérature [11].

Les composés chimiques	Extrait éthanolique
Tanins	+
Tanins catéchique	+
Tanins gallique	-
Flavonoïdes	+
Terpènes et stérols	+
Coumarins	+
Quinones	-
Leucoanthocyanes	+
Glycosides cardiaques	+
Mucilages	+

**Tableau 1** : composition chimique de l'extrait éthanolique *Lavandula stoechas.L*

**Légende** : Présence des composés chimiques : (+)= important ; (-)= absent

## IV. Extraction par les ultrasons :

L'ultrason a été considéré comme une technique innovante et prometteuse du 21<sup>e</sup> siècle, avec de nombreuses applications dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique, chimie et domaines alimentaires depuis la seconde moitié du 20<sup>ème</sup> siècle.

Les ultrasons peuvent être appliqués soit au niveau du laboratoire ou à l'échelle industrielle. De nombreuses installations industrielles ont appliqué avec succès cette technique dans la transformation des aliments, la conservation et l'extraction d'une manière plus avantageuse que les procédures classiques.

Les applications de l'ultrason proviennent principalement de leurs effets physiques, il permet l'utilisation des conditions plus douces sur un temps de traitement plus court par rapport aux techniques classiques, ce qui se traduit par des produits de qualité améliorée avec un coût inférieur.

En outre, l'ultrason est utilisé dans les procédures d'extraction assistée dans une large gamme de matrices pour d'autres applications directes ou indirectes des composés cibles.

Les avantages proposés d'extraction assistée par ultrasons comprennent l'amélioration des taux global d'extraction et le rendement, possibilité d'utilisation des solvants alternatifs et l'amélioration de l'extraction de composés sensibles à la chaleur.

### 1. Principe de l'ultrason :

Les ultrasons sont des ondes mécaniques qui nécessitent un milieu élastique de propagation. Ils se différencient des sons par la fréquence de l'onde (Figure 3). Les fréquences audibles pour les êtres humains sont comprises entre 16 et 20 kHz, tandis que les fréquences ultrasonores vont de 20 kHz à 10 MHz. A partir de cette large gamme de fréquence, deux groupes principaux sont distingués et les deux sont utilisés dans l'industrie alimentaire : ultrasons de diagnostic et de puissance<sup>[12]</sup>.

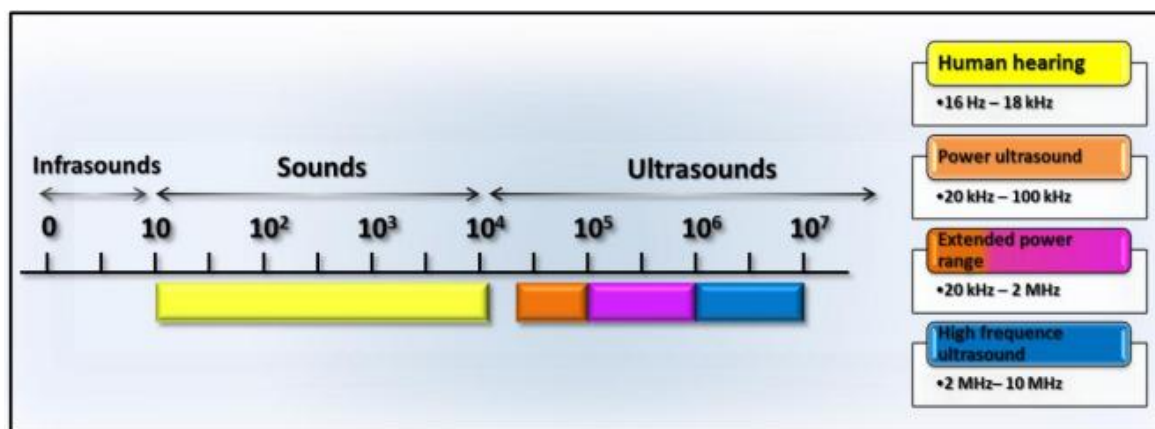
Les principaux paramètres physiques qui caractérisent les ultrasons sont la puissance (W), la fréquence (Hertz) et la longueur d'onde (cm) à partir de laquelle l'intensité ultrasonique (I) est calculée en ( $W\ cm^{-2}$ ).

- L'ultrason diagnostique (également appelé ultrasons à haute fréquence) compris entre 2 et 10 MHz ( $I < 1\ W.cm^{-2}$ ) est utilisé dans de nombreux domaines tels que l'imagerie médicale ou même pour la détection des défauts (Inspection de caissonnement pour les plastiques).
- L'ultrason de puissance conventionnel (appelé aussi ultrason à basse fréquence) vont de 20 kHz à 100 kHz ( $I > 1\ W.cm^{-2}$ )<sup>[10]</sup>.

Une gamme étendue est utilisée dans la chimie sonore (20 kHz à 2 MHz) et dans cette gamme, l'échographie est capable de produire des effets physiques et / ou chimiques dans le milieu afin de faciliter ou d'accélérer les réactions chimiques ou même pour d'autres applications dans l'industrie (découpe, soudage plastique). Une faible puissance et haute fréquence des ultrasons

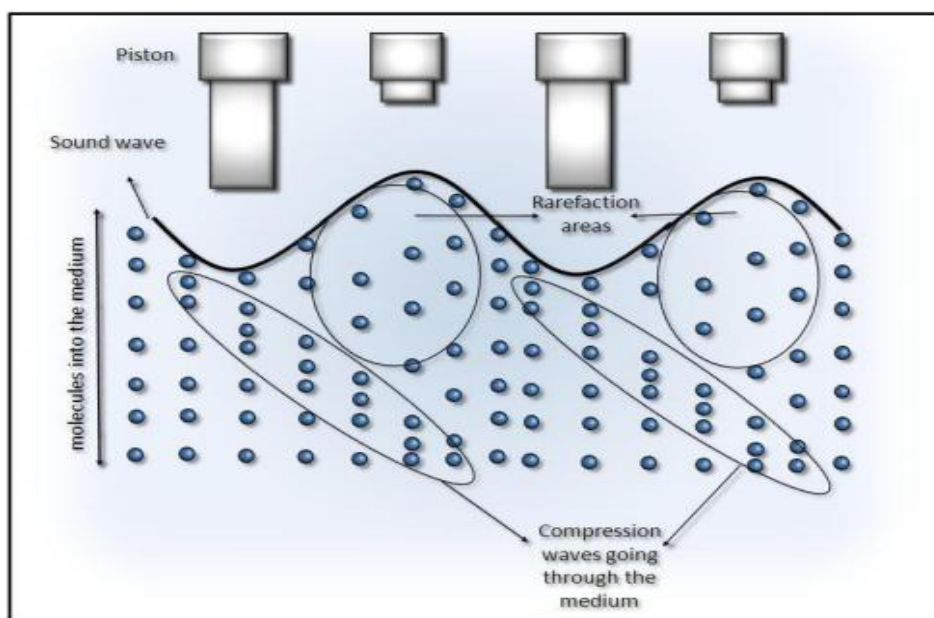


est un moyen non destructif de gagner des informations structurales et / ou chimiques, sur le milieu utilisé.



**Figure 5** : gammes de fréquence des ondes sonores

Les principaux effets des ultrasons dans un milieu liquide sont attribuées aux phénomènes de **cavitations** qui sont émis à partir des processus physiques qui créent, agrandissent et implosent des micros bulles de gaz dissous dans le liquide. Les molécules qui constituent le liquide support sont maintenues ensemble par des forces d'attraction et comme une vague d'ultrasons passe par un milieu élastique (Figure 6). Il induit un déplacement longitudinal de ces molécules, agissant comme un piston sur la surface, résultant d'une succession de phases de compression et de raréfaction <sup>[13-14]</sup>.



**Figure 6** : Cycles de compression et raréfaction induits par les ondes sonores

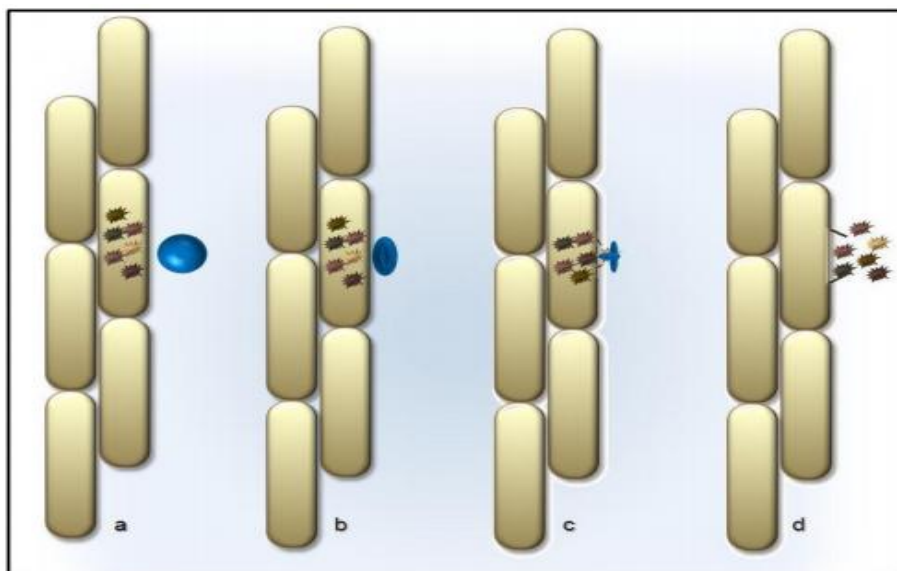
### Remarque :

En employant un sonicateur de sonde, le phénomène des microjets est limité à la proximité de la sonde qui peut produire des quantités élevées de la chaleur et libérer des fragments du métal. En revanche, le bain de sonication est également exposé à l'énergie d'ultrason tenant compte de la dissipation de la chaleur et fournissant l'absorption uniforme de l'énergie.

#### ▪ Comment cela fonctionne t-il?

Les ondes ultrasoniques produites par le transducteur produisent des vibrations longitudinales (compression et raréfactions alternatives) sur le bain d'eau. Ces fluctuations de pression créent des millions de bulles microscopiques (cavités) provoquées par les pressions négatives produites par l'étape de raréfaction. Pendant que les cavités sont exposées aux pressions positives, produites par l'étape de compression, elles oscillent et augmentent à une taille instable (jusqu'à 100 microns de diamètre).

Enfin, les cavités imploseront en produisant des températures et pression extrêmes aux sites d'implosion. En outre, les ondes chocs et les remous rayonnent à l'extérieur du site de l'effondrement de cavité. Les points chauds localisés qui durent pendant des microsecondes peuvent avoir des températures de  $\sim 5,000^{\circ}\text{C}$ , des pressions de  $\sim 500$  atmosphères aussi bien que les taux de chauffage et de refroidissement sont  $>10^9$  K/s. L'énergie cumulative produite par ce phénomène de cavitation est extrêmement haute et produit les forces de cisaillement intenses qui détruisent les parois cellulaires de la matrice de la plante et son contenu sera libéré dans le milieu (figure 7).<sup>[15]</sup>



**Figure 7** : implosion des bulles et libération du matériel végétal

## 2. Les paramètres influents :

La détermination de l'ensemble des facteurs agissant sur le processus d'extraction par sonication est une étape vitale pour lancer le travail. Après une réunion avec personnel responsable du laboratoire d'extraction travaillant sur le processus de « sonication », nous avons déterminés que les paramètres principaux pouvant influencer l'extraction assistée par ultrasons (le rendement d'extraction aussi bien que la composition de l'extraire) sont : la puissance, la fréquence des ultrasons, la température et le type de solvant.

## V. Méthodologie des plans d'expériences :

Dans toutes les disciplines, il est fréquent d'étudier un phénomène dépendant de différents paramètres. La méthode intuitive n'est pas toujours la meilleure et qui consiste généralement à fixer le niveau de toutes les variables sauf une et de mesurer la réponse pour plusieurs valeurs de la variable mobile.

### 1. Principe :

La technique des plans d'expériences consiste à faire varier simultanément les niveaux d'un ou plusieurs facteurs (qui sont les variables, discrètes ou continues) à chaque essai. Ceci va permettre de diminuer fortement le nombre d'expériences à réaliser tout en augmentant le nombre de facteurs étudiés, en détectant les interactions entre les facteurs et les optimaux par rapport à une réponse en permettant de modéliser facilement les résultats. Le point délicat dans l'utilisation des plans d'expériences sera donc de minimiser le plus possible le nombre d'expériences à mener sans sacrifier la précision des résultats. Donc la construction d'un plan d'expériences consiste à extraire du domaine expérimental, un nombre  $N$  suffisant de combinaisons particulières afin d'estimer, avec une incertitude à la fois minimale mais aussi homogène, les  $p$  inconnues du modèle (additif ou polynomial) tout en respectant au mieux les contraintes techniques et économiques de l'étude.

Il existe actuellement un nombre important de plans différents. Chacun, par ses propriétés, permet de résoudre certains problèmes particuliers. Nous pouvons cependant citer quelques types des plans d'expériences en deux grandes catégories <sup>[16]</sup>:

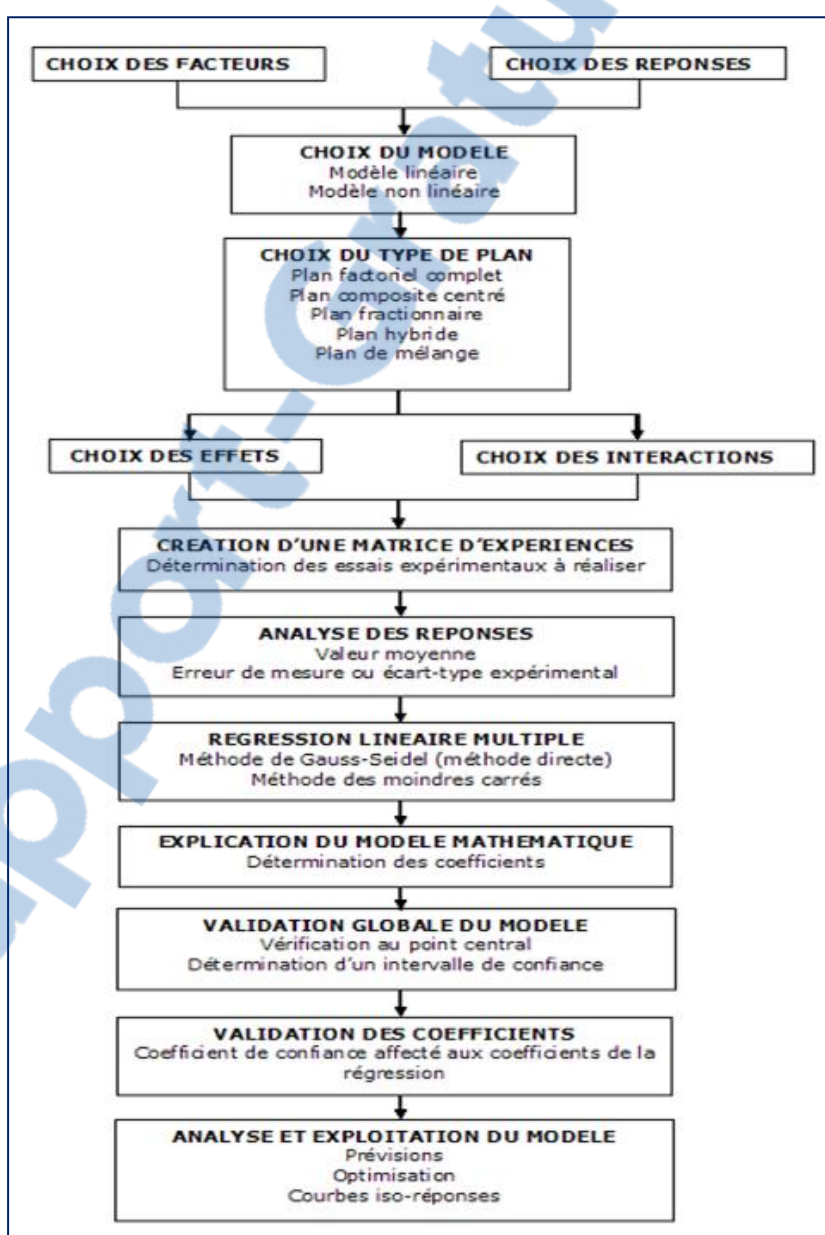
- Les plans de criblage (screening)
- Les plans d'optimisation (MSR)
- Les plans de mélange

L'expérimentateur doit concevoir le plan d'expérience adéquat afin de répondre à une problématique bien précise. Il faut donc choisir ou construire le plan qui donnera les informations recherchées. On ne pourra donc pas utiliser le même plan pour étudier efficacement les effets des paramètres tout en cherchant un optimum.



Pour pouvoir utiliser les plans d'expérience, il existe une démarche bien précise à mettre en œuvre. Cette démarche s'articule selon les étapes présentées sur figure 8 et qu'on peut résumer en trois grandes lignes :

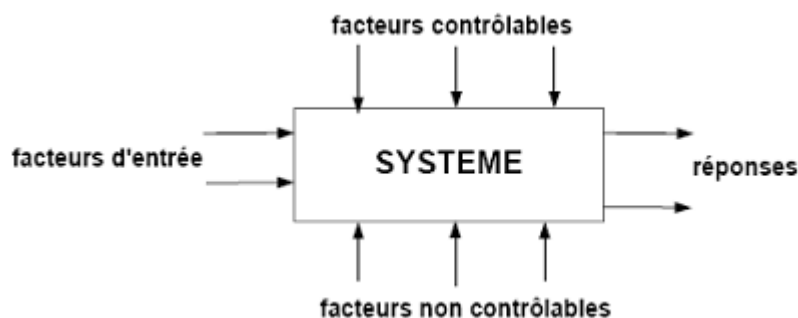
- La formalisation du problème expérimental c.à.d. les étapes préliminaires qui posent la problématique
  - Connaître les réponses étudiées
  - Définir les facteurs à optimiser
- L'analyse du problème conduit à choisir **une stratégie** de construction d'un plan d'expérience, dans notre étude on aura accès au plan d'optimisation (surfaces de réponses).
- Les analyses (statistiques et graphiques) et les résultats (interprétation, validation).



**Figure 8** : Démarche pratique des plans d'expériences

## 2. Vocabulaire de base des plans d'expériences :

Le scientifique est souvent amené à comprendre comment réagit un système en fonction des facteurs susceptibles de le modifier. Pour visualiser cette évolution, il mesure une réponse et va ensuite essayer d'établir des relations de cause à effet entre les réponses et les facteurs à travers le système (figure 9).



**Figure 9 :** Principe de base des plans d'expérience

Parmi les facteurs on distinguera:

- les facteurs contrôlables qui dépendent directement du choix (pression, température, ...)
- les facteurs non contrôlables qui varient indépendamment du choix (conditions climatiques, environnement d'utilisation...)
- les facteurs d'entrée dont on cherche à analyser une influence (matière première, vitesse d'agitation, température,...)

### a. Niveau d'un facteur :

Valeur que prend le facteur au cours des essais, il importe d'attribuer à chaque facteur au moins deux niveaux : un niveau supérieur et un niveau inférieur. Pour les facteurs quantitatifs la valeur est algébrique, donc classé numériquement. Pour les facteurs qualitatifs les valeurs ne sont pas mesurables, alors peu importe leur classement l'important est de mettre une borne inférieure et une borne supérieure (+1 et -1). Les niveaux extrêmes de chaque facteur délimitent le domaine de l'étude.

### b. Domaine expérimental

Le domaine est délimité par les niveaux supérieurs et inférieurs de chaque facteur (figure 10).

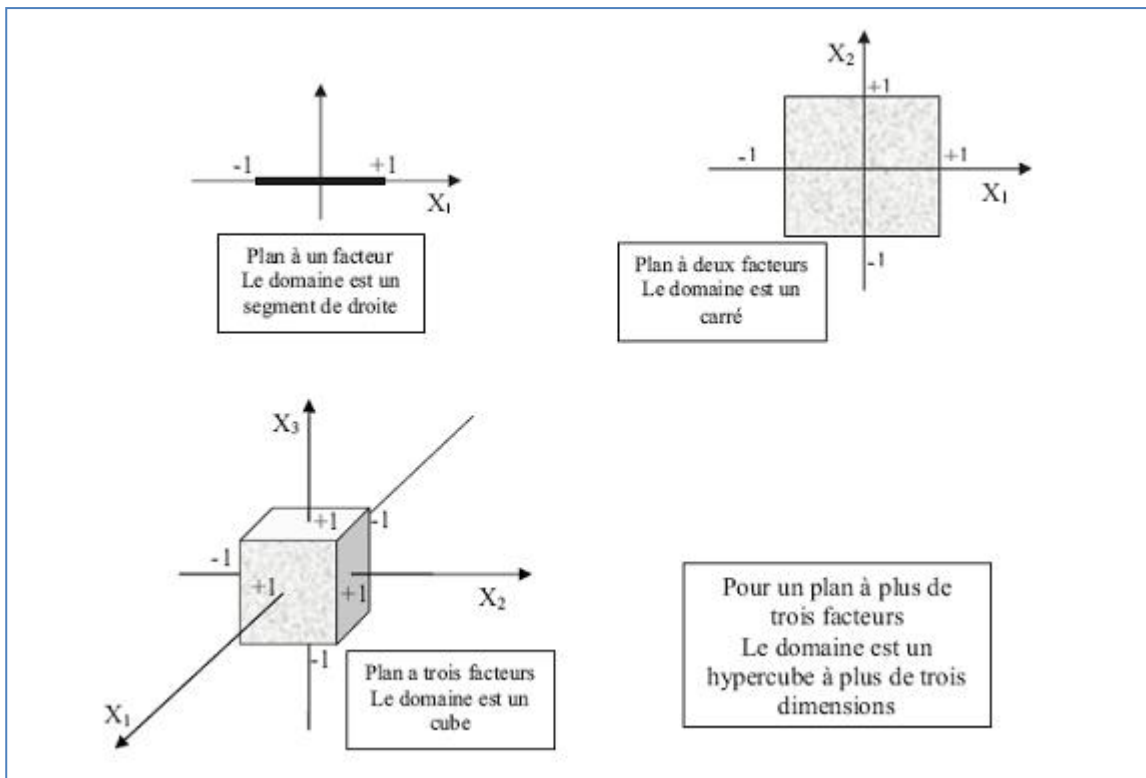


Figure 10 : Domaine expérimental

### c. Les surfaces de réponses :

À chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. À l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localise sur une surface appelée **surface de réponse** (figure 11).

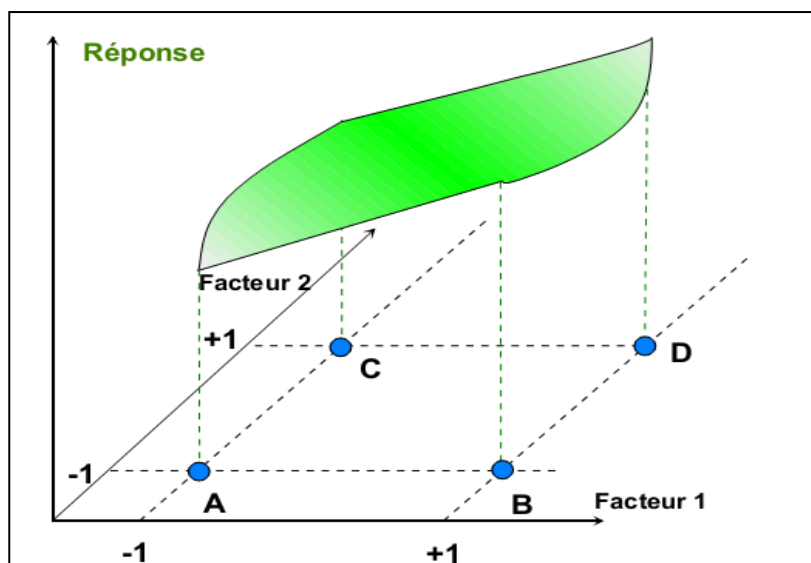


Figure 11 : L'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine d'étude forme la surface de réponse.

En général, on ne connaît que quelques réponses, celles qui correspondent aux points expérimentaux retenus par l'expérimentateur. On interpole à l'aide d'un modèle mathématique, les réponses inconnues pour obtenir la surface de réponse.

Les points d'expériences retenus par la théorie des plans d'expériences assurent la meilleure précision possible sur la forme et la position de la surface.

### 3. Modélisation par régression linéaire multiple :

Pour permettre la prévision de la réponse et l'optimisation du système, la méthode des plans d'expériences de part sa conception et sa structure permet une représentation mathématique de la réponse « y » en fonction des facteurs sujets de l'étude.

Nous nous limiterons aux modèles polynomiaux linéaires en utilisant la régression linéaire multiple qui se base principalement sur la méthode des moindres carrés.

Deux conditions doivent être respectées <sup>[17]</sup> :

- Le nombre minimal des essais effectués doit être égal au nombre des inconnues  $A_i$ , et augmente avec le degré du polynôme. Donc il est de notre intérêt de rechercher les modèles les plus simples avant tout.
- Le modèle constitué doit être validé afin que les prévisions soient fiables.

#### a. Modèle postulé :

Les modèles recherchés sont des modèles exprimant la ou les réponses « y » en fonction des facteurs «  $X_i$  » et leurs interactions :

$$Y = A_0 + \sum_{i=1}^k A_i X_i + \sum_{ij} A_{ij} X_i X_j + \sum_{ijk} A_{ijk} X_i X_j X_k + \dots + \sum A_{ii} X_{ii}^2 + e$$

Avec :

$A_i$  : effet principale

$A_{ij}$  : effet d'interaction

$A_{ii}$  : effet quadratique

### 4. Conditions d'application des plans d'expériences :

Les plans d'expériences sont une méthodologie bien adaptée à la recherche à chaque fois qu'intervient un grand nombre de paramètres. Ils permettent de réduire fortement le nombre d'essais, de gagner du temps et de l'argent, tout en parvenant à un meilleur résultat.

Trois éléments sont indispensables pour réussir cette méthodologie : la planification des essais et la qualité de l'expérience, ensuite, la maîtrise d'outils mathématiques tels que la régression linéaire multiple, enfin, l'apport des statistiques pour la validation globale des modèles et la détermination des effets significatifs.

Pour appliquer la méthode des plans d'expériences, il faut que les deux conditions suivantes soient réalisées <sup>[18]</sup> :

- **Condition 1 :**

La valeur que prend chaque variable doit être connue sans erreur, or dans un travail d'expérimentation on ne peut nier la présence d'erreur. Donc pour satisfaire cette condition on doit s'assurer que l'erreur induite sur la valeur de la variable soit très petite, voire négligeable devant la variation de cette même variable lorsqu'elle change de valeur.

- **Condition 2 :**

La réponse doit être homoscedastique. Cela signifie que l'erreur de mesure doit être la même sur tout le domaine expérimental. Pour cela il appartient à l'expérimentateur de garder les mêmes pratiques expérimentales, le même matériel et la même cadence lors de toute la campagne d'expérimentation.

## 5. Validation du modèle postulé:

Un modèle postulé doit surement être validé statistiquement avant d'être utilisé. Une fois les coefficients sont identifiés, il est recommandé de s'assurer de la validité du modèle obtenu dans le domaine concerné.

### a. Analyse de la variance :

L'analyse de la variance est une technique statistique permettant de savoir si une ou plusieurs variables dépendantes (variables à expliquer) sont en relation avec une ou plusieurs variables dites indépendantes (variables explicatives).

La forme générale de l'analyse de variance repose sur le test de Fisher et donc sur la normalité des distributions et l'indépendance des échantillons.

La première étape de l'analyse de la variance consiste à expliquer la variance totale sur l'ensemble des échantillons en fonction de la variance due aux facteurs (la variance expliquée par le modèle) et de la variance résiduelle (la variance non expliquée par le modèle). Le modèle sera explicatif si la valeur de p-value est inférieure au seuil de risque 5%.

La deuxième décomposition de la variance en deux source d'erreur permet de calculer Le « Manque d'ajustement » ou « lack of fit » (en anglais) qui mesure la différence qui existe entre le modèle a priori (modèle postulé) qui a été choisi par l'expérimentateur et le modèle réel qui régit le phénomène étudié. Le modèle sera statistiquement accepter (pas de manque d'ajustement) si la valeur de p-value est supérieure au seuil de risque 5% <sup>[19]</sup>.

Pour réaliser la table de l'ANOVA (voir table n°2) il faut :

- Déterminer les sources de variation
- Calculer les degrés de liberté (ddl) de chaque source
- Calculer les sommes des carrées des écarts (SCE) de chaque source
- Calculer les carrés moyens (CM) de chaque source

La table d'ANOVA permet de résumer les calculs nécessaires :

Source de la variance	Sommes des carrés des écarts	Degrés de liberté	Carré moyen	F	p-value
modèle	$SCE_{\text{facteur}}$	$DDL_{\text{facteur}}$	$S^2_{\text{facteur}} = \frac{SCE_{\text{facteur}}}{DDL_{\text{facteur}}}$	$F = \frac{S^2_{\text{facteur}}}{S^2_{\text{résidu}}}$	$P(F > F_{OBS})$
Résiduelle	$SCE_{\text{résidu}}$	$DDL_{\text{résidu}}$	$S^2_{\text{résidu}} = \frac{SCE_{\text{résidu}}}{DDL_{\text{résidu}}}$		
Totale	$SCE_{\text{total}}$	$DDL_{\text{total}}$			

**Tableau 2 :** Exemple de la table d'analyse de la variance

### b. Coefficient de détermination ( $R^2$ ) :

L'analyse de la variance permet de calculer aussi une statistique très utile nommé coefficient de détermination:  $R^2$ . Cette statistique est le rapport de la somme des carrés des réponses calculées à la somme des carrés des réponses mesurées:

$$R^2 = \frac{\sum(\hat{y} - \bar{y})^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2}$$

Si le modèle permet de retrouver exactement la valeur des réponses mesurées, la somme des carrés des réponses calculées est égale à la somme des carrés des réponses mesurées. Le  $R^2$  est égal à 1.

Si le modèle fournit des réponses calculées égales à la moyenne, la somme des carrés des réponses calculées est égale à 0. Le  $R^2$  est égal à 0. On dit que le modèle n'a pas de puissance d'explication.

- ✓ Le  $R^2$  est donc une mesure de la qualité du modèle. S'il est égal à 1, le modèle permet de retrouver la valeur des réponses mesurées. S'il est égal à 0, le modèle n'en dit pas plus que la moyenne des réponses.
- ✓ Le  $R^2$  joue véritablement son rôle d'indicateur de la qualité du modèle à condition que les résidus ne soient pas nuls. Si les résidus sont nuls, le  $R^2$  est égal à 1 quelle que soit la qualité du modèle. On observe un tel cas lorsqu'il n'y a pas de degrés de liberté.

### c. Analyse des Résidus :

Les résidus ou " erreurs observées " sont définis comme étant les différences entre les valeurs observées et les valeurs estimées par un modèle de régression, ils ont la particularité de représenter la partie non expliquée par l'équation de régression.

On les note communément comme suit:

$$e_i = Y_i - \hat{Y}_i$$

L'analyse des résidus a pour objectif de tester la validité d'un modèle de régression. Elle permet de déceler les défaillances d'un modèle, c'est pourquoi il est nécessaire de l'effectuer avant toute analyse de régression. Les méthodes d'analyse des résidus, ou des résidus réduits sont principalement des méthodes d'analyse graphique.

Pour détecter la présence d'une défaillance dans le modèle considéré, deux graphiques peuvent être utilisés :

- Courbe des résidus en fonction des valeurs ajustées de Y
- Courbe des résidus en fonction des valeurs des régresseurs

L'analyse de ces Courbe est assez simple. En effet, il s'agit de vérifier que la représentation des résidus ne présente aucune structure particulière.

#### **b. Signification des effets de facteurs :**

Le calcul d'un effet de facteur ou d'une interaction entre facteurs fait intervenir l'ensemble des résultats de mesure. Or, ces derniers sont collectés tout le long de la campagne expérimentale, ils sont entachés d'erreurs de mesure. Et que seul l'écart type de mesure permet son estimation.

Après avoir établi le modèle mathématique, il s'agit de savoir si les coefficients du modèle (facteurs et interactions) sont significativement différents de zéro. En effet, des valeurs mathématiques voisines de zéro peuvent être la conséquence de la dispersion expérimentale autour d'une valeur moyenne nulle. On va donc comparer la valeur du coefficient à l'erreur étalon de mesure. Si ces deux valeurs sont du même ordre de grandeur, on conclura à la nullité de l'effet (ou de l'interaction) envisagé. Un **test de Student** est réalisé pour vérifier la signification de ces effets en comparant la valeur de **p-value** (probabilité qu'un coefficient soit négligeable) avec le seuil de risque 5%.

#### **c. Exploitation du modèle :**

Le modèle final retenu sera exploité par intermédiaire des surfaces de réponses, courbes d'isorréponses et fonction de désirabilité afin de définir les points optimaux pour l'étude d'optimisation.

### **6. Plan de surface de réponse de type Box-Behnken**

Le plan de Box-Behnken est un plan qui conduit directement à un modèle du second degré, il commence à trois facteurs et peut ensuite être utilisé pour quatre, cinq facteurs et plus. Il possède la propriété de séquentialité par rapport aux facteurs, une propriété précieuse quand on veut étudier les deux ou trois facteurs les plus utiles tout en réservant la possibilité d'en étudier d'autres plus tard.



### a. Plan de Box-Behnken à 3 facteurs :

Les points expérimentaux sont placés au milieu des arêtes du cube comme l'indique la figure 10. Cette disposition a pour conséquence de placer tous les points expérimentaux à égale distance du centre du domaine d'étude, donc sur une sphère.

Les plans de **Box-Behnken** pour 3 facteurs contiennent 12 essais, plus 3 essais au centre du domaine d'étude (qui serviront au calcul de l'erreur expérimentale et le manque d'ajustement) ce qui fait **15 essais** au total.

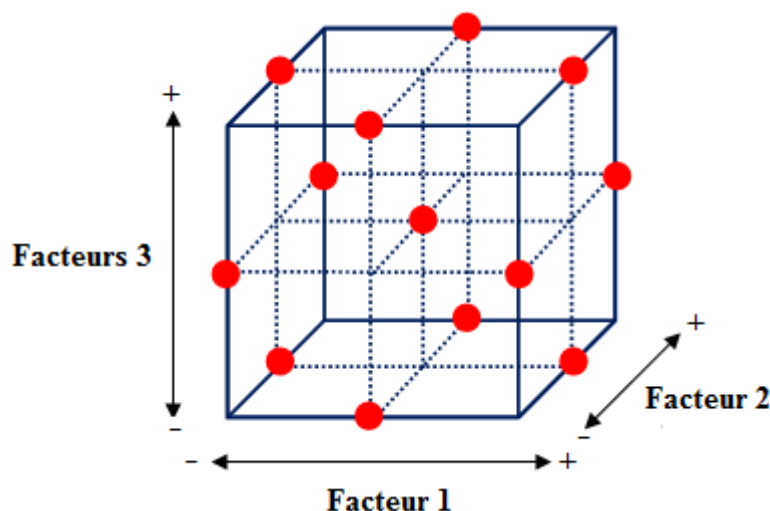


Figure 12 : Plan de Box-Behnken pour 3 facteurs

### b. Modèle mathématique postulé :

Le modèle mathématique postulé utilisé avec le plan de Box-Behnken pour 3 facteurs est un modèle du second degré classique.

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2 + e$$

Ce modèle comporte 10 coefficients, il faut donc au minimum 10 équations pour les estimer. Le plan de Box-Behnken pour 3 facteurs comporte 13 équations indépendantes, il y'a donc une solution mathématique à ce problème.

Le  $e$  est le terme d'erreur résiduelle considérée comme variable aléatoire  $\sim N(0, \sigma_R^2)$  ;  $\sigma_R^2$  est estimée par  $S_R^2$ .



# *Matériels et Méthodes*



## I. Matériel végétal utilisé :

Le matériel végétal de *Lavandula.Stoechas.L* a été collecté au cours de la phase de floraison sur le jardin expérimental de l'INPMA de la région de Taounate. Le matériel végétal a été identifié, séché à 40°C dans l'étuve et broyé.

## II. Protocole expérimentale :

L'extraction de la lavande a été effectuée par la méthode de sonication à l'aide d'un sonicateur à bain d'eau figure 13 (Plusieurs études effectuées ont montrées une grande efficacité de la sonication vis-à-vis d'autres méthodes d'extraction comme l'extraction par soxhlet).



Figure 13 : sonicateur à bain d'eau

### 1. L'extraction assistée par ultrasons :

#### ▪ Délipidation des échantillons :

La délipidation des échantillons est nécessaire dans cette étude parce que leur contenu en lipides pourra fausser les résultats du dosage des polyphénols après, alors on procéda comme suit :

- Environ 15g de matière végétale broyée est placée dans une bouteille à bouchon de 500 ml de verre.
- Ajouter 150ml de n-hexane, boucher soigneusement et placer éventuellement pendant 45 minutes dans un bain à ultrasons à une fréquence de 35kHz, une puissance de 20 w et une température de 20 C°.
- Après avoir été extrait, le mélange va être filtré à travers un papier Whatman, et on élimine le solvant.
- La matière de plante sera séchée à l'air libre et de nouveau sera ré-extraites.

### ▪ Ré-extraction des échantillons avec de l'éthanol :

Après délipidation de l'échantillon, il est ré-extrait par l'éthanol selon les étapes suivantes :

- Ajouter le volume désiré de l'éthanol sur la matière végétale récupérée de la phase de délipidation, bouché et dans le bain à ultrasons à une fréquence de 35kHz, une puissance de 20 w et une température de 20 C°.
- Après avoir été extrait, le mélange est filtré à travers un papier Whatman.
- La matière de plante est séchée à l'étuve à 40°C et pesée.
- Le mélange extrait est évaporée dans un rotavapeur à 40°C pour éliminer le solvant et récupérer l'extrait sec.
- L'extrait sec récupéré est pesé pour le calcul du rendement.



Figure 14 : filtration du mélange éthanolique



Figure 15 : Mélange matière végétale/éthanol

### ▪ Détermination du rendement en extrait :

Le rendement en extrait est exprimé en g d'extrait pour 100g de matière sèche, comme suit :

$$Rdt\% = \left[ \frac{m_{\text{extrait}}}{ms} \times 100 \right] \pm \left[ \frac{\Delta m_{\text{extrait}}}{ms} \times 100 \right]$$

Avec :

$Rdt\%$  : Rendement en extrait

$m_{\text{extrait}}$  (g) : masse de l'extrait récupéré

$ms$  (g) : masse végétale sèche (g)

## 2. Dosage des composés phénolique :

En se basant sur la composition chimique de *lavandula. stoechace.L* on a choisis le taux des polyphénols comme deuxième réponse.

Le dosage des polyphénols des différents extraits a été effectué avec le réactif de **Folin-Ciocalteux** (Akkol et al., 2008), le tube réactionnel contient 100 $\mu$ l de solution méthanolique de l'extrait brut à 10mg/ml, 0.5 du réactif de **Folin-Ciocalteux**, 1.5 ml de carbonate de sodium à 20% et on complète à 10ml avec de l'eau distillé. Les tubes sont par suite agités et conserver durant 2 heures à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 765nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre type (Selecta, E.U).



**Figure 16 :** Tubes réactionnel après 2 heures

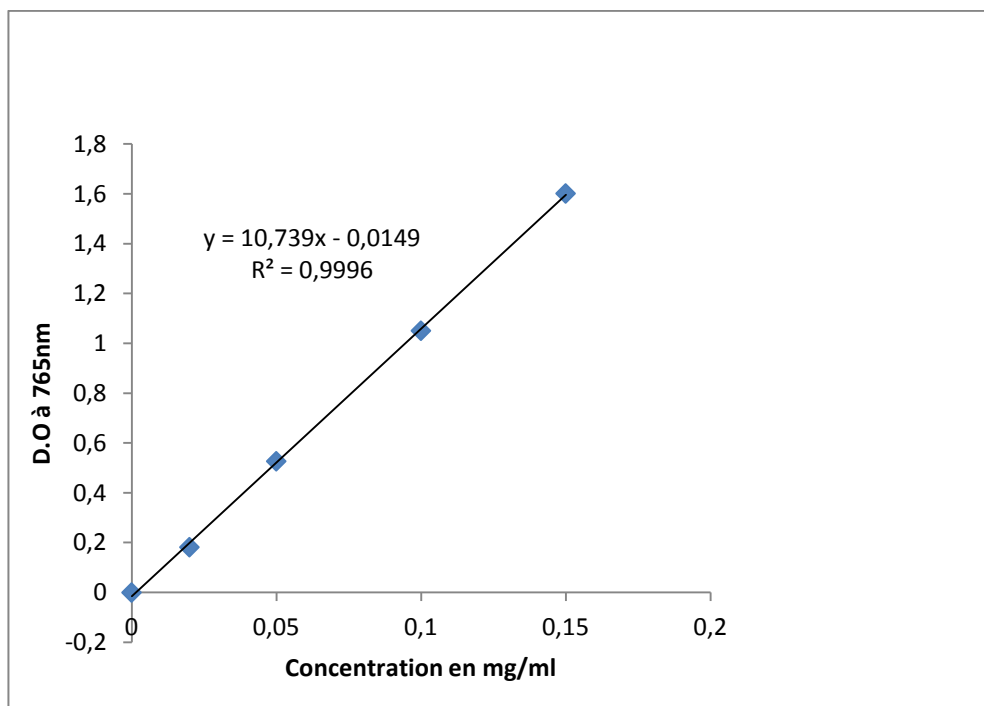


**Figure 17:** spectrophotomètre type (Selecta, E.U).

La courbe d'étalonnage d'Acide Galique est construite à partir des tubes étalon préparé à l'aide d'une solution d'Acide Galique de 1mg/ml à partir de laquelle on prépare une solution fille de 0.1mg/ml et on y ajoute tout les réactifs selon le mode opératoire cité préalablement. Les contenus du mélange sont regroupés dans le tableau suivant :

	S.F d'ac.G (ml)	ac.G (mg/ml)	MeOH	E.D	F.C	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	D.O à 765 nm
<b>T</b>	0	0	2	6	0,5	1,5	0
<b>1</b>	0,2	0,02	1,8	6	0,5	1,5	0,182
<b>2</b>	0,5	0,05	1,5	6	0,5	1,5	0,527
<b>3</b>	1	0,1	1	6	0,5	1,5	1,051
<b>4</b>	1,5	0,15	0,5	6	0,5	1,5	1,602

**Tableau 3 :** mélange des tubes de la gamme d'étalonnage d'Acide Galique



**Figure 18:** Courbe d'étalonnage d'Acide Galique

### III. Etude d'optimisation :

La formalisation du problème permet de rassembler l'expérience accumulée de manière diffuse afin de la compléter et de la préciser grâce à l'expérimentation. Plus cette étape sera établie avec soin plus les plans d'expérience seront fructueux. Dans ce but nous allons définir le problème, déterminer les objectifs de l'étude et faire ressortir les paramètres d'entrées ainsi que les variables de sortie du système étudié.

#### 1. Définir le problème :

Le problème à lequel on fait face dans notre projet est l'optimisation des résultats d'extraction obtenus par la méthode de sonication. Ce travail vise de trouver un point optimum d'extraction par sonication de la lavande qui assurera un compromis entre les différents facteurs agissant sur ce processus tout en maximisant les réponses choisies.

#### 2. Déterminer les objectifs :

De manière générale les objectifs qu'on a spécifiés pour cette étude sont les suivants :

- « Débroussailler », c'est-à-dire faire le tri parmi l'ensemble des variables d'entrée susceptibles d'influencer les variables de sortie pour avoir plus de précision sur le réglage de ces variables influentes.
- « prévoir » et estimer avec beaucoup de précision l'effet de l'ensemble des variables d'entrées influentes, de façons à pouvoir modéliser de manière assez fiable, la valeur des variables de sortie.

### 3. Définir les sorties (les réponses) :

La réponse **Y** (variable de sortie) correspond à un paramètre de sortie du système étudié. Dans notre projet, on a choisi de travailler sur deux réponses concernant l'extraction par sonication de la *Lavande stoechade* : le rendement de l'extraction (**Y<sub>1</sub>**) et le taux des **polyphénols** extraite (**Y<sub>2</sub>**) qu'on devra maximiser (voir le **tab1 p.10**).

### 4. Définir les entrées (les facteurs) :

Les Facteurs **X** représentent des causes possibles de variation de la réponse **Y**. Le choix des facteurs influençant nos réponses se basera d'abord sur une phase de recensement faisant appel aux intervenants dans le processus d'extraction pour établir une liste des facteurs potentiels qui sera présentée sous forme de diagramme d'**Ishikiwa** :

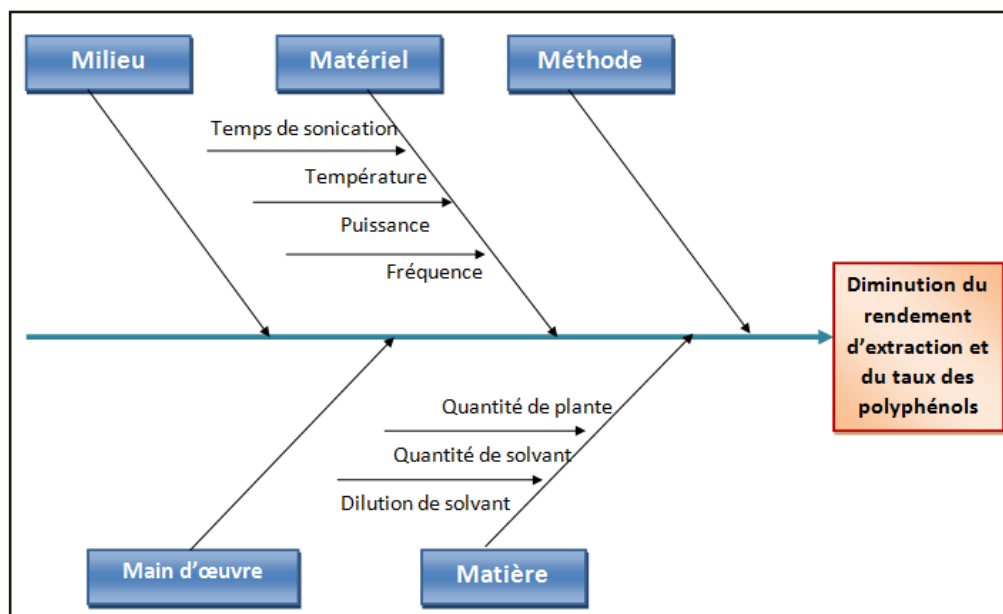


Figure 19 : Diagramme d'Ishikiwa

### 5. Choix d'une stratégie :

Après avoir cerné la problématique on va discuter la stratégie des surfaces de réponses qu'on a choisie. Après la détection des facteurs influents possibles, il faut adopter une procédure pour distinguer et choisir ceux qui sont potentiellement influents sur les réponses considérées. En général on procède à un criblage en utilisant les plans de criblage.

Le criblage des facteurs consiste à distinguer, parmi un ensemble de facteurs potentiellement influents, ceux qui le sont effectivement dans un domaine d'étude fixé. Parmi les plans d'expériences largement utilisés pour le criblage des facteurs, on peut citer les plans de : Plackett et Burman, Taguchi...

Dans la présente étude on s'est basé sur les résultats obtenus par l'étude intitulée « Optimisation d'extraction assistée par ultrasons de *T.hyemalis* utilisant la méthodologie de



surface de réponse » <sup>[20]</sup> pour déterminer les facteurs qui influencent le plus le rendement en extrait et le taux des polyphénols.

Les principaux facteurs qui influent sur l'efficacité d'extraction –selon cette étude-, y compris le temps d'extraction (min, **X1**), le ratio solvant/ matière végétale (mL/g, **X2**) et la concentration d'éthanol (en%, **X3**), ont été sélectionnés en tant que variables indépendantes qui doivent être optimisés pour l'extraction.

### **Remarque:**

La température n'a pas été considérée dans ce présent travail parce que l'échantillon a été maintenu à la température ambiante, d'abord pour profiter de l'une des caractéristiques les plus importantes de la sonication qui permet de réaliser une extraction à température ambiante sans avoir besoin de dépenser plus d'énergie, ensuite pour éviter la dégradation des composés sensibles à la température.

Afin de réaliser l'étude d'optimisation, les expériences ont été réalisées selon le plan de surface de réponse de type **Box-Behnken**.

### **a. Caractéristiques des facteurs :**

Nous avons retenu certains paramètres quantitatifs (température, fréquence et puissance) fixes et d'autres paramètres quantitatifs (la concentration d'éthanol, le temps d'extraction et le ratio solvant/ matière végétale) comme variable à optimiser.

paramètres	unité	Valeur fixe
température	°C	20
fréquence	kHz	35
puissance	W	20

**Tableau 4 :** Paramètres fixés et leurs valeurs

paramètres	unité	Niveau (-)	Niveau (0)	Niveau (+)
Temps	min	20	30	40
Ratio solvant/Matière	ml/g	20	25	30
Concentration d'éthanol	%	40	60	80

**Tableau 5 :** Facteurs variables et leurs domaines de variation

### **b. Caractéristiques du plan :**

Nous proposons pour cette étude un modèle de second degré. Notre choix s'est porté sur un plan Box-Behnken. Ce plan nécessite 13 essais pour 3 facteurs. Nous ajouterons 2 essais au centre pour évaluer l'erreur expérimentale et faire une analyse de la variance du modèle postulé a priori, ce qui porte le nombre des essais à 15 essais. Les caractéristiques du plan sont regroupées dans le tableau 6 :

Objectif de l'étude	Etude dans un domaine expérimental : surface de réponse
Nombre de variables	3
Nombre d'expérience	15
Nombre de coefficients	10
Nombre de réponses	2

**Tableau 6** : caractéristiques du plan

### c. Matrice d'expérience :

La matrice d'expérience est représentée par le tableau 4 :

N°Exp	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

**Tableau 7** : Matrice d'expérience



#### d. Plan d'expérimentation :

Le tableau 5 représente le plan des expériences réalisées selon l'ordre aléatoire recommandé.

N°Exp	Temps (min)	le ratio solvant/ matière (ml/g)	% d'éthanol
1	20	20	60
2	40	20	60
3	20	30	60
4	40	30	60
5	20	25	40
6	40	25	40
7	20	25	80
8	40	25	80
9	30	20	40
10	30	30	40
11	30	20	80
12	30	30	80
13	30	25	60
14	30	25	60
15	30	25	60

**Tableau 8 :** Plan d'expérimentations

# *Résultats et discussions*

## I. Résultat de l'étude d'optimisation :

Le tableau suivant représente les rendements et taux des polyphénols obtenus des 15 essais du plan d'expérience :

N° Exp	Temps (min)	le ratio solvant/ matière (ml/g)	% d'éthanol	rendement (%)	TCP
1	20	20	60	12,33	180,82
2	40	20	60	7,00	144,13
3	20	30	60	15,33	184,36
4	40	30	60	21,03	115,63
5	20	25	40	22,71	149,53
6	40	25	40	26,60	147,48
7	20	25	80	16,60	124,57
8	40	25	80	19,53	108,37
9	30	20	40	14,19	130,53
10	30	30	40	29,93	149,53
11	30	20	80	18,80	118,80
12	30	30	80	21,40	95,52
13	30	25	60	22,33	89,38
14	30	25	60	20,80	95,33
15	30	25	60	21,73	90,87

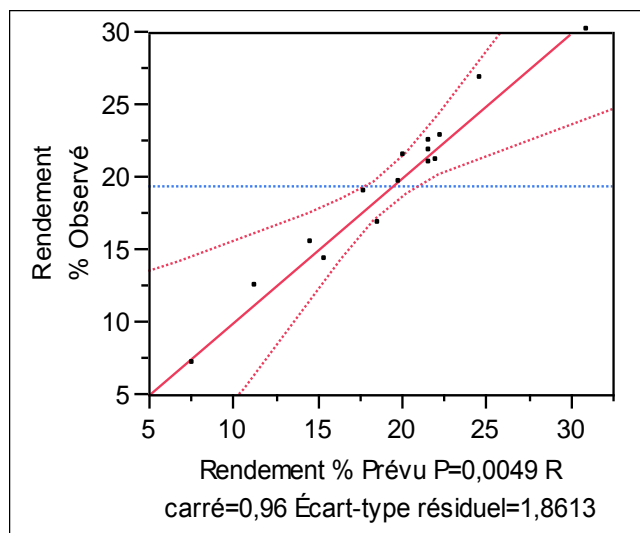
**Tableau 9 :** Résultats des essais du plan d'expérimentations

## II. Analyse des résultats de l'étude d'optimisation :

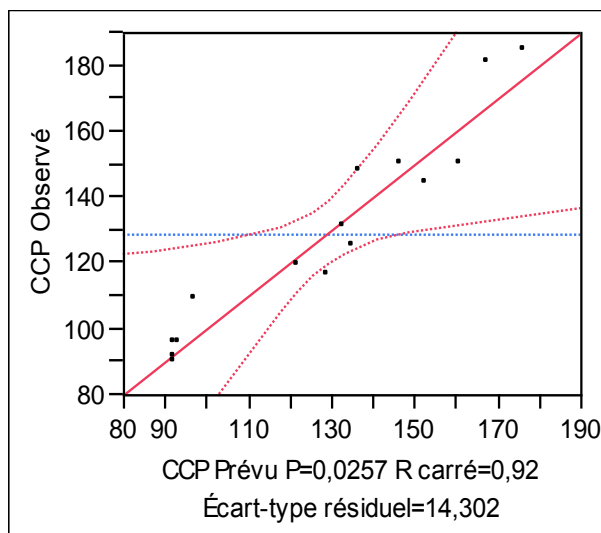
### 1. Analyse des réponses :

Les réponses obtenus après avoir réalisé les 15 essais du plan d'expérience selon un ordre aléatoire seront traités par le logiciel « JMP ».

Les deux graphes suivant font une comparaison entre les valeurs obtenus du rendement et du taux des polyphénols et ceux calculés par le modèle postulé.



**Figure 20** : graphe comparant les rendements mesurés aux rendements calculés



**Figure 21** : graphe comparant les TCP mesurés aux TCP calculés

D'après les deux graphes (figure 9 et 10), on constate que le modèle rend bien compte des réponses mesurées car les points restent dans l'intervalle de confiance à 95%.

## 2. Analyse de la variance et manque d'ajustement:

Le tableau suivant montre les résultats de l'analyse de la variance des deux réponses considérées :

Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	P-value
Modèle	9	434,625	48,292	13,94	0,0049
Résidus	5	17,322	3,464		
Total	14	451,947			

**Tableau 10** : analyse de la variance de la réponse 'rendement'

Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	P-value
Modèle	9	12142,339	1349,15	6,595	0,0257
Résidus	5	1022,804	204,56		
Total	14	13165,143			

**Tableau 11** : analyse de la variance de la réponse 'TCP'

D'après les résultats des tableaux de l'analyse de la variance des effets principaux des deux réponses (tableau 3 et 4), nous pouvons conclure que la régression explique bien presque la totalité des deux réponses mesurées puisque la signification du risque est inférieure à **5%**.

Le tableau suivant montre les résultats de l'analyse de la variance des deux réponses considérées :

Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	P-value
Manque d'ajustement	3	16,133	5,378	9,049	0,101
Erreur pure	2	1,189	0,594		
Erreur totale	5	17,322			

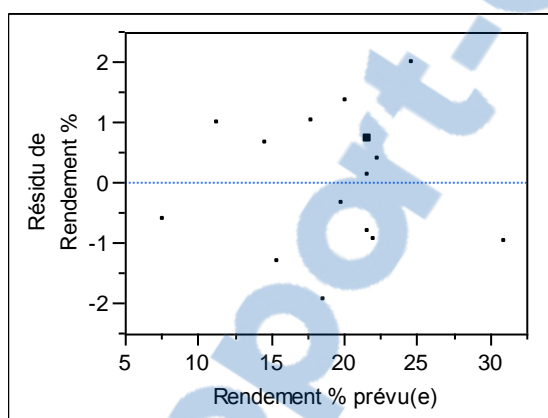
**Tableau 12:** analyse du manque d'ajustement de la réponse 'rendement'

Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	P-value
Manque d'ajustement	3	1003,633	334,544	34,900	0,280
Erreur pure	2	19,171	9,586		
Erreur totale	5	1022,804			

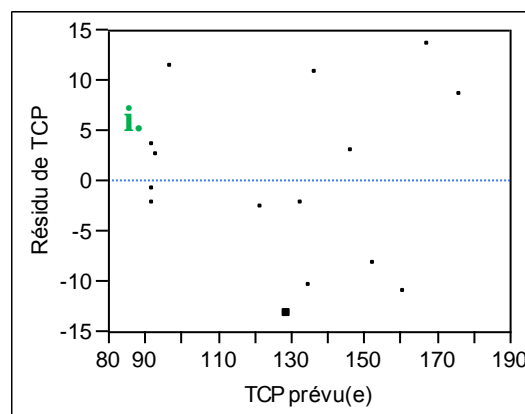
**Tableau 13 :** analyse du manque d'ajustement de la réponse 'TCP'

Les tableaux du manque d'ajustement des deux réponses indiquent que l'erreur expérimentale est plus grande que le manque d'ajustement. Dans ce cas, le modèle est statistiquement satisfaisant et prédictif.

### 3. Analyse des résidus :



**Figure 22 :** Diagramme des résidus en fonction des valeurs prévues du rendement



**Figure 23 :** Diagramme des résidus en fonction des valeurs prévues du TCP

L'analyse de ces deux diagrammes des résidus en fonctions des valeurs prévus des deux réponses permet de constater que les points sont répartis au hasard et qu'il n'y a aucune structure particulière qui se dégage de la représentation des résidus et donc conclure que le modèle considéré est validé.

#### 4. Estimation et statistiques des coefficients :

- **Statistiques classiques :**

Les tableaux suivant représentent les écart-types résiduels et les deux coefficients de détermination des deux réponses ainsi que la moyenne des réponses :

	<b>Rdt</b>	<b>TCP</b>
<b>R carré</b>	0,962	0,922
<b>R carré ajusté</b>	0,893	0,783
<b>Écart-type résiduel</b>	1,861	14,303

**Tableau 14** : statistiques des deux réponses

Pour la réponse « rendement » les valeurs de  $R^2$  et  $R^2$  ajusté sont respectivement 0,962 et 0,893. Pour la réponse « TCP »  $R^2$  et  $R^2$  ajusté valent respectivement 0,922 et 0,783.

- **Analyse des effets des facteurs :**

##### Réponse Rdt :

La validation des coefficients composant le modèle mathématique postulé est une étape cruciale de la validation globale du modèle, Cela s'effectue via un test de Student et c'est la valeur de p-value qui nous permettra décider le modèle retenu.

<b>Terme</b>	<b>Estimation</b>	<b>Écart-type</b>	<b>Rapport t</b>	<b>P-value</b>
<b>a<sub>0</sub></b>	21,62	1,075	20,12	<,0001
<b>a<sub>1</sub></b>	0,899	0,658	1,37	0,230
<b>a<sub>2</sub></b>	4,421	0,658	6,72	0,001
<b>a<sub>3</sub></b>	-2,138	0,658	-3,25	0,023
<b>a<sub>12</sub></b>	2,758	0,931	2,96	0,031
<b>a<sub>13</sub></b>	-0,24	0,931	-0,26	0,806
<b>a<sub>23</sub></b>	-3,285	0,931	-3,53	0,017
<b>a<sub>11</sub></b>	-3,709	0,969	-3,83	0,012
<b>a<sub>22</sub></b>	-3,989	0,969	-4,12	0,009
<b>a<sub>33</sub></b>	3,449	0,969	3,56	0,016

**Tableau 15** : les effets du modèle de la réponse 'Rdt'

D'après le tableau d'analyse des effets des facteurs pour la réponse « rendement », seuls les facteurs **a<sub>1</sub>** (**facteur temps**) et **a<sub>13</sub>** (**interaction du facteur temps et du facteur % d'éthanol**) qui ne sont pas significatifs, pour lesquels le test de «Student» a donné une valeur supérieur au seuil de signification  $\alpha$  (5%) ce qui fait que le modèle retenu de cette réponse sera de la forme :

$$y = a_0 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{23}x_2x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2 + e$$

### Réponse TCP :

Le même principe d'analyse des effets pour la réponse TCP est réalisé dans le tableau qui suit :

Terme	Estimation	Écart-type	Rapport t	P-value
<b>a<sub>0</sub></b>	91,86	8,258	11,12	0,0001
<b>a<sub>1</sub></b>	-15,459	5,057	-3,06	0,028
<b>a<sub>2</sub></b>	-3,655	5,057	-0,72	0,502
<b>a<sub>3</sub></b>	-16,226	5,057	-3,21	0,024
<b>a<sub>12</sub></b>	-8,01	7,151	-1,12	0,314
<b>a<sub>13</sub></b>	-3,538	7,151	-0,49	0,642
<b>a<sub>23</sub></b>	-10,57	7,151	-1,48	0,199
<b>a<sub>11</sub></b>	36,634	7,443	4,92	0,004
<b>a<sub>22</sub></b>	27,741	7,443	3,73	0,014
<b>a<sub>33</sub></b>	3,994	7,443	0,54	0,615

**Tableau 16** : les effets du modèle de la réponse 'TCP'

D'après le tableau d'analyse des effets des facteurs pour la réponse « TCP », seuls les coefficients **a<sub>0</sub>**, **a<sub>1</sub>**, **a<sub>3</sub>**, **a<sub>11</sub>** et **a<sub>22</sub>** sont significatifs, pour lesquels le test de « Student » a donné une valeur inférieure au seuil de signification  $\alpha$  (5%) ce qui fait que le modèle retenu de cette réponse sera de la forme :

$$\hat{y} = a_0 + a_1x_1 + a_3x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2$$

### 5. Modèles mathématiques retenus des deux réponses :

Le modèle mathématique retenu pour la réponse Rendement est le suivant :

$$y = 21.62 + 4.421 * Ratio - 2.138 * Ethanol + 2.758 * Temps * Ratio - 3.285 * Ratio * Ethanol - 3.709 * Temps^2 - 3.989 * Ratio^2$$

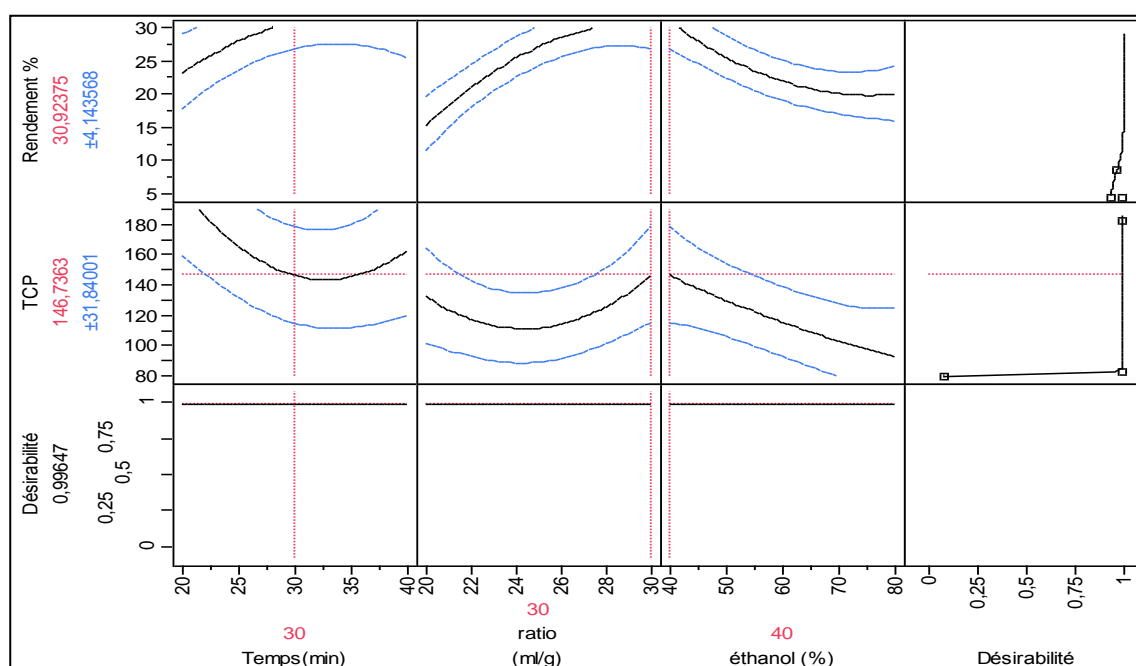
Le modèle mathématique retenu pour la réponse Taux des composés phénoliques est le suivant :

$$y = 91.86 - 15,459 * Temps - 16,226 * Ethanol + 36,634 * Temps^2$$

### 6. Optimisation des réponses :

#### • Fonction de désirabilité :

Le but de l'étude d'optimisation est la maximisation du rendement de l'extraction ainsi que le taux des composés phénoliques. La fonction de désirabilité permet de déterminer préalablement les valeurs optimales des facteurs étudiés pour atteindre ce but tout en maximisant la valeur de la fonction.



**Figure 24 :** Optimisation des conditions de la sonication par la fonction de désirabilité

Les graphes précédents donnent les valeurs des facteurs ajustés avec une optimisation à la main en faisant appel à la maximisation de la fonction de désirabilité à la valeur 1.

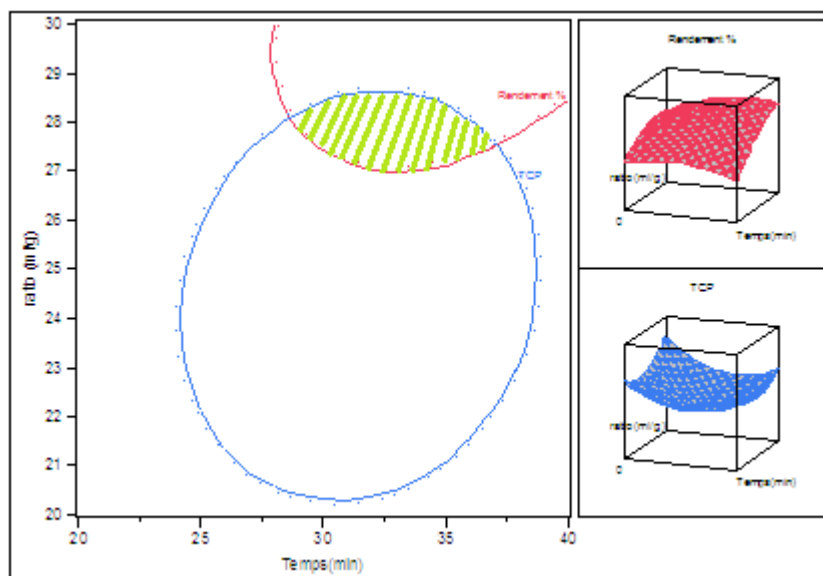
Le maximum de la fonction de désirabilité est atteint pour des valeurs des facteurs de : 30 min (Temps de sonication), 30ml/g (Ratio solvant/ matière végétale) et de l'éthanol à 40%.

#### • Courbes d'isoreponses :

Avec un réglage manuel des valeurs ciblées des deux réponses étudiées, on est intéresser aux conditions expérimentales les plus avantageuses économiquement, alors on a intérêt à utiliser le moins d'éthanol possible dans un intervalle de temps plus ou moins faible, alors on fixe par exemple la valeur du % d'alcool à 40%, on obtient les intervalles de variation optimale des deux autres facteurs :



Horizontal	Vertical	Facteur	X mesuré
⊙	○	Temps(min)	28,902439
○	⊙	ratio (ml/g)	28,018293
○	○	éthanol (%)	40
Réponse		Courbes	Y mesuré
—		Rendement %	30,052318
—		TCP	30 128,64375
		d'isoréponses	130

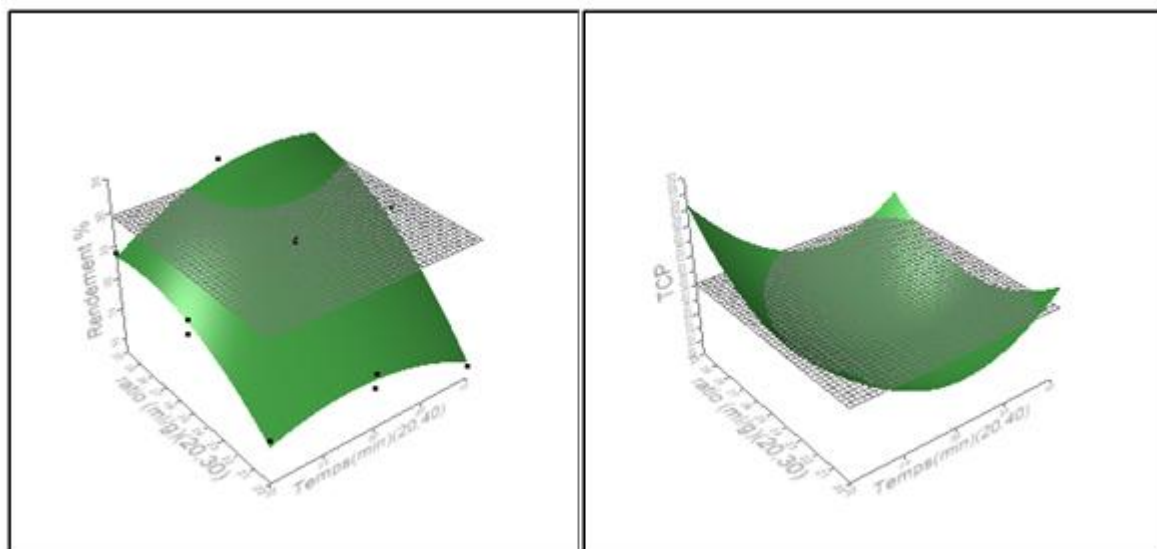


**Figure 25** : Courbes d'isoréponses

Les courbes d'isoréponses permettent de déterminer un intervalle de variation optimal des facteurs pour une valeur maximale du rendement et du taux des composés phénoliques (intersection des courbes des deux réponses : partie hachurée en vert) : Le facteur « temps » va de **29 à 36min** et le facteur « ratio » de **27.5 à 28 ml/g**.

- **Surface de réponses :**

On peut visualiser les courbes d'isoréponses à 3 dimensions pour aboutir aux surfaces de réponses. Ils représentent un tracé pour deux facteurs.



**Figure 26** : surface de réponses correspondantes aux facteurs Ratio et Temps

Les surfaces de réponses montre bien la zone du rendement et du taux des composés phénoliques maximal, il suffit de choisir un réglage qui tient compte des contraintes expérimentales portant sur chacun des deux paramètres, la même réponse peut être atteinte soit en augmentant le temps d'extraction avec minimisation du ratio (solvant/matière végétale), ou bien le contraire.

Avant de préconiser ces réglages, il est indispensable de les contrôler par des essais de vérifications.

## 7. Conclusion de l'étude d'optimisation :

- Le modèle ainsi postulé a été validé statistiquement et expérimentalement ce qui lui confère la qualité à la fois descriptive et prédictive du phénomène étudié.
- L'obtention d'un rendement et d'un taux des polyphénols maximal sera possible dans les meilleures conditions économiques si l'on choisit les réglages suivants :
  - ✓ Un pourcentage d'alcool de 40%
  - ✓ Un temps de sonication de 30 min
  - ✓ Et un ratio (solvant/ matière végétale) de 30ml/g

## 8. Vérification du modèle par des points tests :

Le modèle postulé à priori est validé statistiquement. Pour le vérifier expérimentalement afin de l'exploiter pour une éventuelle prédiction, nous allons tester ce modèle via un point test. Nous avons effectué un essai dont les résultats sont représentés par le tableau suivant :

Cordonnées du point expérimental			Réponse <b>Rdt</b>		Réponse <b>TCP</b>	
Temps	Ratio	% Ethanol	prédite	Expérimentale	prédite	Expérimentale
30	28	45	27.88	26.21	119	118.05

**Tableau 17** : Valeurs expérimentales et prédite pour le point test

Les résultats présentés sur ce tableau montrent qu'il n'y a pas une différence significative entre la réponse expérimentale et celle prédite concernant le rendement et le taux en composés phénoliques.

## Conclusion générale

Cette étude a pour but la maîtrise du procédé d'extraction assistée par ultrasons de la plante *Lavandula.stoechas.L* dans la région de Taounat. Ce travail a été réalisé par l'utilisation des plans d'expériences qui nous ont permis d'obtenir deux modèles, un modèle pour le rendement et un modèle pour le taux des polyphénols. Leur utilisation s'avère très utile en pratique et nous permettent d'apprécier un réglage optimum des paramètres du procédé d'extraction par sonication de la lavande au sein de l'INPMA.

Les mesures obtenues lors des essais réalisés nous ont permis la détermination des modèles prédictifs du rendement et du taux des polyphénols.

Les modèles développés peuvent être employés pour sélectionner les réglages les plus économiques, tout en évitant de réaliser un grand nombre d'essais pour un mélange optimal et qui répond aux cahiers de charges. Ces modèles peuvent être développés et améliorés en prenant en considération d'autres paramètres intrinsèques importants comme la puissance et la température.

La généralisation de ces modèles prédictifs demande une extension dans le domaine de la recherche et ouvre de nouvelles perspectives :

- Prendre en considération les paramètres extrinsèques de culture de la lavande stoechade.
- L'usage de ces plans d'expériences sur d'autres composés de la plante dans le but de chercher un meilleur compromis entre le quantitatif et le qualitatif.
- Prendre en considération d'autres paramètres comme, la puissance, l'effet de la température, la fréquence etc...
- Prendre en considération d'autres réponses à optimiser en vue de développer les recherches pour d'autres composés de la lavande stoechas.
- Optimiser l'extraction par sonication pour d'autre plantes.

Ces perspectives peuvent ouvrir d'autres portes de recherche liée au thème traité dans le présent projet.

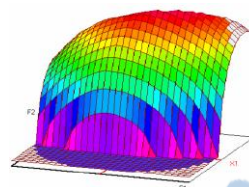
## Références bibliographiques

- [1] Bellakhdar. J., Berrada. M., Denier.C., Holman. M and Il Idrissi. A./Etude comparative de 10 populations de Lavandula stoechas. L Du Maroc. Proceedings du Congrès International "Plantes aromatiques et médicinales et leurs huiles essentielles". (1997).
- [2] Topcu, G., Ayral, M.N., Aydin, A., Goren, A.C., ChH.B., Pezzuto, J.M./Triterpenoids of the roots of Lavandula stoechassp.stoechas. Pharmazie, 5-56 (2001).
- [3] Bellakhdar, J./ La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Medicinal plants of north Africa 318 (1997).
- [4] Dale, A. and Cornwell, S./ The role of laven oil in relieving perineal discomfort following childbirth: A blind randomized trial. J. Adv.Nursing, 89-96 (1994).
- [5] Goren, A., Topcu, G., Bilsel, G., Bilsel, M.,Aydogmus, Z. and Pezzuto, J.M./ The chimical constituents and biological activity ofessential oil of Lavandula stoechassp.stoechas. 797-800 (2002).
- [6] Tisserand, R. and Balacs, T. /Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professional Edinburgh, UK: Churchill Livingstone. 65 (1995).
- [7] Driss.L. /A Guide to Medicinal Plants in North Africa . Lavandula stoechas L.Labiatae. 171-173 (2012).
- [8] Buchbauer, G., Jirovetz, L. and Jager, W./Aromatherapy: Evidence for sedative effects the essential oil of lavender after inhalation. 46-72 (1991).
- [11] Yassine. E., Dalila.B., Mohammed.L., Abdellah.F. / antioxidant and Anti-inflammatory properties of ethanolic extract of lavandula stoechas l. From taounate region in Morocco.International Journal of Phytopharmacology, 21-26 (2014).
- [12] Daniella.P. /Application of ultrasounds for transformation processes of agroalimentary products. Food and Nutrition. Université d'Avignon, 5-25(2012).
- [13] Zhang, R., Xu Y., Shi Y./ The extracting technology of flavonoids compounds, Food and Machinery,. 21-22 (2003)
- [14] Ninad R. J., Abhijeet R.C./ Chemical, Civil and Mechanical Engineering Tracks of 3<sup>rd</sup> Nirma University International Conférence on Engineering .Ultrasonic Assisted E xtraction of Aloin from Aloe Vera Gel. 487-493 (2012).

- [15] Negin Fasih.R , Alireza.G, Mashkouri .N.N ,Ensieh.G./Optimization of ultrasonic assisted extraction of fatty acids from *Borago Officinalis L.* flower by central composite design. King Saud University. Arabian Journal of Chemistry . June 2012
- [16] Simeonov, E. , Tsibranska, I. , Minchev, A./Solid – liquid extraction from plants – experimental kinetics and modeling ,Chem.Eng.Journal, 73 (1999).
- [17] N. Bouzouita, F., Kachouri, M. Hamdi., M.M.Chaabounr., R. Ben Aissa., S. Zgoulli, P. Thonart ., A. Carlier., M. Marlier et G.C. Lognay. J./Volatile Constituents and Antimicrobial Activity of *Lavandula stoechas L.* Oil from Tunisia. Essent. Oil Res. 17 (2005),
- [18] Ayad.M., yassine.B./modélisation des betons ordinaires par des plans d'expériences, université aboubekr belkaid – tlemcen faculte de technologie, département de genie civil. 48-75 (juin 2013).
- [19] Boua et al .J. Appl. Biosci./ Criblage phytochimique et érectile de *Turraea Heterophylla* de Côte d'Ivoire Journal of Applied Biosciences 68 (2013).
- [20] Jennan.S, Farah.A, MahjoubiJ F./ Optimisation of ultrasound assisted extraction of *T.hymalis* using the response surface methodology. J .Mater. Environ. Sci. 773-778 (2015).



**Stage effectué à :** L'institut national des plantes médicinales et aromatiques



**Master ST CAC Agiq**

**Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques**

**Nom et prénom:** EL BOURIMI Ouafae

**Année Universitaire :** 2014/2015

**Titre:** « Optimisation de l'extraction assistée par ultrasons de *Lavandula Stoechas* utilisant la méthodologie de surface de réponse »

### Résumé

L'étude du procédé d'extraction assisté par ultrasons de la *lavande stoechas*.L nécessite une connaissance particulière de l'influence des différents paramètres pouvant agir sur ce processus. Notre travail a pour but de déterminer à l'aide de la méthode des plans d'expérience un ensemble de modèles en fonction des paramètres de la sonication.

Un plan de **Box-Behnken** à trois facteurs a été donc utilisé pour modéliser, l'influence de trois paramètres liés à la sonication. Les paramètres considérés dans l'étude sont : le temps de la sonication, % d'éthanol et le ratio solvant/matière végétale. Notre étude comporte deux phases essentielles :

Une première phase dont l'objectif est l'étude préliminaire du système étudié (détermination des réponses et facteurs), le choix de méthodologie d'étude et la réalisation des différentes expériences dans le domaine de notre étude.

La deuxième phase dont l'objectif est l'établissement des modèles mathématiques permettant d'optimiser le rendement de l'extraction ainsi que le taux des composés phénoliques selon les paramètres étudiés tout en mettant en évidence les interactions qui existent entre les différents facteurs grâce au logiciel JMP.

**Mots Clés :** Extraction, sonication, modélisation, plans d'expériences, Box-Behnken