

Au terme de ce travail, je voudrais remercier toutes les personnes qui, d'une manière directe ou indirecte, ont contribué à sa réalisation.

Je tiens à exprimer au Professeur Aziz BELRHITI ALAOUI, membre du Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, mes remerciements les plus sincères pour la grande patience et l'entière disponibilité dont il a fait preuve à mon égard tout au long de la préparation de cette thèse. Sa direction rigoureuse, sa vision scientifique, ses judicieuses directives, ses encouragements énergisants lors des dynamiques séances de travail ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail de thèse.

Je remercie sincèrement le Professeur Abdellah FARAH, membre du Laboratoire de Chimie Organique Appliquée à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour son dévouement exemplaire et son encadrement sans faille que pour ses recommandations et avis judicieux durant nos séances de travail. Je le remercie également pour toutes ses suggestions, son soutien et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce projet.

Mes remerciements sont également adressés au Professeur Lahsen EL GHADRAOUI, Directeur du Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, d'avoir accepté de présider ma soutenance malgré ses préoccupations nombreuses, et de juger cette thèse dans sa globalité.

Je suis très sensible à l'honneur que me font, Monsieur Abdelkader HAKKOU, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie d'Oujda, Monsieur Abdelaziz CHAOUCH, Professeur à la Faculté des Sciences Ibn Tofail de Kénitra et Monsieur Said CHAKROUNE, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je suis très heureux de bénéficier de leurs observations et je tiens à leur exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

Je veux exprimer, ici, ma respectueuse gratitude à Madame Ghyzlane ECHCHGADDA, Professeur à l'Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès pour avoir bien voulu participer à ce jury et contribuer à l'amélioration de ce travail.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse tous mes sentiments de reconnaissance à ma famille ; ma mère, mon père, mes frères Mohammed, Youssef, Hamid, Abdelkader et Mustafa, mes sœurs Sfia et khadija.

Remerciements

Je ne saurais terminer sans adresser une pensée à mes amis qui m'ont été, chacun à sa manière, une source d'inspiration et d'énergie. Je m'abstiens de les nommer tellement la liste est longue. Je nommerai tout de même Zakaria Hazzoumi, Youssef Moustakim, Yassin Kharbache, Mounyr Balouiri, Hassan Barkai Maidé et mon ami et collègue de parcours Mouhcine Fadil. Sans oublier Marouane Amrati, Taoufik Amrati, Mehdi Nemli, Nabil Sarmouh, Simohamed El-Meskini, Abdelali Alae, Aziz Hammoudi et Nourddine Hakkouni.

Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans l'optique d'adopter une stratégie de valorisation d'une plante aromatique et médicinale (PAM) *Pistacia lentiscus*, ainsi que de donner une valeur ajoutée aux produits naturels extraits à partir de cette plante, en utilisant la méthodologie des plans d'expériences (MPE).

Nous avons effectué une étude de screening (détermination des facteurs influents) sur le rendement en huile essentielle extraite par hydrodistillation en se servant des plans de Plackett-Burman. Cette étude nous a permis de cerner les facteurs qui ont une influence significative sur la variation du rendement.

Suite à l'étude de criblage, une étude de l'effet de l'individualité, dû aux conditions climatiques et géographiques, sur le rendement en HE a été réalisée. L'utilisation des outils statistiques nous a permis de conclure que l'exposition au soleil a un effet positif sur le rendement en HE.

Dans l'objectif d'améliorer le rendement en huile essentielle de la plante étudiée, nous avons réalisé une étude de l'effet de la période de récolte et du séchage à l'air libre sur le rendement en huile essentielle. Les meilleurs rendements ont été obtenus en mois de mai et la durée de séchage optimale est de six à sept jours.

Après la détermination des facteurs influents, une étude d'optimisation de ces facteurs a été réalisée par la méthode de surface de réponses (MSR).

Enfin, une évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* seule et en combinaisons binaires et tertiaires avec d'autres huiles essentielles contre quatre souches pathogènes a été réalisée. L'utilisation de la méthode des plans de mélanges nous a permis d'élaborer des formulations à activités antibactériennes intéressantes et d'augmenter la sensibilité des souches bactériennes étudiées envers les mélanges des huiles essentielles proposés.

Mots clés : *Pistacia lentiscus*, hydrodistillation, huile essentielle, plans d'expériences, criblage, surface de réponses, formulation, activité antibactérienne.

This research cover a view of adopting a development strategy of an aromatic and medicinal plant, *Pistacia lentiscus*, as well as giving an added value of natural product extracted from this plant, using the design of experiences (DOE).

We have performed a preliminary study with screening approach (identifying influential factors) on the essential oil (EO) yield extracted using the Plackett-Burman design. This study allowed us to identify factors that have a significant influence on the yield variation.

From the results of the screening study, we turned to the study of the individuality effect on EO yield. The use of statistical tools has enabled us to conclude that sun exposure has a positive effect in EO yield.

With the objective of improving the EO yield, we have focused on the harvesting period and the drying time influence on EO yield. The result of this study showed that the highest yields are obtained in May and the optimum drying time is six to seven days.

After the appointment of influential factors, we have chained by optimizing the studied factors via response surface method (RSM).

Finally, an evaluation of the antibacterial activity of *Pistacia lentiscus* EO single and with binary and ternary combinations with other EOs against four pathogenic strains was performed. The use of the mixtures design method allowed us to develop the interesting formulations of antibacterial activities and to increase the bacterial strains sensitivity.

Keywords: *Pistacia lentiscus*, Hydrodistillation, essential oil, design of experiments, screening, response surface, formulation, antibacterial activity.

ينخرط العمل المقدم في هذا البحث في إطار بلورة إستراتيجية لثمين النبتة الطبية و العطرية "الدرو" و إضفاء قيمة مضافة على مستخلصاتها الطبيعية باستخدام منهجية تصميم التجارب.

أجرينا دراسة الفرز (تحديد العوامل المؤثرة) على محصول الزيت الطيار المستخرج بواسطة التقطير بالبخار باستخدام منهجية بلاكيت- بورمان. حيث مكنت هذه الدراسة من تحديد العوامل التي لها تأثير كبير على التغير في عائد الزيت الطيار.

وبعد دراسة الفرز، قمنا بدراسة تأثير التفرّد، الناتج عن الظروف المناخية والجغرافية، على عائد الزيت الطيار. و باستخدام الأدوات الإحصائية استنتجنا أن تعرض شجيرات نبتة "الدرو" لأشعة الشمس لها تأثير إيجابي على الرفع من قيمة العائد. دائما في إطار تحسين عائد الزيت الطيار، قمنا بدراسة تأثير فترة الجني و مدة تجفيف أوراق هاته النبتة على عائد الزيت الطيار و قد بينت النتائج أن أفضل فترة للجني في شهر مايو كما أن المدة المثالية للتجفيف بين ستة و سبعة أيام. بعد تحديد العوامل المؤثرة على عملية التقطير وأثرها على عائد الزيت الطيار، أجرينا دراسة باستخدام منهجية تصميم التجارب.

و في الأخير، قمنا بتقييم فعالية النشاط المضاد للبكتيريا، للزيت الطيار للدرو و حيدا أو في خلطات ثنائية و ثلاثية مع زيوت أخرى، ضد أربع سلالات بكتيرية ممرضة. و قد مكنتنا استعمال منهجية تصميم التجارب من بلورة تركيبات من الزيوت الطيارة كفيلة بالرفع من حساسية البكتيريا المدروسة و زيادة من النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الطيارة المستعملة.

كلمات البحث : درو- تقطير، زيت طيار، تصميم التجارب، فرز، تركيبة، النشاط المضاد للبكتيريا.

	Page
Figure 1 : Plante de lentisque (<i>Pistacia lentiscus</i> L.)	8
Figure 2 : Montage d'hydro-distillation des huiles essentielles	10
Figure 3 : (a) Schéma de vapohydrodistillation ; (b) Schéma de vapo-distillation.....	11
Figure 4 : Montage d'une distillation assistée par micro-onde des HE.....	12
Figure 5 : Diagramme de phase de CO ₂	13
Figure 6 : Evolution des profils pression-temps durant le prétraitement des PAM.....	14
Figure 7: Schéma d'un appareil d'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG)	15
Figure 8 : Schéma du fonctionnement d'un appareil d'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CPG/SM	16
Figure 9 : Paroi bactérienne (bactérie Gram négatif)	22
Figure 10 : Principales localisations des sites d'action des constituants des HE	23
Figure 11 : Domaine de variation d'un facteur	29
Figure 12 : Espace expérimentale délimité par deux facteurs	30
Figure 13 : Domaine d'étude sans contrainte	30
Figure 14 : Représentation des points expérimentaux dans un domaine d'étude	31
Figure 15 : Surface de réponse formée par l'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine d'étude.....	31
Figure 16 : Représentation des mélanges à trois constituants à l'aide d'un Triangle équilatéral	40
Figure 17 : Plan de mélange ne comportant que les trois produits purs	41
Figure 18 : Plan de mélange en réseaux {3,2} comportant les trois produits purs et les mélanges moitié-moitié .41	41
Figure 19 : Plan de mélange centré comportant les trois produits purs, les mélanges moitié-moitié et le mélange équiproportionnel des trois produits purs	42
Figure 20 : Plan de mélange centré augmenté comportant les trois produits purs, les mélanges moitié-moitié, le mélange équiproportionnel des trois produits purs et les mélanges situés aux centres de gravité des simplex unitaires	43
Figure 21 : Analyse des résidus de l'étude de criblage	52
Figure 22 : Graphique des effets des facteurs	53
Figure 23 : Graphique de PARETO individuel	53
Figure 24 : Graphe de la variance expliquée en fonction du nombre de composantes étudiées.....	62
Figure 25 : Graphe des corrélations entre les variables étudiées.....	63
Figure 26 : Graphe de distribution des individus	64
Figure 27 : Évolution du rendement en huiles essentielles des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> en fonction de la période de récolte	72
Figure 28 : Évolution du rendement en huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> en fonction de la durée de séchage à l'air libre.....	73
Figure 29 : Évolution du rendement en huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> en fonction de l'humidité.....	74
Figure 30 : Analyse des résidus de l'étude d'optimisation.....	84
Figure 31 : Graphe des courbes d'isoréponses pour le rendement en huile essentielle de <i>P. lentiscus</i>	85
Figure 32 : Graphe de surface de réponse pour le rendement en huile essentielle de <i>P. lentiscus</i>	86
Figure 33 : Principe de la méthode de diffusion par disque	93
Figure 34 : Microplaque en polypropylène à 96 puits.....	94

- Figure 35 : Graphe de surface de réponse pour le diamètre des zones d'inhibition du mélange contre *Escherichia coli* (a) Graphe des courbes d'isoreponses pour le diamètre des zones d'inhibition du mélange contre *Escherichia coli* (b)..... 101
- Figure 36 : Graphe de surface de réponse pour le diamètre des zones d'inhibition du mélange contre *Staphylococcus aureus* (a) Graphe des courbes d'iso-réponses pour le diamètre des zones d'inhibition du mélange contre *Staphylococcus aureus* (b) 105

	Page
Tableau 1 : Classification botanique de <i>P. lentiscus</i> L.....	7
Tableau 2 : Marché mondial des huiles essentielles.....	20
Tableau 3 : Nombre de paramètres inconnus de différents modèles mathématiques pour des plans de mélanges	39
Tableau 4 : Facteurs de l'étude de criblage et leurs niveaux réels et codés.....	47
Tableau 5 : Matrice d'expériences générée de l'étude de criblage	48
Tableau 6 : Plans d'expérimentation de l'étude de criblage	49
Tableau 7 : Données de base de l'analyse de variance d'étude de criblage	50
Tableau 8 : Analyse de la variance de l'étude de criblage	51
Tableau 9 : Effet des coefficients du modèle de l'étude de criblage	52
Tableau 10 : Données de bases de l'étude de l'individualité	59
Tableau 11 : Caractéristiques statistiques des variables étudiés.....	61
Tableau 12 : Valeurs propres et pourcentage de variabilité expliquée des axes.....	61
Tableau 13 : Matrice de corrélation des variables étudiées.....	62
Tableau 14 : Analyse de la variance de l'étude de l'individualité.....	64
Tableau 15 : Effets des coefficients du modèle qui relie la variable dépendante aux autres variables étudiées	65
Tableau 16 : Rendement en huiles essentielles des feuilles de <i>P. lentiscus</i> en fonction de la période de récolte.....	71
Tableau 17 : Rendement et humidité des feuilles de <i>P. lentiscus</i> en fonction de la durée de séchage	72
Tableau 18 : Analyse de la variance du modèle linéaire reliant le rendement à l'humidité	74
Tableau 19 : Effets des coefficients du modèle de régression qui relie le rendement à l'humidité	75
Tableau 20 : Facteurs et leurs niveaux réels et codés de l'étude d'optimisation	79
Tableau 21 : Matrice d'expériences générée de l'étude d'optimisation.....	80
Tableau 22 : Plans d'expérimentation de l'étude d'optimisation.....	82
Tableau 23 : Données de base de l'analyse de variance d'étude d'optimisation.....	82
Tableau 24 : Analyse de la variance de l'étude d'optimisation.....	83
Tableau 25 : Effet des coefficients du modèle de l'étude d'optimisation	84
Tableau 26 : Réponse prédite et expérimentale du point test.....	86
Tableau 27 : Matrice d'expériences générée de l'étude des mélanges	92
Tableau 28 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>P. lentiscus</i> exprimé par les diamètres des zones d'inhibition.....	94
Tableau 29 : Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle de <i>P. lentiscus</i>	95
Tableau 30 : Détermination des valeurs des concentrations minimales bactéricides (CMB) de l'huile essentielle de <i>P. lentiscus</i> contre les bactéries testées.....	96
Tableau 31 : Les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles seules et en mélange avec l'huile de <i>P. lentiscus</i> contre les souches bactériennes Gram positives testées	97

Tableau 32 : Les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles seules et en mélange avec l'huile de <i>P. lentiscus</i> contre les souches bactériennes Gram négatives testées	97
Tableau 33 : Plan d'expérimentation de l'étude de mélange contre <i>Escherichia coli</i>	98
Tableau 34 : Données de base de l'analyse de variance d'étude de mélange contre <i>Escherichia coli</i>	99
Tableau 35 : Analyse de la variance de l'étude de mélange contre <i>Escherichia coli</i>	99
Tableau 36 : Comparaison des réponses mesurées et calculées aux points tests de l'étude de mélange contre <i>Escherichia coli</i>	100
Tableau 37 : Effet des coefficients du modèle de l'étude de mélange contre <i>E. coli</i>	100
Tableau 38 : Plan d'expérimentation de l'étude de mélange contre <i>P. aeruginosa</i>	102
Tableau 39 : Analyse de la variance de l'étude de mélange contre <i>P. aeruginosa</i>	102
Tableau 40 : Plans d'expérimentation de l'étude de mélange contre <i>S. aureus</i>	103
Tableau 41 : Données de base de l'analyse de variance d'étude de mélange contre <i>S. aureus</i>	103
Tableau 42 : Analyse de la variance de l'étude de mélange contre <i>S. aureus</i>	104
Tableau 43 : Comparaison des réponses mesurées et calculées aux points tests de l'étude de mélange contre <i>S. aureus</i>	104
Tableau 44 : Effet des coefficients du modèle de l'étude de mélange contre <i>S. aureus</i>	105

ACP	: Analyse en composante principale
ANOVA	: Analyse de variance
Bs	: <i>Bacillus subtilis</i>
CM	: Carré moyen
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
CMB	: Concentration minimale bactéricide
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse
Ddl	: degré de liberté
Ec	: <i>Escherichia coli</i>
F	: F de test de Fisher
H	: Humidité
Haut	: Hauteur de l'individu
HE	: Huile essentielle
Larg	: Largeur moyenne des feuilles
Long	: Longueur moyenne des feuilles
M_s	: Masse en matière végétale sèche
M_f	: Masse en matière végétale fraîche
M_{HE}	: Masse en huile essentielle
MPE	: Méthodologie des plans d'expériences
MSR	: Méthodologie de surface de réponses
PAM	: Plante aromatique et médicinale
PE	: Plans d'expériences
PM	: Plans de mélange
Ps	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>p-value</i>	: Probabilité de significativité
r	: Résidus
R^2	: Coefficient de détermination
R^2_a	: Coefficient de détermination ajusté
Rdt	: Rendement
RLM	: Régression linéaire multiple
Sa	: <i>Staphylococcus aureus</i>
SC	: Somme des carrés
SCE	: Somme des carrés des écarts
$SCRCC_m$: Somme des carrés des réponses calculées corrigées de la moyenne
$SCRMC_m$: Somme des carrés des réponses mesurées corrigées de la moyenne
SM	: Spectrométrie de masse
<i>t-student</i>	: t du test de student
Y	: Réponse
Y_{cal}	: Réponse calculée
Y_{exp}	: Réponse expérimentale

Table des matières

	Page
Introduction générale	1
Chapitre 1 : Etude bibliographique	5
I. Plantes aromatiques et médicinales	6
I. 1. Historique.....	6
I. 2. Plantes aromatiques et médicinales du Maroc.....	6
I. 3. Description de la plante étudiée – <i>Pistacia lentiscus</i> L.	7
I. 3.1. Systématique	7
I. 3.2. Caractères botaniques et écologiques	7
I. 3.3. Habitat et aire de répartition géographique au Maroc	8
I. 3.4. Propriétés thérapeutiques et pharmacologiques	8
II. Huiles essentielles	9
II. 1. Définition	9
II. 2. Tissus sécréteurs.....	9
II. 3. Techniques d'extraction	9
II. 3.1. Méthodes conventionnelles et classiques	10
II. 3.1.1. Distillation	10
II. 3.1.2. Extraction par expression	11
II. 3.1.3. Extraction par solvant.....	11
II. 3.2. Techniques innovantes d'extraction des huiles essentielles	12
II. 3.2.1. Extraction assistée par ultrason	12
II. 3.2.2. Extraction assistée par micro-onde.....	12
II. 3.2.3. Extraction par fluide supercritique	13
II. 3.2.4. Extraction par la détente instantanée contrôlée	13
II. 4. Détermination du rendement	14
II. 5. Méthodes d'analyses	15
II. 5.1. Chromatographie en phase gazeuse.....	15
II. 5.2. Spectrométrie de masse	15
II. 5.3. Couplage chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse	15
II. 6. Techniques d'encapsulation	17
II. 7. Propriétés fondamentales.....	17
II. 8. Domaines d'utilisation.....	19
II. 8.1. Aromathérapie	19
II. 8.2. Industrie alimentaire.....	19
II. 8.3. Parfumerie et cosmétologie	19
II. 8.4. Désinfection des locaux.....	19
II. 9. Aspect économique	20
II. 9.1. Marché international.....	20
II. 9.2. Marché Marocain.....	20
III. Activité antibactérienne	21
III. 1. Mécanisme et sites d'action antibactérienne.....	21
III. 2. Action de différentes classes de constituants des huiles essentielles.....	23

III. 2.1. Action des phénols.....	23
III. 2.2. Action des alcools.....	24
III. 2.3. Action des aldéhydes.....	24
III. 2.4. Action des cétones.....	24
III. 2.5. Action des hydrocarbures.....	24
III. 3. Techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	25
III. 4. Souches bactériennes étudiées.....	26
III. 4.1. <i>Bacillus subtilis</i>	26
III. 4.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	26
III. 4.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
III. 4.4. <i>Escherichia coli</i>	27
IV. Plans d'expériences.....	28
IV. 1. Notions de plan d'expériences.....	28
IV. 1.1. Définition de plan d'expériences.....	28
IV. 1.2. Objectifs.....	28
IV. 1.3. Réponse.....	29
IV. 1.4. Facteurs.....	29
IV. 1.5. Espace expérimental.....	29
IV. 1.6. Domaine expérimental.....	30
IV. 1.7. Points expérimentaux.....	30
IV. 1.8. Surface de réponse.....	31
IV. 1.9. Modèle mathématique.....	32
IV. 1.10. Démarche méthodologique d'un plan d'expérience.....	33
IV. 2. Plans d'expériences classiques.....	34
IV. 2.1. Plans pour criblage.....	34
IV. 2.1.1. Plans factoriels complets.....	34
IV. 2.1.2. Plans factoriels fractionnaires.....	35
IV. 2.1.3. Plans de Plackett-Burman.....	35
IV. 2.2. Plans pour surfaces de réponses.....	36
IV. 2.2.1. Plans composites centrés.....	36
IV. 2.2.2. Plans de Box-Behnken.....	37
IV. 2.2.3. Plans de Doehlert.....	37
IV. 3. Plans pour mélanges.....	37
IV. 3.1. Modèles mathématiques pour des plans de mélanges.....	38
IV. 3.2. Mélanges à deux constituants.....	40
IV. 3.3. Mélanges à trois constituants.....	40
IV. 3.3.1. Plans en réseaux.....	41
IV. 3.3.2. Plans de mélanges centrés.....	42
IV. 3.3.3. Plans de mélanges centrés augmentés.....	42
Chapitre 2 : Criblage des facteurs agissant sur l'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i>	44
I. Introduction.....	45

II. Matériel et méthodes	45
II. 1. Matériel végétal étudié	45
II. 2. Extraction de l'huile essentielle.....	45
II. 3. Méthodes d'étude	46
II. 3.1. Choix de la réponse	46
II. 3.2. Choix des facteurs	46
II. 3.3. Choix des niveaux des facteurs	46
II. 3.4. Choix du plan d'expérience.....	47
II. 3.5. Matrice d'expérience	47
II. 4. Modèle mathématique et analyse statistique	48
III. Résultats et discussions	49
III. 1. Plan d'expérimentation.....	49
III. 2. Analyse statistique de la réponse	49
III. 2.1. Analyse de la variance	49
III. 2.2. Analyse des résidus	51
III. 3. Etude des effets des facteurs.....	52
III. 4. Etude de la fonction réponse Y.....	54
III. 5. Discussion des résultats de criblage des facteurs.....	54
III. 5.1. Temps d'extraction	54
III. 5.2. Individualité.....	54
III. 5.3. Humidité	54
III. 5.4. Rapport entre la matière végétale et l'eau.....	55
III. 5.5. Division de la matière végétale.....	55
IV. Conclusion.....	55
Chapitre 3 : Etude de l'effet de l'individualité sur le rendement en huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i>	
I. Introduction	58
II. Matériel et méthodes	58
II. 1. Matériel végétal.....	58
II. 2. Variables étudiés	58
III. Résultats et discussions	59
III. 1. Données de bases de l'étude	59
III. 2. Analyse statistique des données.....	59
III. 2.1. Analyse en composantes principales	60
III. 2.1.1. Etude des variables	60
III. 2.1.2. Etude des individus.....	63
III. 2.2. Modélisation du rendement en fonction des variables étudiées	64
III. 3. Discussion des résultats	65
IV. Conclusion.....	66
Chapitre 4 : Etude de l'effet de séchage sur le rendement en huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> 68	
I. Introduction	69
II. Matériel et méthodes	69
II. 1. Matériel végétal étudié	69

II. 2. Traitement avant distillation.....	69
II. 3. Extraction de l'huile essentielle.....	70
III. Résultats et discussions	70
III. 1. Effet de la période de récolte	70
III. 2. Effet de la durée de séchage	72
III. 3. Modélisation du rendement en fonction de l'humidité	74
III. 3.1. Analyse de la variance	74
III. 3.2. Etude des effets des coefficients et modèle mathématique	75
III. 4. Discussion des résultats	75
IV. Conclusion.....	76

Chapitre 5 : Etude de l'optimisation des facteurs influents sur l'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*

I. Introduction	78
II. Matériel et méthodes	78
II. 1. Matériel végétal étudié	78
II. 2. Extraction de l'huile essentielle.....	78
II. 3. Méthodes d'études.....	78
II. 3.1. Choix de la réponse	78
II. 3.2. Choix des facteurs	79
II. 3.3. Choix des niveaux des facteurs	79
II. 3.4. Choix du plan d'expérience.....	79
II. 3.5. Matrice d'expérience	79
II. 4. Modèle mathématique et analyse statistique	80
II. 5. Etude du point test.....	81
III. Résultats et discussions	81
III. 1. Plan d'expérimentation.....	81
III. 2. Analyse statistique de la réponse	82
III. 2.1. Analyse de la variance	82
III. 2.2. Analyse des résidus	83
III. 3. Etude des effets des facteurs.....	84
III. 4. Modèle mathématique	85
III. 5. Etude graphique.....	85
III. 6. Point test.....	86
III. 7. Discussion des résultats de l'optimisation des facteurs	87
IV. Conclusion.....	88

Chapitre 6 : Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* et d'autres huiles essentielles.....

I. Introduction	90
II. Matériel et méthodes	90
II. 1. Souches bactériennes.....	90
II. 2. Huiles essentielles	91
II. 3. Mélanges des huiles essentielles.....	91

II. 3.1. Mélanges binaires des huiles essentielles	91
II. 3.2. Mélanges tertiaires des huiles essentielles.....	91
II. 4. Activité antibactérienne.....	92
II. 4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque.....	92
II. 4.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI.....	93
II. 4.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB.....	94
III. Résultats et discussions	94
III. 1. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>P. lentiscus</i>	94
III. 1.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque.....	94
III. 1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	95
III. 1.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide	95
III. 2. Activité antibactérienne des mélanges binaires des huiles essentielles	96
III. 3. Activité antibactérienne des mélanges tertiaires des huiles essentielles.....	98
III. 3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque contre <i>E. coli</i>	98
III. 3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque contre <i>P. aeruginosa</i>	101
III. 3.3. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque contre <i>S. aureus</i>	103
III. 4. Discussion des résultats.....	106
III. 4.1. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>P. lentiscus</i>	106
III. 4.2. Activité antibactérienne des mélanges binaires des huiles essentielles.....	106
III. 4.3. Activité antibactérienne des mélanges tertiaires des huiles essentielles.....	107
IV. Conclusion.....	108
Conclusion générale	109

Introduction générale

L'intérêt pour les plantes aromatiques et médicinales (PAM) peut être retracé des milliers d'années pour leur utilité pour l'humanité et cela continue jusqu'à nos jours [1]. Le principe de l'utilisation des PAM a vu le jour par des expériences individuelles. Au fil des générations, ce domaine a évolué de l'état des connaissances discrétionnaires à une science avec des bases fondamentales grâce à la contribution des savants arabo-persans de l'âge médiévale tels que : Ibn Al Baitar, Avicenne, Al Ghassani... [2].

Il est vrai que l'apparition de la médecine moderne dans les deux derniers siècles, avec le grand succès de l'utilisation d'antibiotiques de synthèse contre les infections bactériennes, fongiques, a causée le déclin des traitements par les plantes [3]. Ce qui a découragé les chercheurs et l'industrie pharmaceutique à faire de sérieux efforts pour développer des médicaments contenant des composés naturels simples. Toutefois, cela peut maintenant être en train de changer, avec le problème croissant de souches bactériennes et virales résistantes aux médicaments, en partie causée par la sur-utilisation des médicaments de synthèse. Le développement de nouveaux médicaments n'a pas dans tous les cas tenu avec l'émergence de nouvelles souches d'agents pathogènes résistantes, de telles souches qui ont causées des milliers de décès par an [2]. En outre, la plupart des médicaments synthétiques ont plus ou moins de graves effets secondaires. La préoccupation des effets secondaires de la médecine moderne a encouragé les gens à rechercher de nouvelles formes de traitement plus efficaces par le retour à la nature avec l'apparition de différentes méthodes de traitement par des produits naturels issues de PAM ou ce qui est devenue la médecine alternative.

Le terme «produits naturels» dérivés des PAM couvre une gamme extrêmement vaste et diversifié de composés chimiques dérivés et isolés à partir de sources végétales. Les vertus de ces produits sont multiples. Actuellement, ce secteur trouve sa place dans différentes filières des industries agro-alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques...du monde entier [3]. La capacité d'accéder à des produits naturels, de comprendre leur utilité et d'en tirer des applications est devenue une force motrice majeure dans le domaine commercial, ce qui a entraîné une concurrence acharnée entre les fournisseurs de la matière végétale dans un marché de plus en plus mondialisé. Par conséquent, certaines actions doivent être engagées pour valoriser les ressources en PAM et leurs donner une valeur ajoutée afin d'assurer la protection des ressources naturelles végétales qui constituent une partie importante de la biodiversité [4].

La valorisation de la filière de PAM est ainsi devenue indispensable dans un pays regorgeant d'une richesse très importante en biodiversité végétale comme le Maroc mais qui dispose encore de ressources en flore mal exploitées [5].

Une valorisation qui ne peut se faire qu'à travers la modernisation du secteur afin de passer d'un secteur quasi-totalement traditionnel à un véritable secteur industriel. Ainsi, la grande majorité de l'exportation du Maroc en PAM est d'une faible valeur ajoutée, sous formes de plantes séchées ou sous forme d'extraits aromatiques : huiles essentielles (HE), concrètes et ou absolues... Dans le même sens, les unités de transformation des PAM disposent en général de techniques simples et traditionnelles qui nécessitent d'importantes adaptations afin d'obtenir des résultats équivalents à ceux des techniques les plus récentes et coûteuses [3].

L'une des techniques de transformation des PAM dite « conventionnelle ou classique », la plus utilisée est l'hydrodistillation des HE. C'est une pratique ancienne et peu coûteuse qui a toujours sa place dans le secteur industriel marocain [2-3]. Des stratégies permettant l'optimisation de ce procédé d'extraction seront d'un grand intérêt et constitueront un premier pas vers la valorisation et l'intégration dans un développement durable des ressources en PAM mal exploitées de notre pays.

Dans cette optique, nous avons appliqué dans ces travaux la formalisation conférée par la méthodologie des plans d'expériences (MPE) à l'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle (HE) des feuilles de *Pistacia lentiscus*. Cette HE qui est un exemple éloquent de produits naturels dérivés de PAM qui a des vertus très importantes mais qui reste encore mal exploitée au Maroc, du fait de faible rendement en cette HE obtenue par hydrodistillation.

Les bases algèbro-statistiques permettent à la MPE de connaître les évolutions des variables caractéristiques du procédé d'hydrodistillation de cette HE, leurs interactions et leurs influences sur les grandeurs étudiées.

Ce travail se situe dans le cadre d'une thèse de doctorat réalisée au sein du laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès et le laboratoire des plantes aromatiques, médicinales et substances naturelles à l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques.

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans ce double contexte d'étude :

- Utilisation de la méthode des plans d'expériences pour modéliser le processus d'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle de *P. lentiscus* afin de déceler les facteurs influents dans un premier temps et d'optimiser le rendement en HE de *P. lentiscus* par la suite.
- Utilisation de la méthode des plans de mélanges pour élaborer des formulations à base des HE en vue d'augmenter la sensibilité de certains micro-organismes pathogènes.

Nous tentons d'apporter des réponses à cette problématique dans cette thèse qui comprend six chapitres :

Une étude bibliographique est donnée dans la première partie. La deuxième partie constitue une première application de la MPE par un plan de criblage des facteurs susceptibles d'être influents sur le processus d'extraction par hydrodistillation de l'HE de *P. lentiscus*. Le plan proposé a pour but d'isoler les facteurs influents et d'examiner les effets principaux de ces facteurs. Le contenu de cette partie servira de base aux développements exposés dans les trois parties suivantes, où sont présentées différentes stratégies d'optimisation des facteurs jugés influents sur le rendement en HE de *P. lentiscus*.

A partir de l'étude de criblage, nous nous sommes orientés vers la troisième partie, qui constitue une étude de l'effet de l'individualité, dû aux conditions climatiques, d'une population de *P. lentiscus* sur le rendement en HE par ACP.

Toujours dans l'objectif d'améliorer le rendement en HE de *P. lentiscus*, une étude de l'effet du stade végétatif avant récolte et du séchage à l'air libre des feuilles de *P. lentiscus* extraction sur le rendement a eu lieu dans la quatrième partie.

Dans la cinquième partie, la méthode des surfaces de réponse est mise en œuvre pour élaborer un modèle descriptif et prévisionnel du processus étudié. Tout en tenant compte des informations ressorties dans les chapitres précédents, l'utilisation d'un plan composite nous a permis de faire une étude plus quantitative des facteurs étudiés (étude d'optimisation).

Enfin, une évaluation de l'activité antibactérienne de l'HE de *P. lentiscus* contre quatre souches bactériennes pathogènes a été présentée dans le sixième chapitre ainsi que l'effet des combinaisons binaires de l'HE de *P. lentiscus* avec d'autres HE sur cette activité, dans le but d'augmenter la sensibilité de ces bactéries en profitant des combinaisons des HE qui présentent des effets synergiques.

Cette étude nous a servie de base pour l'élaboration des formulations à activité antibactérienne intéressante, à partir des mélanges de trois HE, par la méthodologie des plans d'expériences (plans de mélange). L'intérêt de l'utilisation de ces plans réside dans le fait qu'il nous permet de mettre au point des formulations permettant d'estimer les interactions des composés des mélanges ainsi que d'effectuer des optimisations.

A. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES

I.1. Historique

Depuis la nuit des temps, la première préoccupation de l'Homme fut de satisfaire ses besoins en nourriture. Très vite, il dut lutter contre la maladie, face à laquelle il a cherché dans son environnement les plantes, les animaux ou les minéraux qui pouvaient le soulager [1]. Ceux qui découvrirent les premières plantes efficaces contre la douleur furent considérés comme les premiers guérisseurs [1]. Toutes les grandes civilisations anciennes (chinoise, grecque, romains, arabo-persane...) ont eu recours aux plantes pour leurs propriétés médicales et parfumantes ainsi que des utilisations rituelles [2]. La connaissance des plantes médicinales se transmet de génération en génération depuis plus de deux mille ans, par un apprentissage dans des sociétés de tradition orale. C'est alors que dans chaque région du monde que s'est échafaudé un système cohérent de croyances et de conception de la physiologie et de la pathologie du corps et de l'esprit où seront décrites les principes thérapeutiques pour rétablir la santé [1]. Au fur et à mesure du développement des civilisations, l'écriture véhicule ces savoirs thérapeutiques et ce n'est qu'en 1753 que le botaniste Suédois Carl Von Linné a établi un système international de nomenclature et de classification des plantes, accepté et reconnu par tous, par son ouvrage *Les espèces des plantes (Species Plantarum)* qui a donné la description et les noms de 5900 espèces [6] et qui a été considéré comme le point de départ de la nomenclature moderne.

I.2. Plantes aromatiques et médicinales au Maroc

Le Maroc, par sa diversité biogéographique avec 41 écosystèmes [3], constitue un cadre naturel tout à fait original offrant une gamme complète de bioclimats méditerranéens favorisant une flore riche et variée avec un endémisme très marqué [2]. Sur plus de 7000 espèces végétales existantes dont 4500 espèces de la flore vasculaires [4], plus de 800 espèces et sous espèces sont endémiques du pays. C'est ainsi que le Maroc s'individualise comme le pays le plus riche sur le plan globale de la biodiversité dans la portion occidentale de la zone méditerranéenne [5].

Cependant, sur les 800 espèces de PAM potentiellement exploitables, seule une dizaine l'est effectivement (romarin, thym, origan, câpre, pyrèthre...) [2]. Alors qu'un grand nombre de ces PAM dont certains offrent d'importantes potentialités pouvant être exploitées.

Il s'agit, par exemple, des espèces suivantes : *Erica arborea*, *Ammi visnaga*, *Myrtus communis*, *Pistacia lentiscus*... [5].

Ainsi, la valorisation de ce patrimoine souffre d'un manque de connaissances précises aussi bien sur les potentialités en biomasses de ces espèces végétales, sur la nature chimique et les caractéristiques biologiques de leurs extraits que sur la période optimale de la collecte de la matière première destinée spécialement à l'extraction des huiles essentielles [2].

I.3. Description de la plante étudiée - *Pistacia lentiscus* L.

I.3.1. Systématique

Tableau 1: Classification botanique de *P. lentiscus* L.

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Tracheobionta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Sapindales</i>
Famille	<i>Anacardiaceae</i>
Genre	<i>Pistacia</i>
Espèce	<i>Pistacia lentiscus</i> L.

I.3.2. Caractères botaniques et écologiques

Pistacia lentiscus L. appartient à la famille des *Anacardiaceae*, appelé aussi pistachier lentisque ou arbre à mastic. En arabe il est appelé : Derou, Tadis ou Meska et en berbère : Trù, Imeket ou Tiket [7].

C'est un arbrisseau sclérophylle à feuillage persistant, à odeur de résine fortement âcre et à croissance très lente. Dioïque, très ramifié, il peut atteindre jusqu'à 3 m, ou arbre jusqu'à 6 m, écorce grisâtre, branches les plus jeunes rougeâtres. Feuilles alternées, à rachis largement ailé, pennées impaires, composées de 2 à 3 paires de folioles coriaces, verts sombres qui sont largement lancéolées et de taille allant de 1,5 à 3 cm. Fleurs unisexuées. Le fruit est une drupe petite de 3 à 4 mm, rouge à noire (elle est de couleur rouge au début puis devient noirâtre à maturité à la fin de la saison hivernale) [8]. Si l'on incise le tronc de ce végétal, il s'en écoule un suc résineux nommé mastic qui, une fois distillé, fournit une essence employée en parfumerie. De part son houppier composé de branches denses, le lentisque assure la protection du sol et crée des conditions favorables pour l'humidification de la matière organique et l'enrichissement de ses propriétés biologiques. Il est classé parmi les plantes qui offrent d'importantes potentialités pouvant être exploitées dans l'immédiat comme plantes

aromatiques et/ ou médicinales sans qu'il y ait nécessité d'avoir recours à un programme de développement (les prélèvements raisonnés peuvent ne pas poser de problème de survie) [6]. Au Maroc, pays où le lentisque pousse de façon sauvage, il est exploité surtout sous forme de plantes séchées et d'huiles essentielles [9].



Figure 1 : Plante de *Pistacia lentiscus* L. (Haloui, 2013).

1.3.3. Habitat et aire de répartition géographique au Maroc

Originnaire du bassin méditerranéen, le lentisque pousse à l'état sauvage dans des forêts et maquis de la plaine et des basses montagnes [7]. L'air du lentisque embrasse tout le bassin méditerranéen. Il croît sur tous les types de sols [8]. On le rencontre dans tout le Maroc non aride, de Tanger à l'Anti-Atlas et de la côte atlantique à l'Algérie, dans les bioclimats semi-aride, subhumide, humide et per-humide : chaud à frais au niveau des étages infra méditerranéen et thermo méditerranéen [7]. Le lentisque est l'un des arbres les plus caractéristiques de la région méditerranéenne. C'est une espèce autochtone du Maroc [10].

1.3.4. Propriétés thérapeutiques et pharmacologiques

Les qualités thérapeutiques de cette espèce sont connues depuis l'antiquité, où les égyptiens ont utilisé le mastic du pistachier lentisque pour l'embaumement [11].

Le lentisque est la principale espèce productrice d'oléorésine qui est d'une immense importance économique et pharmaceutique [12]. Cette résine a des effets anti-inflammatoires et antimicrobiens et peut être bénéfique dans le traitement d'ulcère gastrique et duodéal [13].

L'huile essentielle de lentisque a révélé avoir des effets antibactériennes [14 ; 15], antifongiques [16], antioxydants [17] et insecticides [18]. Elle est également utilisée en cosmétique, parfumerie et comme arôme dans des préparations alimentaires [19].

II. HUILES ESSENTIELLES

II.1. Définition

Les huiles essentielles (HE) sont des produits de composition généralement complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et qui sont plus au moins modifiés au cours de la préparation [20]. Elles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs (huile de tournesol, de maïs, d'amande douce...). Selon l'Association française de normalisation (AFNOR), les huiles essentielles sont définies comme étant : « des produits obtenus à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par procédés mécaniques et qui sont séparées de la phase aqueuse par des procédés physiques, soit par distillation sèche. » [21].

II.2. Tissus sécréteurs

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles, classées parmi les métabolites secondaires, se font généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, des glandes sécrétrices, souvent localisées sur la surface de la plante [22-23]. Ainsi, les huiles essentielles sont synthétisées et stockées au niveau des cytoplasmes des cellules sécrétrices qui sont, soit éparpillées dans la plante soit organisées en éléments sécréteurs tels des poils, des poches ou des canaux sécréteurs [20]. Divers organes peuvent en renfermer des HE, à savoir : Fleurs (Lavandes), feuilles (citronnelle, eucalyptus), écorces (cannelles), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), fruits (Poivres) ou graines (Muscade) [24]. Certaines familles du règne végétal sont particulièrement riches en huiles essentielles : Conifères, Rutacées, Myrtacées, Umbellifères, Composées, Labiées [2].

II.3. Techniques d'extraction

Les huiles essentielles sont obtenues à partir de matière première végétale par plusieurs méthodes d'extraction. Ces méthodes peuvent être classées en deux catégories : méthodes conventionnelles / classiques et méthodes avancées / innovantes [25-26-27].

II.3.1. Méthodes conventionnelles et classiques

II.3.1.1. Distillation

Le mécanisme de distillation consiste à un entraînement des constituants volatils du matériel végétal par la vapeur d'eau [28]. La seule différence entre les différents modes de ce mécanisme réside dans le degré de contact direct entre l'eau et le matériel végétal [2]. Ainsi, plusieurs procédés de distillation sont employés pour extraire les huiles essentielles :

- Hydrodistillation ou distillation par l'eau :

L'hydrodistillation est la méthode la plus couramment employée pour l'extraction d'une HE [29]. Le matériel végétal à distiller se trouve en contact direct avec l'eau bouillante, à pression atmosphérique (fig. 2). L'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques, se ferait donc en deux étapes. Dans un premier temps, les huiles essentielles sont diffusées de l'intérieur des tissus vers la surface du matériel végétal. Les principes volatils sont ensuite entraînés, et, après condensation du distillat, ils sont séparés par simple décantation.

Les composés volatiles constituant les huiles essentielles sont retenues par des fractions lipidiques de la plante et en particulier par les hydrocarbures ce qui ralentit leur entraînement par la vapeur d'eau. C'est cette étape qui détermine la durée de la distillation [20].

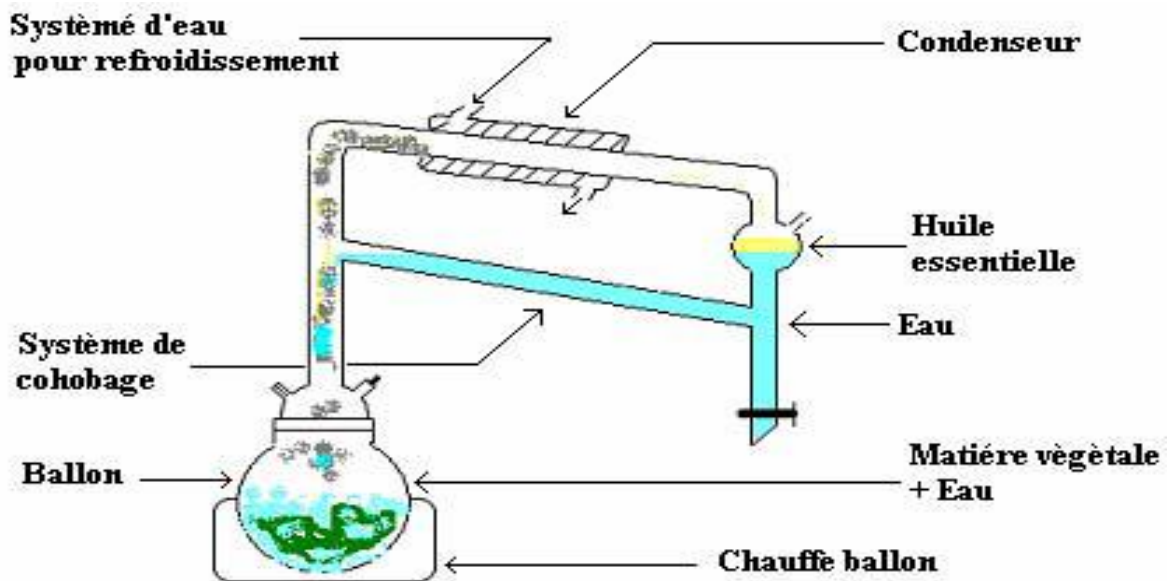


Figure 2 : Montage d'hydro-distillation des huiles essentielles.

- Vapo-hydrodistillation :

L'extraction est réalisée au sein d'un alambic avec un système de plaque perforée ou une grille qui maintient la plante suspendue au-dessus de la base de l'eau, pour éviter le contact direct de la plante avec l'eau. L'extraction se fait par injection de vapeur d'eau qui traverse la matière végétale de bas en haut et transporte les matières volatiles. Le temps d'extraction est réduit ainsi que la perte de molécules polaires (Figure 3a) [30].

- Vapodistillation ou distillation à la vapeur :

Cette méthode présente le même principe que la vapohydrodistillation, mais la génération de vapeurs se produit en dehors de l'alambic [31]. La vapeur d'eau peut alors être saturée ou surchauffée; à la pression atmosphérique un peu plus haut, la vapeur est introduite dans la partie inférieure de l'extracteur et traverse la charge de la matière première (Figure 3b) [32]

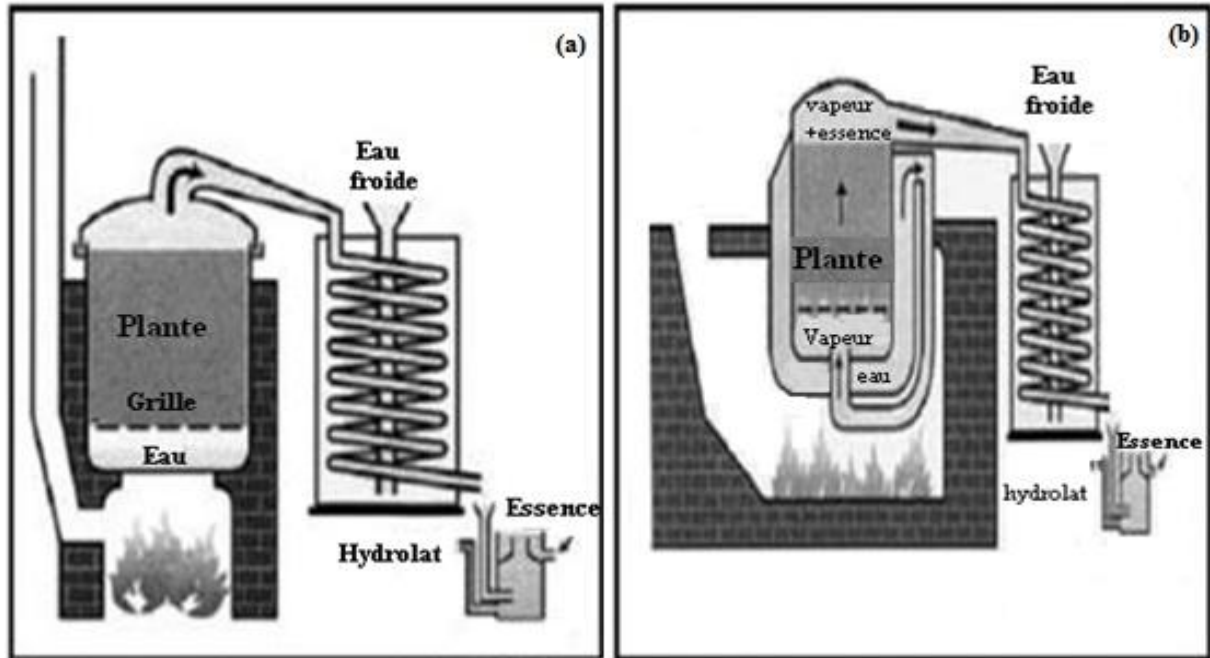


Figure 3 : Schéma de vapohydrodistillation des huiles essentielles (a) ; Schéma de vapodistillation des huiles essentielles (b).

- Distillation à hydrodiffusion :

Ceci est un cas particulier de la vapodistillation où le flux de vapeur d'eau traverse la matière végétale de bas en haut [30].

II.3.1.2. Extraction par expression

Le pressage à froid ou l'expression est le processus le plus ancien pour obtenir une huile essentielle [29]. Il est principalement utilisé pour l'isolement des huiles de zeste d'agrumes. Ces huiles sont enlevées mécaniquement par pressage à froid qui donne une émulsion aqueuse. L'huile est ensuite récupérée par centrifugation [33].

II.3.1.3. Extraction par solvant

Le matériel végétal est macéré dans un solvant organique. Le caractère hydrophobe et non polaire des huiles essentielles permet leur extraction par des solvants organiques [34]. L'extrait obtenu est concentré par la suite par élimination du solvant sous pression réduite.

II.3.2. Techniques innovantes d'extraction des huiles essentielles

Le développement de la notion d'extraction vert et la nécessité d'économie d'énergie ont conduit dans les dernières décennies à l'émergence de nouveaux procédés d'extraction innovantes et plus efficaces (réduction du temps de l'extraction et de la consommation d'énergie ; augmentation du rendement d'extraction ; amélioration de la qualité des HE).

II.3.2.1. Extraction assistée par Ultrason

L'utilisation de la technique d'ultrason avec des ondes ultrasoniques qui ont une fréquence de 20 kHz- 1MH, permet l'intensification de l'extraction des huiles essentielles en accélérant leur libération de la matière végétale lorsqu'il est utilisé en couplage avec d'autres techniques d'extraction (hydrodistillation ou extraction par solvant) [30]. Cette opération consiste à immerger la matière végétale dans l'eau ou un solvant, en même temps qu'elle est soumise à l'action d'ultrasons. Cette technique a été utilisée pour l'extraction de nombreuses huiles essentielles particulières à partir de graines [35]. Cependant, elle a été développée spécialement pour l'extraction de certaines molécules d'intérêt thérapeutique [36].

II.3.2.2. Extraction assistée par micro-onde

L'extraction assistée par micro-ondes (Figure 4) est un procédé récent. Cette technique utilise un rayonnement de micro-ondes comme source de chauffage pour le mélange solvant-échantillon [37]. Le chauffage est complètement inversé par rapport au chauffage conventionnel (basé sur un transfert de chaleur classique qui se transmet de l'extérieur vers l'intérieur du récipient). Le chauffage aux micro-ondes est instantané et se produit à l'intérieur de l'échantillon, conduisant à des extractions très rapides. Ainsi, les composés volatils sont entraînés uniquement par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante [38-39].

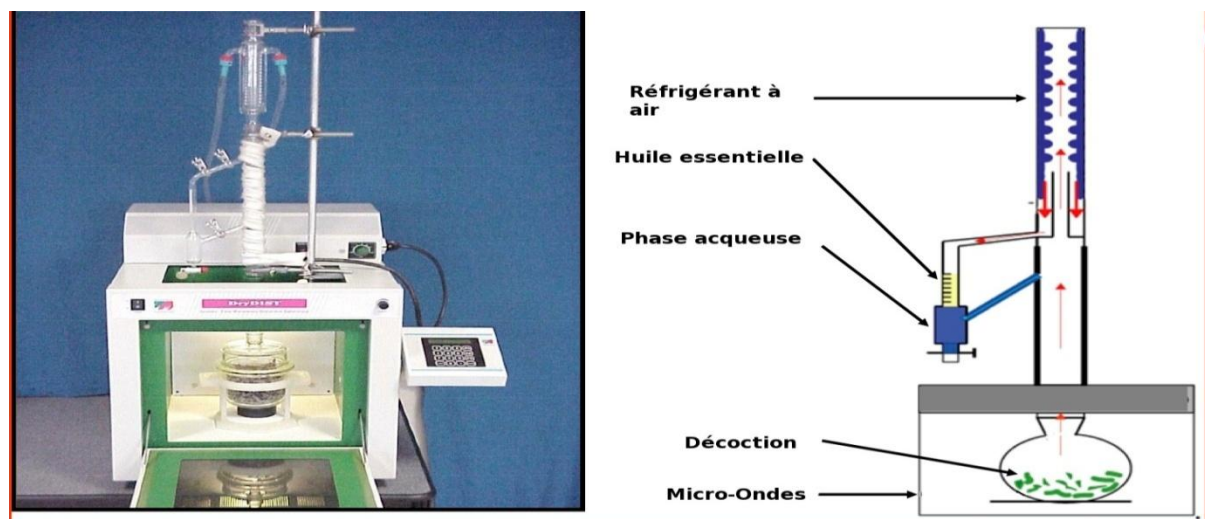


Figure 4 : Montage d'une distillation assistée par micro-onde des huiles essentielles.

II.3.2.3. Extraction par fluide supercritique

Cette méthode est basée sur l'utilisation de solvants à l'état supercritique, ce qui signifie qu'ils sont soumis à des températures et des pressions supérieures à leurs points critiques. Les fluides supercritiques ont des propriétés uniques, combinaison entre celles des gaz et des liquides, qui dépendent de la pression, de la température et de la composition du liquide (Figure 5). Ces fluides sont lourds comme un liquide, mais avec un pouvoir de pénétration d'un gaz, qualité qui les rend comme solvants efficaces et sélectifs [40]. CO₂ supercritique est le gaz de choix pour augmenter le rendement dans le cas de plantes peu riches en huiles essentielles. D'une part, le fait qu'il s'évapore complètement, ne laissait aucune trace toxique dans l'HE, d'autre part, il permet un fonctionnement à des pressions relativement faibles et proches de la température ambiante [20-28].

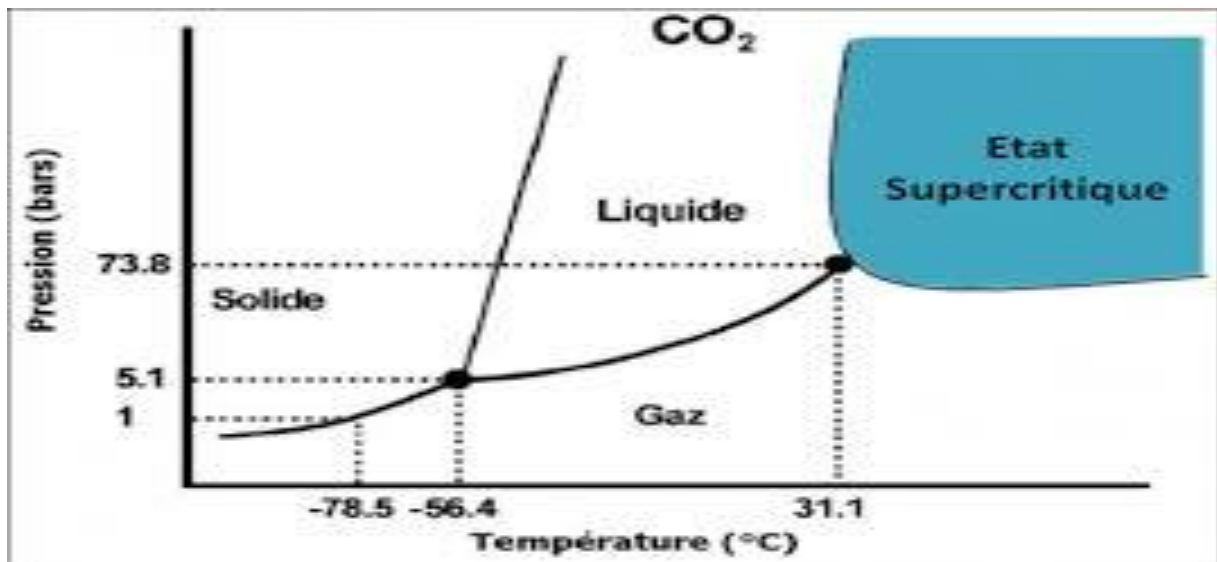


Figure 5 : Diagramme de phase de CO₂.

II.3.2.4. Extraction par la détente instantanée contrôlée

Cette technique se caractérise principalement par une forte chute de pression, à la suite d'un traitement thermique (haute température et haute pression à court terme). Le phénomène d'auto-vaporisation brusque qui accompagne la détente implique la séparation liquide-solide et permet donc l'évaporation d'une plus grande quantité de molécules volatiles comparée à l'auto-vaporisation progressive (Figure 6) [20], ainsi que l'atteinte rapide d'un niveau inférieur de température [41]. Cette opération se caractérise par une consommation énergétique particulièrement faible et un très bon impact environnemental.

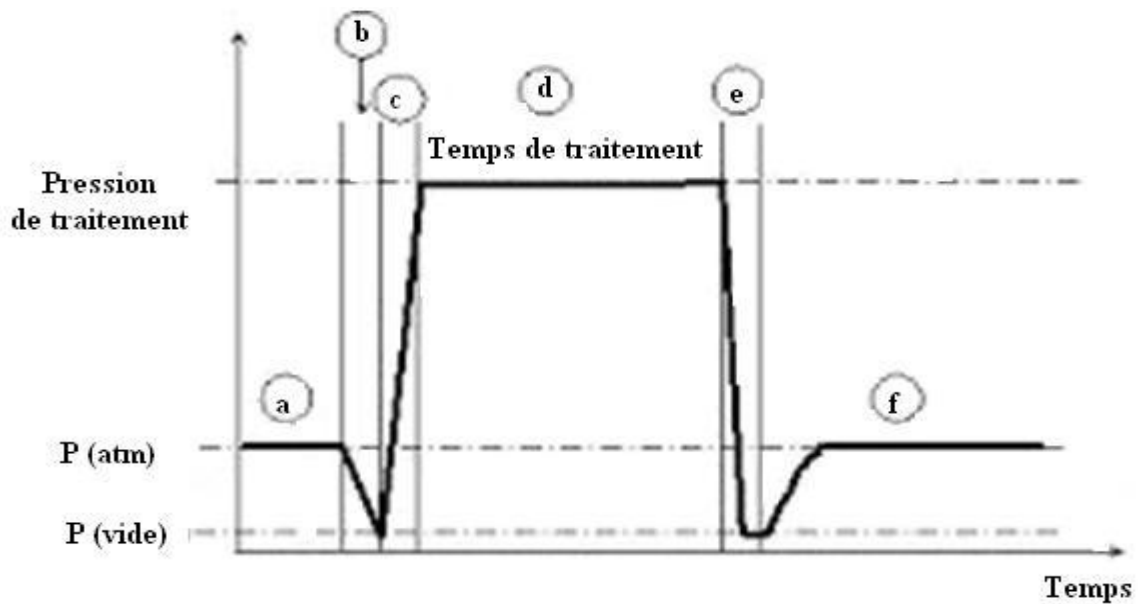


Figure 6 : Evolution des profils pression-temps durant le prétraitement des PAM

(a): Echantillon à pression atmosphérique ; (b): Vide initial. (c): Injection de vapeur d'eau saturante ; (d): Temps de prétraitement à pression fixée ; (e): Détente rapide vers le vide ; (f): Pression atmosphérique et récupération du produit.

II.4. Détermination du rendement

Le rendement des plantes en HE est faible, de l'ordre de 1 à 3% à l'exception du clou de girofle (14 à 19%), du macis (10 à 13%), de la noix de muscade (8 à 9%) et de la cardamome (4 à 10 %) [2-20]. Le rendement en huiles essentielles est exprimé en ml de distillat pour 100g de matière sèche comme suit (éq.1):

$$\text{Rdt} = \frac{M_{HE}}{M_S} \times 100 \quad \text{éq. 1}$$

Avec : Rdt : rendement en huiles essentielles en (%) ; M_{HE} : masse d'huile essentielle recueillie en (g) et M_S : masse de la matière végétale sèche en (g).

II.5. Méthodes d'analyses

L'analyse des huiles essentielles est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques. La première approche, qui est la plus couramment employée, est l'utilisation du couplage d'une technique chromatographique avec une technique spectrométrique.

II.5.1. Chromatographie en Phase Gazeuse

C'est une technique d'analyse par séparation qui s'applique à des échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans décomposition dans l'injecteur [42].

La chromatographie en phase gazeuse repose, comme toute méthode chromatographique, sur la rétention des analytes sur une phase stationnaire qui s'oppose à l'entraînement de ces derniers par une phase mobile.

La phase mobile est alors un gaz (hélium, azote ou hydrogène), appelé gaz vecteur, qui balaie en permanence la colonne. Cette dernière, placée dans un four thermostat, est un tube de faible section enroulé sur lui-même et contenant la phase stationnaire (Figure 7). Le large choix d'injecteurs, de colonnes et de détecteurs la rend flexible et bien adaptable au problème analytique en question [42-43].

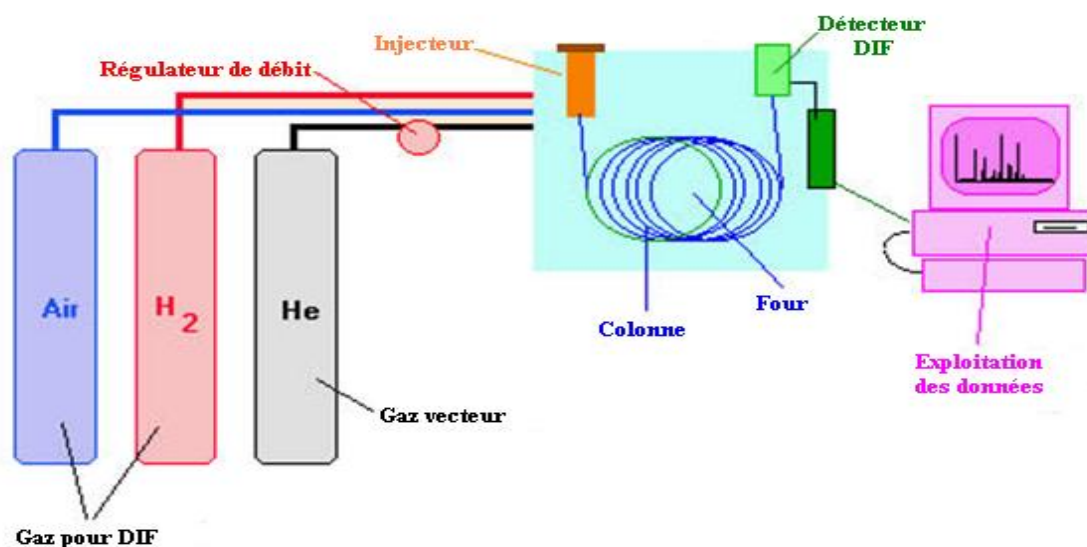


Figure 7: Schéma d'un appareil d'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

II.5.2. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (SM) utilise le mouvement des ions dans les champs électrique et magnétique afin de les classer en fonction de leur rapport masse/charge.

Ainsi, la SM est une technique analytique par laquelle les substances chimiques sont identifiées par classement des ions gazeux dans les champs électrique et magnétique. La SM fournit des informations qualitative et quantitative sur la composition atomique et moléculaire des matériaux inorganique et organique [20-42].

II.5.3. Couplage Chromatographie en Phase Gazeuse / Spectrométrie de Masse

Le couplage entre ces deux techniques permet d'associer systématiquement les données spectrales obtenues à l'utilisation des indices de rétention, qui sont calculés à partir des temps

de rétention d'une gamme étalon d'alcane [20]. La simplicité du couplage entre ces deux techniques, les progrès accomplis dans le traitement en temps réel du signal, la constitution de banques de données de spectres de masse et le développement des algorithmes de comparaison entre le spectre d'un composé inconnu avec ceux répertoriés dans la banque sont à l'origine de la généralisation de l'usage de la CPG/SM dans les laboratoires d'analyse des composés aromatiques. La CPG sur colonne capillaire constitue une excellente méthode d'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse. Ainsi, la colonne capillaire est directement couplée à la source d'ions permettant l'ionisation des constituants. Il existe deux modes d'ionisation : l'ionisation chimique (IC) et l'ionisation par impact électronique (IE). Ce dernier mode est le plus utilisé dans le domaine des huiles essentielles. Il permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation. Le principe de la CPG/SM (IE) réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) (Figure 8). L'ordinateur enregistre les données provenant du spectromètre de masse et les convertit en valeurs de masses et d'intensités de pics et en courant ionique total [44-45].

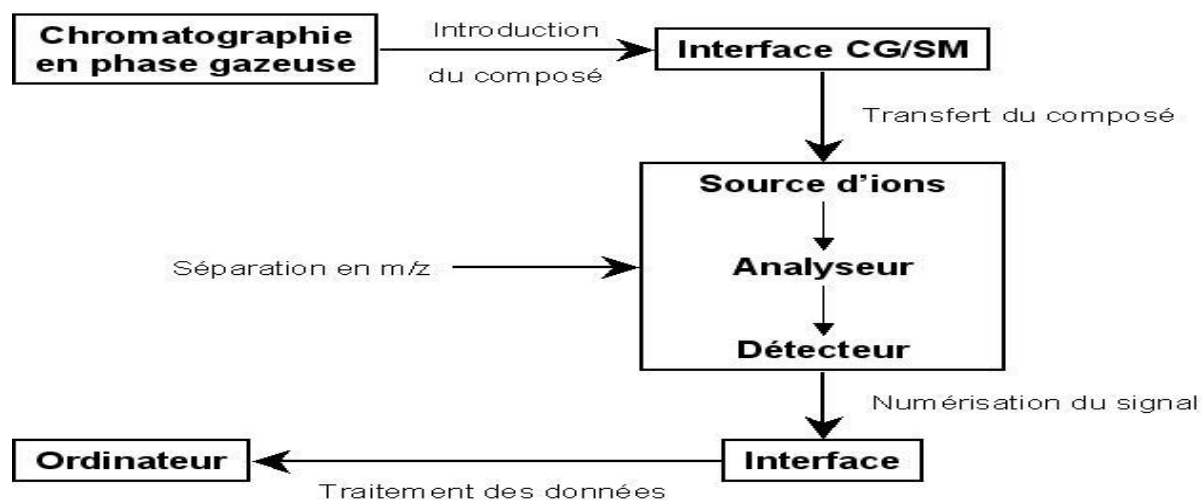


Figure 8 : Schéma du fonctionnement d'un appareil d'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CPG/ SM.

Les spectres de masse ainsi obtenus sont ensuite comparés avec ceux de produits de références contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles (NIST/ EPA/ NIH Mass Spectral Library [46], Wiley Registry of Mass Spectral Data [47], Adams [48]).

II.6. Techniques d'encapsulation

Durant les dernières décennies, les exigences des consommateurs de l'industrie de production alimentaire ont remarquablement augmenté. Les gens ne voient plus la nourriture seulement pour apaiser la faim, mais comme une source pour obtenir les nutriments nécessaires qui sont censés aider contre les maladies. Cette tendance a forcé les chercheurs alimentaires et les producteurs à se concentrer davantage sur la production d'aliments qui répond aux exigences de l'Homme pour une vie plus saine. Les nouvelles technologies sont adoptées en particulier pour surmonter le problème de la détérioration de la substance active. Ces techniques relativement plus avancées sont basées sur l'idée d'enrober le composé actif désiré. Certaines des techniques de piégeage sont des micro-encapsulations où le revêtement est avec des films comestibles ou imprégnés sous vide.

L'encapsulation est définie comme étant le processus de piéger une substance en une autre substance dans le but de produire des particules à l'échelle nanométrique (nano-encapsulation), micrométrique (micro-encapsulation) ou à l'échelle millimétrique [49].

En raison de la forte volatilité et sensibilité des huiles essentielles contre les effets environnementaux, ces produits ont besoin de nouvelles mesures de protection, en particulier pour augmenter leur absorption et biodisponibilité. Ainsi, l'encapsulation est l'une des techniques les plus efficaces pour les préserver.

L'encapsulation des HE consiste à enfermer ces substances dans des capsules, dont l'objectif est soit de protéger les HE contre des interactions avec le milieu extérieur (la protection des HE de la dégradation résultant des températures élevées et à l'oxydation qui pourraient compromettre l'activité biologique des HE fragiles par volatilisation ou la dégradation des ingrédients actifs) ou bien de transporter la substance jusqu'à l'endroit où elle sera libérée pour agir. Selon la taille des capsules, on parle de micro-encapsulation (dimension de l'ordre du micromètre) ou de nano-encapsulation (dimension de l'ordre du nanomètre).

Plusieurs techniques d'encapsulation peuvent être utilisées : Atomisation, coacervation, émulsification, extrusion, encapsulation dans des liposomes... [50; 51; 52; 53; 54; 55].

II.7. Propriétés fondamentales

Depuis des millénaires, les huiles essentielles sont employées pour guérir des maladies. A mesure que les études et les expériences s'accroissent, les principales propriétés de la plupart des huiles essentielles se sont connues [56 ; 57] :

- Antiseptiques, antimicrobiennes, antifongiques et antivirales : les huiles essentielles ont une double action contre les microorganismes, elles peuvent les tuer (effets bactéricides/fongicides) ou bien les inhiber (effet bactériostatique/fongistatique). Les virus sont aussi très sensibles aux molécules aromatiques contenues dans les huiles essentielles, ce qui confère à ces derniers des capacités contre certaines pathologies d'origine virales. Certains huiles essentielles arrêtent le développement des virus et facilitent l'élimination du mucus tout en stimulant le système immunitaire [58].
- Anti-inflammatoires : les aldéhydes contenus dans un grand nombre d'huiles essentielles ont la propriété de calmer les inflammations [59].
- Antitoxiques et antivenimeuses : certaines huiles essentielles sont dotées d'un pouvoir d'inactivation des produits toxiques en se liant aux toxines et les désactivant, aussi elles contribuent à neutraliser le venin (par exemple la lavande ou le géranium) [58].
- Cicatrisantes : certaines huiles essentielles présentent des propriétés cicatrisantes reconnues depuis l'antiquité et utilisées pour soigner les blessés. Leur pouvoir antiseptique leur permet de désinfecter en même temps les plaies, en protégeant l'organisme des processus de décomposition, des microbes et de leurs éventuels déchets nocifs [59].
- Régulation métabolique : certaines huiles essentielles ont la capacité de réguler l'action des glandes [59].
- Antispasmodiques : les huiles essentielles de marjolaine, de lavande ou de mélisse peuvent arrêter les spasmes. C'est-à-dire les contractions qui se manifestent de façon involontaire dans le corps [59].
- Pouvoir bioélectrique : ce pouvoir a été mis en évidence par Louis-Claude Vincent [60], avec ses 3 mesures fondamentales (qui sont recherchées à partir des liquides physiologiques : salive, sang et urine) :
 - Le pH qui, pour les huiles essentielles, est presque toujours acide,
 - L'oxydo-réduction, ce paramètre indique la concentration en électrons dans une solution, c'est-à-dire le potentiel oxydant ou réducteur d'une solution. Or, les HE sont presque toujours des solutions réductrices s'opposant à l'oxydation,
 - La résistance ionique, ce paramètre exprime la résistance qu'un système offre au passage d'un courant électrique. Plus une solution aqueuse contient d'ions en solution, mieux elle conduit le courant, donc plus sa conductivité est élevée. Les HE redonnant ainsi la vitalité aux organismes.
- Toxicité : Les HE contiennent des milliers de composants, elles sont très efficaces mais aussi dangereuses. Certains composants aromatiques peuvent être nocifs, allergisants,

tératogènes ou cancérigènes. La toxicité des HE et les propriétés mutagènes ou cancérigènes de leurs composés restent encore mal connues. En effet, la toxicité des PAM dépend de la nature des composés qu'elles renferment et aussi de la dose administrée [20].

Une huile essentielle peut avoir à la fois plusieurs actions : antiseptique, diurétique, tonique, antispasmodique, antirhumatismale, antitussive, apéritive... et ceci du fait de ses éléments chimiques variés. Cependant, elle possède une indication majeure due à l'importance éminente d'un principe actif [20].

II.8. Domaines d'utilisation

II.8.1. Aromathérapie

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les HE pour traiter un certain nombre de maladies. Les HE sont largement utilisées pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux) [61; 62]. Beaucoup d'ouvrages décrivent des préparations à base d'HE diverses prescrites pour le traitement de plusieurs maladies [59; 63]. Cependant, ces prescriptions ne possèdent pas toujours de bases scientifiques rigoureuses, car elles sont souvent tirées de pratiques empiriques [64].

II.8.2. Industrie alimentaire

En industrie alimentaire, on cherche toujours à avoir une conservation saine et de longue durée pour les produits consommés ainsi qu'une qualité organoleptique meilleure. Une nouvelle technique pour réduire la prolifération des micro-organismes réside dans l'utilisation des HE [65; 66]. Ainsi, les HE sont utilisées dans la conservation des denrées alimentaires, elles y sont rajoutées pour rehausser le goût et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires.

II.8.3. Parfumerie et cosmétologie

Un grand nombre d'HE et de leurs constituants est utilisé dans l'élaboration de la majorité des parfums et produits de toilette. Ces essences servent à préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique tout en leur assurant leur odeur agréable [2; 20]. Un grand nombre d'HE est utilisé dans l'élaboration de la majorité des parfums et produits de toilette. Aussi, l'utilisation des HE dans les crèmes et les gels permet de préserver ces cosmétiques grâce à leurs activités antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable [67; 68; 69; 70].

II.8.4. Désinfection des locaux

L'utilisation des HE dans la désinfection des locaux est assez courante. Elles sont douées d'un pouvoir bactéricide et fongistatique sans aucune toxicité pour l'Homme quant aux doses utilisées [71]. Ainsi, on peut envisager leur utilisation en tant qu'agents de préservation afin d'aseptiser l'atmosphère avec des ionisateurs d'huiles essentielles dans les systèmes de climatisation, notamment dans le milieu hospitalier. Créant de l'oxygène naissant ionique, fortement bactéricide, tout en contribuant à dépolluer l'atmosphère [72].

II.9. Aspect économique

II.9.1. Marché international

Les plantes médicinales restent le seul moyen de traitement médical pour 80 % de la population mondiale [2]. La valorisation économique des PAM connaît un développement important sur le plan international, surtout avec la mondialisation et les libres échanges. A l'échelle internationale, le secteur des PAM est marqué par un mouvement d'internationalisation et de regroupement des petites unités industrielles en firmes multinationales. Plus de 50% du marché mondial, estimé à 9,5 milliards de dollars, est actuellement entre les mains de six entreprises multinationales représentant 5 pays : USA, la Suisse, la France, l'Allemagne et le Japon [73]. La production mondiale des HE est de 45 000 tonnes. Les principaux marchés de consommation sont les pays développés (Europe, Japon et Amérique du Nord) qui représentent 80% des débouchés mondiaux.

Tableau 2 : Marché mondial des huiles essentielles [73].

Marché Lieu	Marché mondial (En milliards d'euros)	Part des Importations	Part des Exportations
Europe de l'Ouest	35	49%	65%
Etats-Unis & Canada	35	-	15%
Japon	14	-	5%
Europe de l'Est	5	8%	2%
Méditerranée	2	3%	1%

II.9.2. Marché Marocain

Le marché des produits tirés de ces plantes a connu au Maroc une croissance en quantité mise en vente sur le marché. Le marché local pour les HE est loin d'être négligeable.

Cependant, presque toute la production dans ce domaine est destinée à l'exportation et presque tous les produits consommés localement sont importés.

Le marché local, et particulièrement au niveau des zones de production, connaît de multiples difficultés dues notamment à la prédominance du secteur informel et manque d'organisation des circuits de production, de distribution et de commercialisation.

Les activités de transformation et de valorisation des PAM permettent une exportation de près de 1000 tonnes d'HE avec 165 millions de Dhs. Vu son potentiel, le Maroc peut facilement doubler sa production [73]. Les exportations en valeurs des huiles essentielles des PAM spontanées sont en progression. Elles sont passées de 56 millions de Dhs en 2000 à 112,4 millions Dhs en 2003 [74]. Sur le plan socio-économique, la collecte des PAM constitue un moyen pour diversifier la production agricole et demeure une activité génératrice de revenus pour les populations rurales locales. Cette activité procure à la population locale environ 500 000 journées de travail pour un revenu de 25 millions de Dhs et génère des recettes d'appoint pour les communes rurales [75].

Parmi les plantes couramment utilisées dans la production des huiles essentielles et extraits aromatiques au Maroc on trouve : Le romarin, l'armoise, le cèdre de l'Atlas, le myrte, thym à thymol, le thym doux du Maroc - thym à Bornéol, le laurier sauce, l'origan du Maroc, la mousse de chêne, la mousse de cèdre, la camomille sauvage du Maroc, la menthe pouliot, etc. Des produits nouveaux ont été récemment introduits sur le marché tel que la "camomille bleue du Maroc" ou "tanaisie bleue du Maroc", *L'Ammi visnaga* est un autre produit nouveau qui cherche encore une place sûre dans le marché international des huiles essentielles. Sur l'ensemble des huiles essentielles le romarin occupe la première place avec une moyenne annuelle de 58 tonnes [74].

III. ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

III.1. Mécanisme et sites d'action antibactérienne des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des produits de composition généralement complexe, renfermant des métabolites secondaires représentés par des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de leur extraction. Les huiles essentielles (HE) sont biosynthétisées par les végétaux supérieurs en réponse à des conditions de stress et surtout pour combattre les agents infectieux ou parasitaires [76].

Les vertus antimicrobiennes des HE sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises [77].

De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles. De nombreux travaux de recherche se portent sur les propriétés antimicrobiennes des HE [78, 79].

Durant les dernières années, un intérêt accru s'est focalisé sur les substances biologiquement actives isolées des plantes, notamment en vue de l'élimination des micro-organismes pathogènes en raison de la résistance de ces derniers vis-à-vis des antibiotiques. De plus, elles ont un champ d'action très large [80].

Bien que les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et de leurs composants aient été largement étudiées par le passé, le mécanisme d'action n'a pas été élucidé entièrement [81]. Compte tenu du nombre de différents groupes de composés chimiques présents dans les HE, il est probable que leurs activités antibactériennes ne soient pas attribuées à un mécanisme spécifique mais qu'il y ait plusieurs cibles dans la cellule [82]. Ainsi, la structure chimique des constituants des HE conditionne leur mode précis d'action antibactérienne [83].

Une caractéristique importante des huiles essentielles et de leurs constituants est leur caractère hydrophobe, ce qui leur permet de s'insérer dans les couches lipidiques de la membrane cellulaire bactérienne et des mitochondries, perturbant les structures et les rendant plus perméables (Figure 9). La fuite des ions et autres constituants de la cellule peut alors se produire [81].

Bien qu'une certaine proportion de fuite de cellules bactériennes puisse être tolérée sans perte de viabilité, une perte importante du contenu de la cellule ou la sortie de molécules essentielles et d'ions peut amener la mort bactérienne [84].

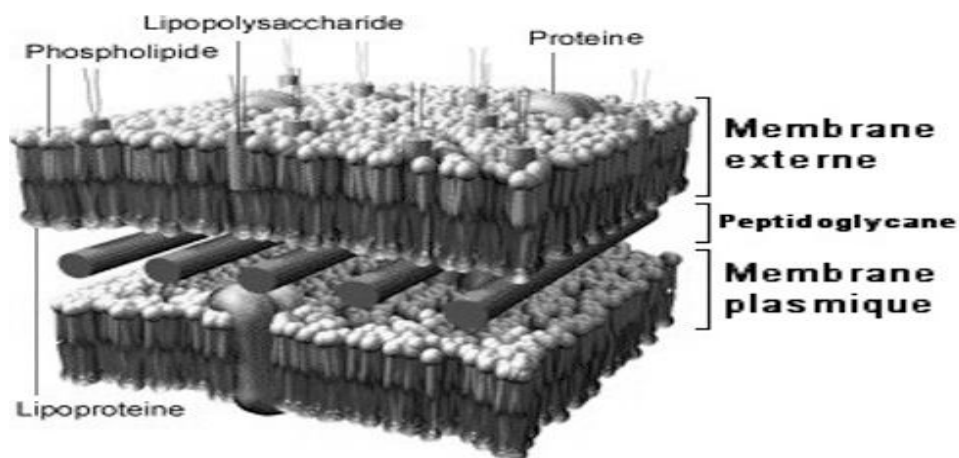


Figure 9 : Paroi bactérienne (bactérie Gram négative).

Les principaux mécanismes et sites d'action des différents constituants des huiles essentielles sont (Fig.10) [81, 85, 86, 87, 88]:

- Altération de la paroi cellulaire;
- Dégradation de la membrane cytoplasmique;

- Altération des protéines membranaires;
- Fuite du contenu cellulaire;
- Coagulation du cytoplasme;
- Epuisement de la force de mouvement des protons.

La figure (10) indique les principales localisations des sites d'action des constituants des huiles essentielles.

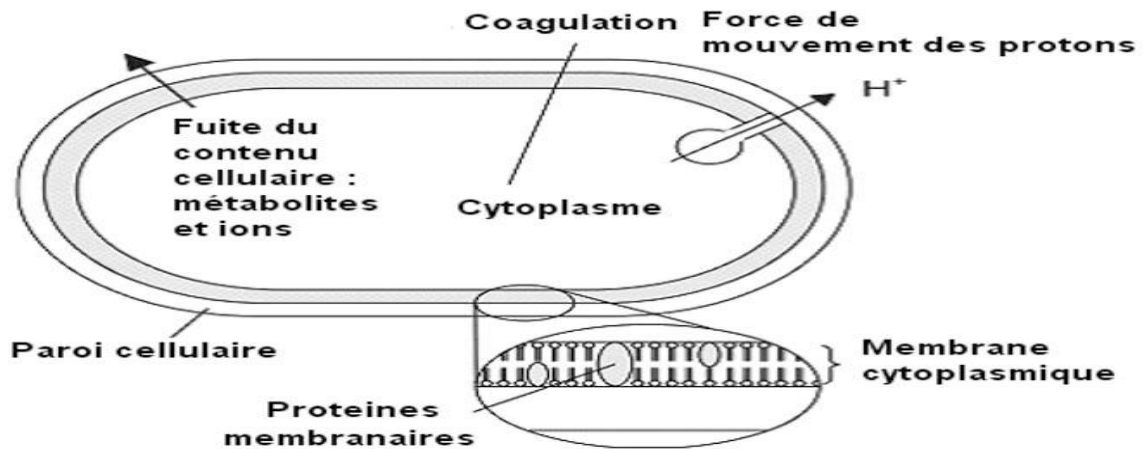


Figure 10 : Principales localisations des sites d'action des constituants des huiles essentielles.

III.2. Action de différentes classes de constituants des huiles essentielles

L'activité antimicrobienne des HE est principalement due à leur composition chimique et en particulier à la nature de leur composé majoritaire, dans la plupart des cas, cette activité est due à la présence de constituants actifs représentés principalement par des monoterpènes, des sesquiterpènes, des alcools et autres hydrocarbures et phénols [89].

En effet, il est admis que l'activité antimicrobienne des HE se classe dans l'ordre décroissant suivant la nature de leur composés majoritaires : Phénol > alcool > aldéhyde > cétone > hydrocarbures. L'effet des composés quantitativement minoritaires n'est parfois pas négligeable [90].

III.2.1. Action des phénols

Les composés de structures phénoliques, tels que le carvacrol, l'eugénol et le thymol, sont très actifs contre les micro-organismes testés. Les membres de cette classe sont connus pour être des agents bactériostatiques ou bactéricides, en fonction de la concentration utilisée.

Ces composés sont fortement actifs malgré leur capacité relativement faible de se dissoudre dans l'eau [81]. En général, les HE possédant les propriétés antibactériennes les plus importantes contiennent un pourcentage élevé des composés phénoliques tels que le carvacrol, l'eugénol et le thymol [91; 92]. Leur mécanisme d'action serait lié à la perturbation de la

membrane cytoplasmique, entraînant celle de la force de mouvement des protons, du flux d'électrons, du transport actif et de la coagulation du contenu de la cellule [81].

III.2.2. Action des alcools

Les alcools sont connus pour posséder un pouvoir bactéricide plutôt qu'une activité bactériostatique.

Les alcools terpéniques comprennent certaines des composantes les plus antimicrobiennes des huiles essentielles. Leur activité peut être attribuée à la partie alcool, qui a une activité antimicrobienne intrinsèque et améliore la solubilité de ces composants. En termes de structure, les alcools terpéniques peuvent être acycliques (linéaires) ou cycliques et peuvent être mono-, di- ou sesquiterpènes.

Les alcools terpéniques exercent une activité vis-à-vis de diverses souches bactériennes, leur action s'exerçant potentiellement tout comme les agents dénaturants des protéines tels que les solvants et les agents de déshydratation [81].

III.2.3. Action des aldéhydes

Les aldéhydes sont connus pour posséder une activité antimicrobienne puissante. Il a été proposé qu'un groupement aldéhyde conjugué à une double liaison carbone-carbone, est un enchainement très électronégatif, ce qui peut expliquer son activité [93]. Ceci suggère qu'une augmentation d'électronégativité augmente l'activité antibactérienne. Ces composés électronégatifs peuvent interférer dans les processus biologiques impliquant des électrons de transfert et réagir avec des composés azotés essentiels, tels que les protéines et les acides nucléiques et donc inhiber la croissance des micro-organismes [81].

III.2.4. Action des cétones

La présence d'une fonction cétone augmente les propriétés antimicrobiennes des terpénoïdes. La carvone est susceptible d'altérer le gradient de pH et le potentiel de la membrane cellulaire. Elle agit par perturbation de l'état énergétique du métabolisme des cellules. En revanche, elle est sans effet sur la membrane externe et n'affecte pas le pool de l'ATP intracellulaire [94].

III.2.5. Action des hydrocarbures

Le groupe hydrocarbure terpénique contient des composés qui sont essentiellement non oxygénés monoterpènes ou sesquiterpènes, qui peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. La majorité d'eux sont insaturés, ce qui signifie qu'ils contiennent une ou

plusieurs doubles liaisons. L'absence de partie alcool ou autre oxygénation signifie généralement que ces composants sont parmi les moins solubles dans l'eau.

Les hydrocarbures terpéniques monocycliques sont un groupe important de composants que l'on trouve dans un grand nombre de différentes huiles essentielles.

Les hydrocarbures sont connus pour avoir un rôle clé dans l'action antimicrobienne grâce à leurs interactions avec les structures hydrophobiques de la bactérie.

En ce qui concerne les constituants non phénoliques des HE, le type de groupement alkyle semble influencer l'activité. Il semble également que ces constituants des HE agissent sur les protéines cellulaires insérées dans la membrane cytoplasmique (des enzymes comme les ATPases sont connues pour être situées dans la membrane cytoplasmique et être entourées par les molécules lipidiques) [95].

III.3. Techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne

Compte tenu du grand nombre d'espèces de PAM potentiellement disponibles pour l'étude, il est essentiel d'avoir des systèmes efficaces de méthodes pour évaluer l'efficacité de ces PAM comme agent antimicrobien. L'évaluation de l'agent antibactérien d'origine végétale commence par l'évaluation biologique approfondie des extraits de plantes pour assurer l'efficacité suivie de l'identification de principes actifs ainsi que les formulations de dosages et le profil pharmacocinétique de l'extrait végétale [96].

Les différents protocoles d'évaluation de l'activité antibactérienne peuvent être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'HE et selon la nature du contact de l'HE avec le germe. À l'heure actuelle, l'activité antibactérienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. Ces techniques sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur.

Les tests de sensibilité aux antimicrobiens (AST) sont des techniques essentielles en science biologique moderne. Pour plus de commodité, les tests standards d'AST sont classés en méthodes de diffusion et méthodes de dilution [97] :

- Méthodes de diffusion :
 - Test de diffusion sur disque [98; 99];
 - Test de micro-atmosphère [100];
 - Test de diffusion en puits [101; 102].

- Méthodes de dilution :
 - Test de macro-dilution en bouillon [103];
 - Test de micro-dilution [104].

III.4. Souches bactériennes étudiées

III.4.1. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis appartient à la famille des *Bacillaceae*, c'est une bactérie Gram positif. Elle a pour forme cellulaire des bâtonnets droits à bout arrondis. C'est une espèce que l'on trouve habituellement dans le sol, mais c'est surtout une espèce ubiquitaire. Elle est aérobic stricte, mésophile et chimio-hétérotrophe. Comme d'autres espèces, *B. subtilis* peut se constituer une coque protectrice dure (endospore) lui permettant de tolérer des conditions environnementales difficiles ou extrêmes.

B. subtilis a été largement utilisée dans l'agriculture pour la promotion de la croissance des végétaux et la lutte biologique, car elle a un effet inhibiteur à large spectre contre divers agents pathogènes. Diverses souches de *B. subtilis* ont la capacité de synthétiser des composés de type lipopeptide et des antibiotiques. Certains ont aussi le potentiel d'être utilisée comme pesticide biologique. Cependant, aucune information concernant sa formulation pour un usage commercial n'est disponible [105].

Elle n'est pas considérée comme pathogène pour l'Homme, mais elle peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire. Elle est considérée en microbiologie comme modèle des bactéries gram positive qui a permis d'établir les voies du métabolisme cellulaire et la régulation cellulaire.

III.4.2. *Staphylococcus aureus*

Les Staphylocoques constituent avec les microcoques les deux genres principaux de la famille de *Micrococcaceae*. Ce sont des cocci à Gram positif, non sporulés, immobiles, se divisent en plusieurs plans en amas irréguliers. Elles produisent une catalase. Leurs parois sont principalement constituées de peptidoglycane. Elles sont essentiellement des parasites saprophytes de l'Homme et de l'animale. Certaines espèces sont pathogènes opportunistes pour l'Homme et l'animal. *S. aureus* est la plus virulente [106].

S. aureus élabore un pigment caroténoïde qui donne aux colonies une coloration jaune ou orange d'intensité très variable selon les souches. Ce caractère peut ne pas s'exprimer ou être au cours des repiquages. *S. aureus* se rencontre aussi bien chez l'Homme que chez l'animal.

On distingue des porteurs sains occasionnels ou intermittents permanents. Les fosses nasales constituent le réservoir principal du germe. Ce germe peut provoquer des infections localisées ou générales ou encore des maladies liées à la production de toxines.

L'espèce *S. aureus* est homogène sur le plan taxonomique mais elle peut être séparée en plusieurs biotypes spécifiques ou non spécifiques d'hôtes [106].

III.4.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Le genre *Pseudomonas* est le genre type de la famille des *Pseudomonaceae* dont les principaux caractères sont : bâtonnets droits ou incurvés, mobiles par flagelle(s) polaire(s), Gram négatif. Bactéries chimio-organotrophes, leur métabolisme est respiratoire et jamais fermentaire. Elles ne fixent pas l'azote. Leur croissance est possible sur de nombreuses composées organiques comme seules sources de carbone et d'énergie. Aérobie strictes, la croissance des *Pseudomonas* est possible de 4 °C à 43 °C [106].

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie ubiquitaire très résistante, vivante dans les sols et en milieu humide. Les formes pathologiques qu'elle engendre sont très diverses. Elle apparaît aujourd'hui comme un pathogène majeur au sein des établissements de santé, où il est responsable de 10 % des infections nosocomiales, ce taux augmentant jusqu'à 15 % dans les services de réanimation [107]. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement.

Ce germe est doté de très grandes capacités d'adaptation, capable de développer toute une variété de mécanismes de résistance aux antibiotiques : sécrétion de pénicillinases, de céphalosporinases, mutations d'imperméabilité, modification des porines. L'une de ses capacités originales est la sécrétion d'un biofilm d'alginate, le rendant peu accessible aux défenses immunitaires et aux antibiotiques. C'est pourquoi *P. aeruginosa* est impliqué dans des pathologies multiples : infections respiratoires au cours de la mucoviscidose ou du sida, pneumopathies nosocomiales en réanimation, infections urinaires, endocardites, septicémies... [108].

III.4.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est un hôte commun du microbiote intestinal de l'Homme et de certains animaux.

E. coli est une bactérie commensale du tube digestif qui constitue tout au long de la vie de l'hôte l'espèce bactérienne dominante de la flore aérobie facultative intestinale (qui compose 80 % de la flore intestinale, elle y est donc naturellement présente).

Elle empêche d'autres souches de bactéries pathogènes de coloniser la flore intestinale. *E. coli* est associée à une grande variété de maladies intestinales chez l'Homme et animaux. En plus

de son rôle dans les infections gastro-intestinales, elle peut aussi causer des infections systémiques. Ainsi, *E. coli* est une espèce au sein de laquelle on retrouve à la fois des souches commensales, colonisant les individus sains, et des souches ayant acquis des facteurs de virulence. Ces dernières sont capables d'induire différents signes cliniques [109].

Les *E. coli* à l'origine de pathologies intestinales ont en commun de se multiplier dans l'intestin de leurs hôtes. Ils se retrouveront donc dans les fèces et par la suite dans les effluents qui drainent ces fèces.

Les *E. coli* à l'origine de pathologies extra Intestinales ont acquis la capacité à dépasser les défenses immunitaires de leur hôte, et à se propager dans l'organisme. Elles peuvent induire chez leurs hôtes des infections du tractus urinaire, des méningites néonatales ou des septicémies [109]. *Escherichia coli* est sans doute l'organisme vivant le plus étudié à ce jour.

IV. PLANS D'EXPERIENCES

IV.1. Notions de plan d'expériences

IV.1.1. Définition de plan d'expériences

A l'époque actuelle, bon nombre de procédés de fabrication ou d'études expérimentales multiparamétriques en laboratoire deviennent de plus en plus complexes car ils dépendent d'un grand nombre de variables difficiles à régler intuitivement. Les stratégies couramment employées pour mener à bien ces expérimentations sont souvent informelles. Si ces expériences sont effectuées sans une méthodologie rigoureuse il est fort probable qu'elles vont soit conduire à des impasses, soit à des résultats de qualité décevante (un nombre de résultats difficiles à exploiter). C'est pourquoi la méthode des plans d'expériences est préconisée afin d'optimiser ce type de démarche avec la méthode et les outils qui permettent à l'expérimentateur de ne faire que les bonnes expériences et qui apportent la meilleure information expérimentale.

L'objectif principal de cette méthode peut être résumé par la devise :

"Obtenir un maximum d'information en un minimum d'expériences"

Une telle problématique est primordiale dans le milieu industriel où minimiser le nombre d'expériences à réaliser est synonyme de gain de temps et de productivité. Réaliser des productions de la meilleure qualité possible au coût le plus bas est de plus une quête universelle pour tous les fabricants [110].

IV.1.2. Objectifs

La théorie des plans d'expériences assure les conditions pour lesquelles on obtient la meilleure précision possible avec le minimum d'essais [111].

On a donc le maximum d'efficacité avec le minimum d'expériences et par conséquent le coût minimum [112].

IV.1.3. Réponse

On qualifie de réponse la grandeur qui est observée pour chaque expérience réalisée. On supposera toujours ici que cette grandeur est numérique [111]. Il appartient aux spécialistes du phénomène étudié de cerner au mieux ce qui les intéresse et de fournir le type de réponse étudié ainsi que l'objectif souhaité vis-à-vis de celle-ci [110].

IV.1.4. Facteurs

On qualifie de facteur toute variable, obligatoirement contrôlable, susceptible d'influer sur la réponse observée [113]. On parle donc des facteurs qui influent sur une réponse. Les termes facteur et réponse sont universellement employés dans le domaine des plans d'expériences. On distingue plusieurs types de facteurs :

- Facteurs continus : Les valeurs prises par les facteurs continus sont donc représentées par des nombres continus.
- Facteurs discrets : Au contraire, les facteurs discrets ne peuvent prendre que des valeurs particulières. Ces valeurs ne sont pas forcément numériques.
- Facteurs ordonnables : Il s'agit de facteurs discrets que l'on peut mettre dans un ordre logique (Par exemple : premier, deuxième, troisième ...).
- Facteurs booléens : Les facteurs booléens sont des facteurs discrets qui ne peuvent prendre que deux valeurs.

IV.1.5. Espace expérimental

On appelle niveau d'un facteur la valeur ou la désignation qui le représente dans l'expérience. Ainsi, un facteur peut être représenté par un axe gradué et orienté (Figure 11).

Lorsque ce facteur varie on dit qu'il change de niveau. La connaissance de l'ensemble de tous les niveaux utilisés par chaque facteur est nécessaire pour la réalisation des expériences.

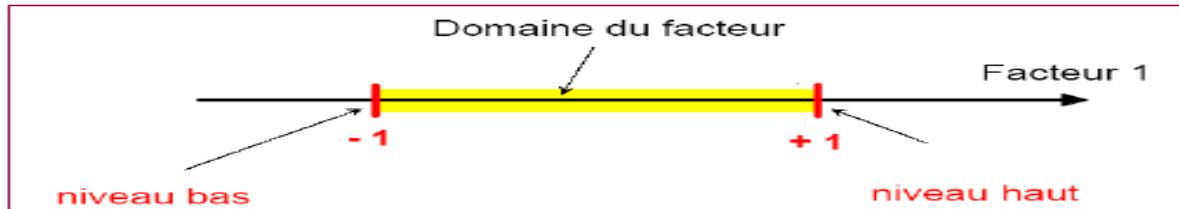


Figure 11 : Domaine de variation d'un facteur.

L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le domaine de variation du facteur ou plus simplement le domaine du facteur. On a l'habitude de noter le niveau bas par -1 et le niveau haut par $+1$ [112].

S'il y a un second facteur, il est représenté, lui aussi par un axe gradué et orienté. Ce second axe est disposé orthogonalement au premier. On obtient ainsi un repère qui définit un espace à deux dimensions. Cet espace est appelé : l'espace expérimental (Figure 12).



Figure 12 : Espace expérimental délimité par deux facteurs.

IV.1.6. Domaine expérimental

Dans la pratique, l'expérimentateur sélectionne une partie de l'espace expérimental pour réaliser son étude. Cette zone particulière de l'espace expérimental est le domaine d'étude (figure 13). Ce domaine est défini par les niveaux hauts et les niveaux bas de tous les facteurs et éventuellement par des contraintes entre les facteurs [111].

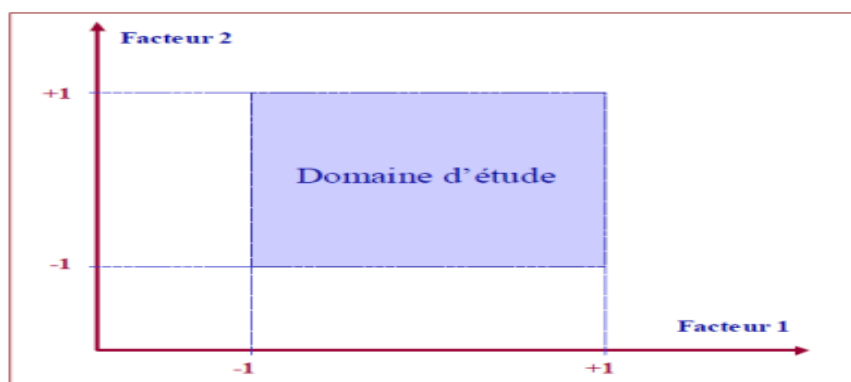


Figure 13 : Domaine d'étude sans contrainte.

IV.1.7. Points expérimentaux

Le niveau x_1 du facteur 1 et le niveau x_2 du facteur 2 peuvent être considérés comme les coordonnées d'un point de l'espace expérimental. Une expérience donnée est alors représentée par un point dans ce système d'axes. Un plan d'expériences est représenté par un ensemble de points expérimentaux (Figure 14).

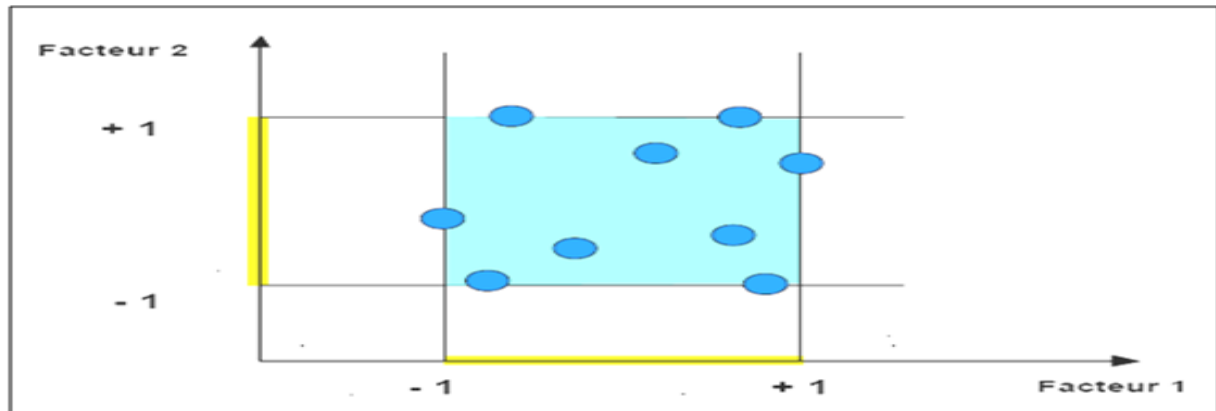


Figure 14 : Représentation des points expérimentaux dans un domaine d'étude.

IV.1.8. Surface de réponse

Les niveaux x_i représentent les coordonnées d'un point expérimental et y est la valeur de la réponse en ce point. On définit un axe orthogonal à l'espace expérimental et on l'attribue à la réponse.

La représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse nécessite un espace ayant une dimension de plus que l'espace expérimental. Un plan à deux facteurs utilise un espace à trois dimensions pour être représenté :

Une dimension pour la réponse, deux dimensions pour les facteurs. A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse (Figure 15).

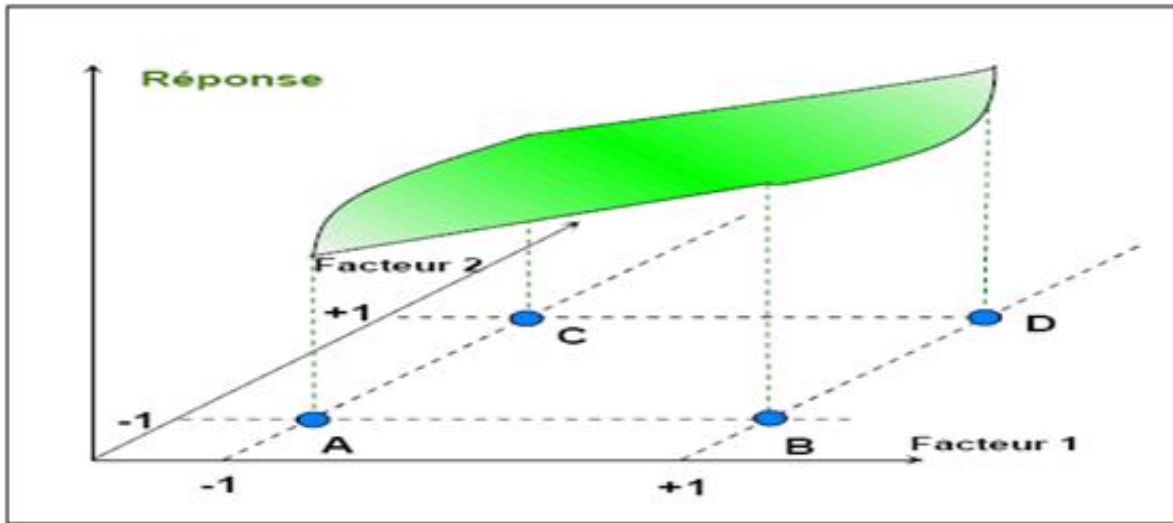


Figure 15 : Surface de réponse formée par l'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine d'étude.

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 de réponse [114].

IV.1.9. Modélisation mathématique

En l'absence de toute information sur la fonction qui lie la réponse aux facteurs dans une expérience, on se donne à priori une loi d'évolution dont la formulation la plus générale est la suivante (éq.2) :

$$Y = f(X_i) \quad \text{éq. 2}$$

Le développement prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé (éq.3):

$$Y = a_0 + \sum a_i X_i + \sum a_{ij} X_i X_j + \dots + \sum a_{ii} X_i^2 + a_{ij\dots z} X_i X_j \dots X_z \quad \text{éq. 3}$$

Où :

- y est la réponse ou la grandeur d'intérêt. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et elle est obtenue avec une précision donnée.
- x_i représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai. Cette valeur est parfaitement connue. On suppose même que ce niveau est déterminé sans erreur (hypothèse classique de la régression).

• a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} sont les coefficients du modèle mathématique adopté à priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences.

Une distinction peut être faite entre l'expérience réelle et l'expérience virtuelle.

- L'expérience réelle est une expérience dans laquelle les phénomènes auxquels nous nous intéressons sont provoqués en maîtrisant certains facteurs, et en observant les conséquences qui en résultent. Les expériences réelles sont soumises aux erreurs expérimentales et aux erreurs de mesures. L'erreur expérimentale traduit l'erreur imputable à la conception et à la réalisation des expériences. Elle n'est liée qu'à l'expérimentation. L'erreur de mesure traduit la variabilité des réponses du fait de la prise en compte des résultats obtenus à l'issue du processus d'expérimentation

- L'expérience réelle virtuelle, ou l'issue d'une simulation, est une expérience effectuée non pas sur un système réel mais sur son modèle mathématique, traduit en un ou plusieurs programmes informatiques.

IV.1.10. Démarche méthodologique d'un plan d'expérience

Le choix du nombre et de l'emplacement des points d'expériences est le problème fondamental des plans d'expériences. On cherche à réaliser le minimum d'expériences tout en réduisant l'influence de l'erreur expérimentale sur les modélisations mathématiques qui serviront à prendre des décisions. On atteint ce but en considérant les propriétés mathématiques et statistiques qui relient la réponse aux facteurs [114].

La démarche méthodologique d'un PE peut être décomposée en différentes étapes :

- Définition de l'objectif de l'étude
- Choix de la réponse permettant d'atteindre l'objectif
- Recherche des facteurs qui pourraient être influents sur la réponse : C'est l'étape la plus importante dans la conduite d'un PE.

Il faut sélectionner les paramètres, choisir les modalités et les interactions à étudier, recenser les paramètres pouvant influencer la réponse et identifier les interactions susceptibles d'être recherchées. On ne sera pas obligé d'étudier tous les facteurs mais on connaîtra ceux qui pourraient être influents. Les facteurs qui ne seront pas étudiés dans le plan d'expériences seront, en général, fixés à un niveau constant pendant toute l'expérimentation.

- Définition des niveaux des facteurs : Il s'agit de choisir les niveaux haut et bas de chaque facteur.
- Choix du plan d'expériences
- Proposition d'un modèle mathématique à suivre

-
- Expérimentation : C'est la partie technique de l'étude. Il faut que les essais soient menés avec beaucoup de soin et il faut être sûr de la qualité des résultats.
 - Interprétation des résultats des calculs : C'est l'étape de l'estimation des coefficients du modèle et leurs significations. Il ne semble pas facile d'en donner une interprétation simple. Il va falloir que transformer les résultats bruts (obtenus lors de l'expérimentation) pour en avoir une vision claire et précise. C'est la phase d'interprétation, les logiciels de plans d'expériences vont maintenant prendre de l'importance car ce sont eux qui vont nous aider à réaliser toutes les transformations qui nous sont nécessaires et toutes les illustrations qui nous aideront à bien comprendre les résultats.
 - Validation du modèle : Deux possibilités existent, soit le modèle est validé et cela signifie qu'il représente suffisamment le phénomène étudié dans le domaine expérimental étudié et dans ce cas, les objectifs sont atteints. Soit le modèle n'est pas validé et alors son utilisation n'est pas possible. Il faut donc proposer un modèle différent.

Mise en œuvre et suivi : Un modèle validé peut être alors utilisé pour faire de la prévision en n'importe quel point du domaine expérimental.

Le calcul de la réponse est possible en tout point du domaine expérimental. Ainsi, à partir du modèle calculé, nous pouvons prédire les résultats correspondant à la configuration optimale du produit ou du processus.

IV.2. Plans d'expériences classiques

IV.2.1. Plans pour criblage

L'hypothèse principale utilisée ici est que la loi de réponse f peut être approchée par un polynôme du premier degré à k variables. Il est clair qu'un tel modèle n'est pas d'une grande richesse mais son utilisation est cependant intéressante dans certains cas. Par exemple, utiliser un tel polynôme peut donner une bonne approximation de f lorsque le domaine expérimental est petit. Un autre cas d'application classique est celui où l'on dispose, à priori, d'un grand nombre de facteurs susceptibles d'agir sur la réponse observée [114].

L'utilisation d'un modèle plus riche est alors généralement impossible à cause de la grande taille de celui-ci. C'est pourquoi il est courant de débiter une telle étude par un modèle facile à manipuler afin de détecter quels sont les facteurs qui semblent être les plus influents. On dit que l'on utilise des techniques de criblage (ou screening avec la terminologie anglaise).

Il existe plusieurs types de plans de criblage notamment : les plans factoriels complets, les plans factoriels fractionnaires, les plans de Plackett-Burman...

IV.2.1.1. Plans factoriels complets

C'est l'un des dispositifs expérimentaux les plus simples à construire. Ce procédé peut être étendu au cas de k facteurs à l'aide de la définition suivante :

Pour K facteurs à 2 niveaux, on appelle plan d'expérience factoriel complet toute configuration constituée des éléments suivants :

- 1) tous les sommets du cube $[-1, 1]^K$,
- 2) n_0 répliques éventuelles du centre du domaine expérimental.

Le nombre d'expériences à réaliser avec un plan factoriel complet est alors :

$$n = N^K + n_0 \quad \text{éq. 4}$$

Dans bon nombre d'ouvrages on désigne par plan d'expérience factoriel complet la seule partie factorielle présentée ici (c'est-à-dire que $n_0 = 0$). Cette définition est plus générale car réaliser des répliques centrales peut s'avérer d'un grand intérêt pratique [110].

Exemple : Pour 2 facteurs (exprimés sous forme codée) il consiste à réaliser les 4 expériences associées aux sommets du carré $[-1, 1]^2$. Dans le cas de 3 facteurs il s'agit des 8 sommets du cube $[-1, 1]^3$.

IV.2.1.2. Plans factoriels fractionnaires

L'utilisation d'un plan d'expérience factoriel complet peut être problématique à cause de la taille parfois beaucoup trop grande de ce type de dispositif expérimental. Une des solutions afin de résoudre ce problème consiste à ne pas considérer le plan complet dans sa totalité (*i.e.* les 2^k expériences) mais seulement une fraction de celui-ci (par exemple $2^k - 1$ expériences obtenues en ne gardant que la moitié du plan, $2^k - 2$ en n'en gardant que le quart, *etc...*). La difficulté réside dans le choix des expériences constituant cette fraction du plan initial afin de conserver des propriétés intéressantes [111].

Ces plans permettent d'étudier beaucoup de facteurs et de déterminer ceux qui sont influents. L'analyse ne va souvent pas plus loin et atteint rarement la modélisation mathématique des réponses. Les modèles mathématiques utilisés sont donc, eux aussi, beaucoup plus simples. On emploie des modèles ne comportant que les facteurs principaux au premier degré ou des modèles avec des interactions d'ordre 2 suivant les objectifs de l'étude.

Au lieu de réaliser un plan complet 2^4 de 16 essais, on peut n'exécuter que 8 essais, c'est-à-dire la moitié des essais. Le plan fractionnaire correspondant est un plan $2^4/2$ ou 2^{4-1} où : le 2 indique que les facteurs prennent chacun deux niveaux, le 4 signifie que l'on étudie 4 facteurs et le $4 - 1 = 3$ signifie que l'on utilise un plan analogue au plan factoriel complet 2^3 qui ne comprend que 8 essais [114].

IV.2.1.3. Plans de Plackett-Burman

Les plans de Plackett et Burman sont des plans de criblage basés sur des matrices d'Hadamard. En effet, ces matrices d'Hadamard sont des matrices carrées dont les éléments sont soit -1 ou +1 et le nombre de lignes est multiple de 4. Les plans de Plackett-Burman complètent les plans factoriels complets et les plans fractionnaires. On cherche les facteurs influents et le sens de variations des effets sans prendre en considération aucune interaction entre facteurs principaux [110].

Ce type de plan d'expérience est d'un grand intérêt pratique puisqu'il combine à la fois nombre minimal d'expériences (donc coût optimal) et nombre minimal de niveaux (donc facilité dans les changements de niveaux des différents facteurs).

Le modèle mathématique résultant pour un plan de Plackett-Burman est un polynôme d'ordre 1 définie par l'équation (éq.5) :

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_p X_p + \varepsilon \quad \text{éq. 5}$$

Avec:

Y : réponse étudiée ; b_0 : représente la valeur moyenne théorique de la réponse ; b_1, b_2, \dots, b_p sont les effets principaux des facteurs X_1, X_2, \dots, X_p , respectivement et ε : terme d'erreur.

IV.2.2. Plans pour surfaces de réponse

La méthodologie des surfaces de réponse (MSR) constitue le second volet de la méthode des plans d'expériences. Cette technique vise à déterminer d'une façon quantitative les variations de la fonction réponse vis-à-vis des facteurs d'influence significative [111].

Les plans examinés précédemment (plans de criblage) n'avaient que deux niveaux d'étude par facteur et les modèles mathématiques utilisés étaient du premier degré (avec ou sans interactions) par rapport à chaque facteur. Ces plans conduisent parfois à des modélisations simples. Pourtant, il existe de nombreux cas où il est nécessaire d'avoir une bonne modélisation des phénomènes étudiés et où il faut passer à des modèles mathématiques du second degré. On fait alors appel aux plans pour surfaces de réponse.

Ces plans viennent de s'appliquer à la suite de l'étude de criblage puisqu'elles n'utilisent que les facteurs précédemment jugés influents. La MSR utilise des modèles polynomiaux du second degré. Nous étudierons les trois plus importants plans de ce type : les plans composites, les plans de Box-Behnken et les plans de Doehlert.

Le modèle mathématique postulé utilisé avec les plans pour surfaces de réponse est un modèle du second degré avec interactions d'ordre 2 :

- Pour deux facteurs (éq.6) :

$$y = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_{12} x_1 x_2 + a_{11} x_1^2 + a_{22} x_2^2 + e \quad \text{éq. 6}$$

- Pour trois facteurs (éq.7) :

$$y = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_3 x_3 + a_{12} x_1 x_2 + a_{13} x_1 x_3 + a_{23} x_2 x_3 + a_{11} x_1^2 + a_{22} x_2^2 + a_{33} x_3^2 + e \quad \text{éq. 7}$$

IV.2.2.1. Plans composites centrés

Un plan d'expérience composite centré pour k facteurs est constitué par :

- La partie factorielle contenant tous les sommets du domaine d'étude $[-1, 1]^k$,
- La partie axiale contenant tous les points situés sur les axes du repère à une même distance α du centre du domaine expérimental,
- La partie centrale contenant n_0 éventuelles répliques du centre du domaine expérimental.

Le nombre total n d'essais à réaliser est la somme des essais du plan factoriel (n_f), des essais du plan en étoile (n_α) et des essais au centre (n_0). Le nombre n des essais d'un plan composite est donné par la relation :

$$n = n_f + n_\alpha + n_0 \quad \text{éq. 8}$$

Le terme "centré" provient du centrage de ce plan par rapport à l'origine du repère utilisé. Le terme "composite" traduit la séquentialité du plan : il est possible de réaliser dans un premier temps les expériences de la partie factorielle (et donc d'ajuster un modèle à effets d'interactions) puis de rajouter ensuite, si nécessaire, les expériences de la partie axiale [115].

IV.2.2.2. Plans de Box-Behnken

Cette section introduit les plans d'expérience construits selon la technique proposée par Box et Behnken [116]. Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est construit sur un cube. Pour quatre facteurs ce plan est construit sur un hyper-cube à quatre dimensions. On place les points expérimentaux non pas aux sommets du cube ou de l'hyper-cube, mais au milieu des arêtes ou au centre des faces (carrés) ou au centre des cubes. Cette disposition a pour conséquence de répartir tous les points expérimentaux à égale distance du centre du domaine d'étude, donc sur une sphère ou sur une hyper-sphère suivant le nombre de dimensions. On ajoute des points au centre du domaine d'étude.

Les plans de Box-Behnken sont basés sur des modèles du second degré. Tous les facteurs ont trois niveaux : -1 , 0 et $+1$. Ces plans sont faciles à mettre en œuvre et possèdent la propriété de séquentialité. On peut entreprendre l'étude des k premiers facteurs en se réservant la possibilité d'en ajouter de nouveaux sans perdre les résultats des essais déjà effectués.

IV.2.2.3. Plans de Doehlert

Les points d'expériences des plans proposés par David H. Doehlert remplissent de manière uniforme l'espace expérimental. Pour deux facteurs les points expérimentaux sont situés aux sommets d'un hexagone régulier et il y a un point au centre. Ayant sept points expérimentaux,

ce plan permet de calculer au moins sept inconnues, donc sept coefficients. Comme les points expérimentaux sont régulièrement répartis dans l'espace expérimental, il sera facile d'étendre le plan vers n'importe quelle direction de l'espace en ajoutant des points qui seront, eux aussi, régulièrement répartis [111].

Ces plans permettent également l'introduction facile de nouveaux facteurs. Les nouvelles expériences viendront compléter les premières et aucune expérience ne sera perdue.

Tous les points du plan de Doehlert sont sur un cercle de rayon unité (en grandeurs centrées réduites). Le domaine défini par les plans de Doehlert est un domaine sphérique, un cercle dans un espace à deux dimensions, une sphère dans un espace à trois dimensions, une hypersphère dans un espace à plus de trois dimensions [116].

IV.3. Plans pour mélanges

Dans le domaine des plans d'expériences, les plans de mélanges ont une place tout à fait particulière. Ils doivent leur originalité aux trois types de contraintes qui pèsent sur les teneurs des différents constituants. La première contrainte est la contrainte fondamentale des mélanges, c'est-à-dire que la somme des proportions de tous les produits qui participent au mélange est toujours égale à 100%.

Dans les plans d'expériences classiques, les facteurs doivent être indépendants ce qui signifie que l'on peut choisir en toute liberté le niveau d'un facteur quels que soient les niveaux déjà attribués aux autres facteurs. Au contraire pour les mélanges, si l'on définit les teneurs de $n-1$ premiers constituants, celle du n ème (le dernier) ne peut pas être choisie mais elle est imposée. Le deuxième type de contraintes est la fréquente présence de limites hautes et limites basses sur les teneurs des constituants. Le dernier type de contraintes est représenté par les relations de rapports ou sommes constantes entre les teneurs de certains constituants [117].

IV.3.1. Modèles mathématiques pour des plans de mélanges

Le modèle mathématique appliqué aux plans de mélanges prend en compte la contrainte fondamentale des mélanges [111]. Il existe plusieurs modèles, à savoir le modèle linéaire, le modèle quadratique, le modèle spécial cubique... Pour élaborer un tel modèle de degré n avec k constituants, on doit choisir les teneurs en X_i du mélange suivant la série $0, 1/n ; 2/n ; \dots ; n/n$; ainsi on aura autant de mélanges différents que de coefficients à déterminer dans le modèle polynomial. Pour un mélange de trois constituants, nous pouvons utiliser trois types de modèles :

▪ **Modèle du premier degré**

C'est un modèle linéaire (éq.9) où les variations de la réponse sont proportionnelles aux compositions du mélange x_i qui ne sont pas indépendantes :

$$Y = a_1 X_1 + a_2 X_2 + a_3 X_3 \quad \text{éq. 9}$$

Il n'y a pas de terme constant. Cette disparition est la conséquence directe de la contrainte fondamentale des mélanges [117].

▪ **Modèle du deuxième degré**

C'est un modèle quadratique (éq.10) comprend les termes du premier degré, les termes rectangles et les termes carrés [117]. Pour un mélange à trois constituants, on a :

$$Y = a_1 X_1 + a_2 X_2 + a_3 X_3 + a_{12} X_1 X_2 + a_{13} X_1 X_3 + a_{23} X_2 X_3 \quad \text{éq. 10}$$

▪ **Modèle du troisième degré**

Le modèle mathématique du troisième degré, particulier aux plans de mélanges, peut s'obtenir à partir d'un polynôme du troisième degré sur lequel on applique la contrainte fondamentale des mélanges.

Ce modèle comprend les termes du premier degré, les termes rectangles et le produit des trois constituants [117]. Le modèle simplifié, appelé modèle cubique restreint, correspondant à un mélange de trois constituants est le suivant (éq.11) :

$$Y = a_1 X_1 + a_2 X_2 + a_3 X_3 + a_{12} X_1 X_2 + a_{13} X_1 X_3 + a_{23} X_2 X_3 + a_{123} X_1 X_2 X_3 \quad \text{éq. 11}$$

La table 3 présente le nombre de paramètres inconnus de tous les modèles vus précédemment pour un nombre de facteurs compris entre 2 et 10. Les colonnes sont associées respectivement de gauche à droite au modèle d'ordre un, au modèle d'ordre deux, au modèle complet d'ordre trois. Le nombre de paramètres inconnus du modèle classique d'ordre deux est présenté aussi (à droite du tableau) afin de pouvoir réaliser une comparaison avec la situation des plans classiques où il n'y avait pas de mélange.

On constate dans un premier temps le peu de paramètres inconnus du modèle d'ordre deux pour mélanges (ce qui est logique puisque l'effet moyen général ainsi que les effets quadratiques ont été supprimés). Au contraire, l'utilisation du modèle d'ordre trois complet devient rapidement prohibitive (au delà de 5 facteurs il nécessite obligatoirement plus du double des expériences du modèle d'ordre deux classique) [110].

Tableau 3 : Nombre de paramètres inconnus de différents modèles mathématiques pour des plans de mélanges.

	Ordre 1	Ordre 2	Ordre 3	Ordre 2 classique
2 facteurs	2	3	--	6
3 facteurs	3	6	10	10
4 facteurs	4	10	20	15
5 facteurs	5	15	35	21
6 facteurs	6	21	56	28
7 facteurs	7	28	84	36
8 facteurs	8	36	120	45
9 facteurs	9	45	165	55
10 facteurs	10	55	220	60

Par la suite, nous ne citons que les plans de mélanges à deux et trois constituants qui subissent seulement la première contrainte des mélanges ou contrainte fondamentale des mélanges.

IV.3.2. Mélange à deux constituants

Un mélange quelconque contenant X_a et X_b , avec X_a et X_b qui représentent les teneurs des deux constituants A et B du mélange, est représenté par un point situé sur l'intersection des coordonnées X_a et X_b . ce point qui représente le mélange est appelé soit point de composition soit point de mélange [111].

La contrainte des mélanges introduit une relation (éq.12) entre X_a et X_b :

$$X_a + X_b = 1 \quad \text{éq. 12}$$

Ce qui signifie que les points de coordonnées de X_a et X_b seront sur une droite de pente -1.

Ainsi, les compositions de X_a et X_b variant entre 0 et 1 sur un segment AB où le constituant pur A représente l'une des extrémités et le constituant pur B représente l'autre extrémité du segment.

IV.3.3. Mélange à trois constituants

Le point ayant une teneur X_a ; X_b et X_c représente le mélange ayant une teneur X_a du constituant A, X_b du constituant B et X_c du constituant C avec (éq.13) :

$$X_a + X_b + X_c = 1 \quad \text{éq.13}$$

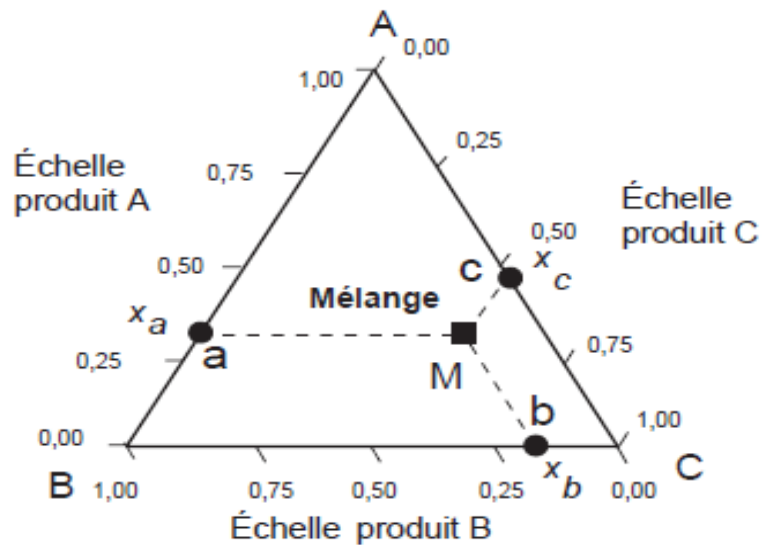


Figure 16 : Représentation des mélanges à trois constituants à l'aide d'un triangle équilatéral.

Les principaux types de mélanges sont classés suivant l'emplacement des points représentatifs des mélanges (Figure 16). Ces points sont répartis dans le domaine d'étude selon des dispositions particulières dont nous allons évoquer les principales [111]:

- Les plans en réseaux.
- Les plans de mélanges centrés.
- Les plans de mélanges centrés augmentés.

IV.3.3.1. Plans en réseaux

Pour les mélanges à trois constituants, le plus simple des plans de mélanges en réseaux ne contient que les trois produits purs. Les points représentatifs de ces produits sont aux sommets du triangle équilatéral (Figure 17). Les coordonnées de ces points sont 0 et 1.

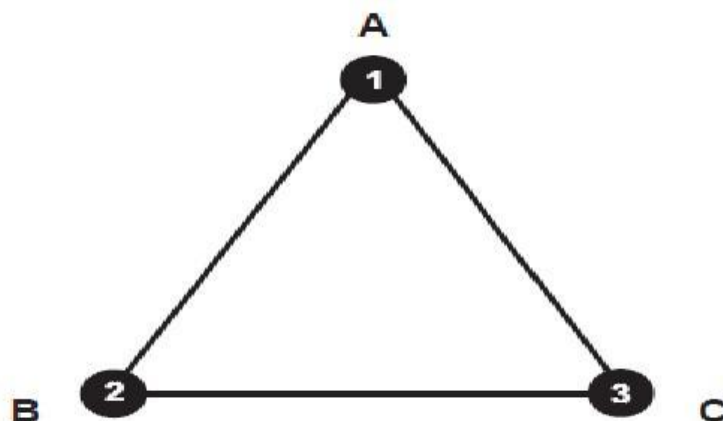


Figure 17 : Plan de mélange ne comportant que les trois produits purs

Le plan qui ne fait intervenir que les produits purs peut être enrichi par les points de composition moyenne, c'est-à-dire par les mélanges contenant 50 % de chacun des produits. Ces points de composition moyenne se situent au milieu des côtés du triangle. Leurs coordonnées sont 0 et 1/2 [117]. Les points n° 4, 5 et 6 forment un réseau. La longueur unité des côtés du triangle a été divisée par 2 et les coordonnées de ces points sont égales à 1/2 (Figure 18).

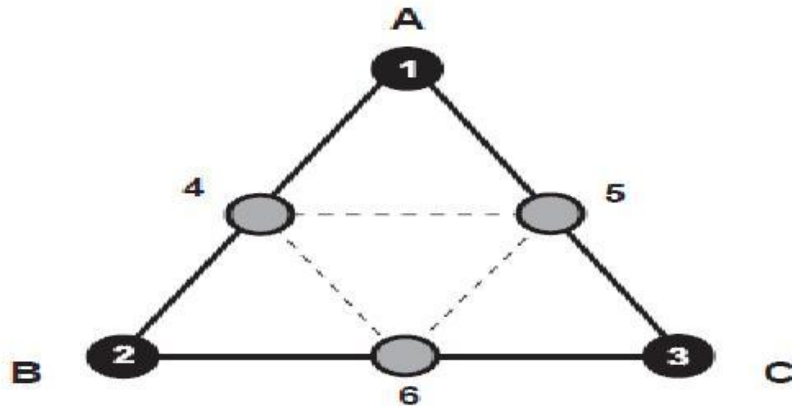


Figure 18 : Plan de mélange en réseaux {3,2} comportant les trois produits purs et les mélanges moitié-moitié.

On peut continuer à construire ainsi des réseaux de plus en plus serrés en divisant l'unité par m . Le pas du réseau est de $1/m$ et les coordonnées des points expérimentaux sont $0, 1/m ; 2/m ; 3/m$ jusqu'à $m/m = 1$. Pour nommer ces plans, on utilise deux chiffres, le premier correspond au nombre de constituants du mélange et le second correspond au diviseur utilisé pour établir le pas du réseau. Ici, le plan de la (Figure 18) est un plan {3, 2}, soit 3 constituants et un pas de 1/2.

IV.3.3.2. Plans de mélanges centrés

Les plans de mélanges centrés se distinguent des plans en réseaux par la présence systématique d'un point central, c'est-à-dire d'une composition contenant autant de chacun des constituants du mélange (Figure 19). Le plan centré permettant d'étudier trois constituants comprend :

- les produits purs.
- les mélanges moitié-moitié de deux produits purs.
- le mélange contenant un tiers de chaque produit pur (point central).

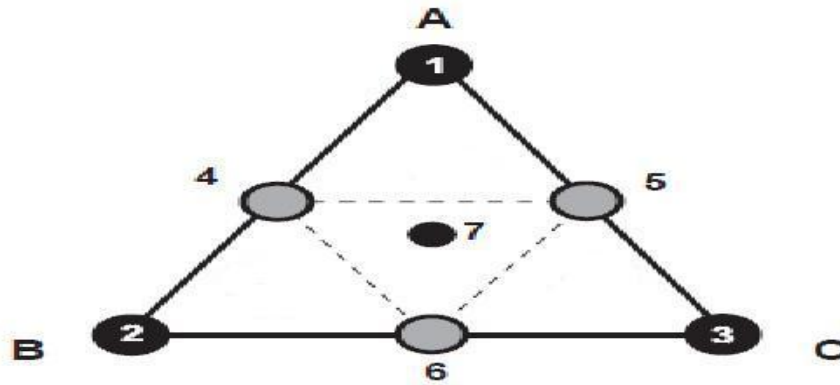


Figure 19 : Plan de mélange centré comportant les trois produits purs, les mélanges moitié-moitié et le mélange équiproportionnel des trois produits purs.

IV.3.3.3. Plans de mélanges centrés augmentés

Les plans de mélanges centrés sont des plans de mélanges centrés auxquels on ajoute les centres de gravité des simplex unitaires [118]. Par exemple, le plan de mélanges centré pour trois composants comprend quatre simplex unitaires (Figure 20). Le centre de gravité de l'un des simplex unitaires est déjà occupé (point noir n°7). Il reste donc à ajouter trois points (points blancs n° 8, 9 et 10) au centre des trois autres simplex unitaires [117].

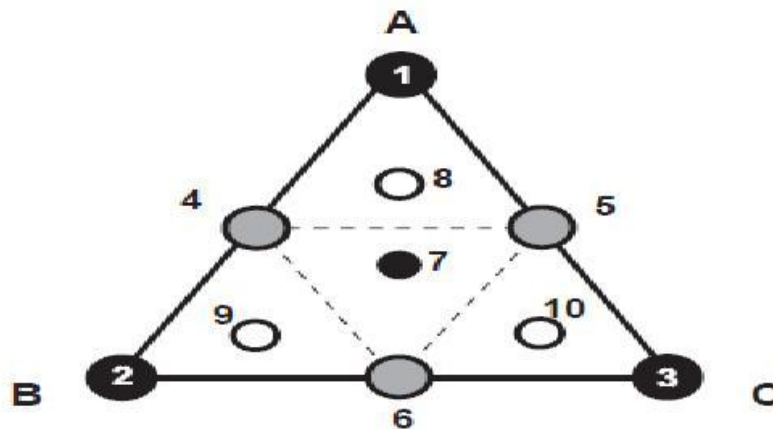


Figure 20 : Plan de mélange centré augmenté comportant les trois produits purs, les mélanges moitié-moitié, le mélange équiproportionnel des trois produits purs et les mélanges situés aux centres de gravité des simplex unitaires.

B. ETUDE DE CIBLAGE DES FACTEURS AGISSANT SUR L'EXTRACTION PAR HYDRO-DISTILLATION DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *Pistacia lentiscus*

Afin de garantir la rentabilité de la production d'huile essentielle de *P. lentiscus*, des stratégies de recherche/développement devraient être visées en vue d'optimiser durablement ces ressources.

Ainsi, l'amélioration du rendement en huile essentielle devient une nécessité primordiale, ceci devient plus accessible par l'application des techniques statistiques tels que les plans d'expériences, technique qui consiste à proposer un minimum d'expériences toutes en faisant varier tous les facteurs simultanément, afin d'obtenir un maximum d'information [110].

L'utilisation des plans d'expériences dans l'analyse et l'optimisation du processus d'hydrodistillation a été évoquée par plusieurs auteurs. Différents types de plans ont été utilisés pour arriver à cet objectif. Certains ont utilisé des plans factoriels complets [119], d'autres sont passés directement à l'optimisation en se servant des plans de surface de réponse [120].

Dans ce chapitre nous nous sommes servis des plans de criblage. L'expérimentation consistera à mettre en évidence les effets de certains facteurs sur la réponse étudiée, afin de détecter quels sont les facteurs qui semblent être les plus influents.

I. MATERIEL ET METHODES

I.1. Matériel végétal étudié

Pour réaliser cette étude, nous avons travaillé sur des feuilles de deux individus de *Pistachier Lentisque* qui ont été choisis au hasard et recueillis au stade de floraison dans la forêt d'Ifran située sur les rives du barrage de Sahla à 22 km de la ville de Taounate au Maroc (Altitude: 475 m, 34° 35'12.5" N 4° 38'31.1" W).

I.2. Extraction de l'huile essentielle

L'appareil utilisé pour l'hydro-distillation est de type Clevenger [121]. Il est constitué d'un chauffe ballon, un ballon de 1 L, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) et un collecteur en verre qui reçoit les extraits de la distillation. 100 g de matériel végétal ont été extraits lors de chaque essai. L'humidité du matériel végétal est déterminée par étuvage à 105°C pendant 4 heures [122] et les rendements sont exprimés par rapport à la matière sèche. L'huile essentielle obtenue est conservée au réfrigérateur dans un flacon en verre opaque et hermétiquement fermé à 4°C et à l'ombre.

I.3. Méthodes d'études

I.3.1. Choix de la réponse

La réponse étudiée est le rendement en HE de *P. lentiscus* calculé par (éq. 1).

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{M_{HE}}{M_S} \times 100$$

Avec : Rdt : rendement en huiles essentielles en (%); M_{HE} : masse d'huile essentielle recueillie en (g) et M_S : masse de la matière végétale sèche en (g).

I.3.2. Facteurs étudiés

Le choix des facteurs a été pris en tenant compte des paramètres répertoriés dans la littérature, qui influent le rendement de l'extraction de l'huile essentielle [123].

Les facteurs susceptibles d'avoir affecté le rendement en huile essentielle sont divisés en deux catégories :

✓ Facteurs qualitatifs :

- Humidité de la plante étudiée.
- Individualité.
- Division de la matière végétale.

✓ Facteurs quantitatifs :

- Temps de l'opération d'hydro-distillation.
- Rapport entre la matière végétale et l'eau.

I.3.3. Niveaux des facteurs

Il s'agit de choisir les niveaux haut et bas de chaque facteur (Tableau 4). Les niveaux des facteurs ont été choisis en tenant compte des limites expérimentales de fonctionnement de l'appareillage :

- L'Humidité de la plante a été étudiée par les deux modalités : plante fraîche et plante séchée. Le séchage des plantes se fait dans l'ombre pendant 7 jours.
- Pour l'individualité, nous avons étudié deux individus différents désignés 1 et 2.
- Des feuilles coupées en petits morceaux et feuilles entières ont été utilisées comme des niveaux haut et bas pour le facteur de division de la matière végétale.
- Le Temps de l'opération d'hydro-distillation varie entre 60 min et 180 min.
- Le rapport entre la matière végétale (MV) et l'eau dans le ballon de distillation varie en générale entre 1/2 et 1/4 (g/mL). Dans notre cas, nous utilisons un ballon de 1000 mL, ce qui veut dire que les niveaux bas et haut de ce facteur sont : (100 g de matière végétale/ 200 mL d'eau) et (100 g de matière végétale/ 400 mL d'eau).

Tableau 4 : Facteurs de l'étude de criblage et leurs niveaux réels et codés.

Facteurs	Code de variable	Nombre de niveaux	Niveaux	Code de niveau
Individualité	X1	2	Individu 1	-1
			Individu 2	1
Humidité	X2	2	Fraîche	-1
			Sèche	1
Division de la MV	X3	2	Entière	-1
			Coupée	1
Ratio Plante/Eau (g/mL)	X4	2	1/2	-1
			1/4	1
Temps (min)	X5	2	60	-1
			180	1

1.3.4. Plan d'expérience

Pour faire un criblage des facteurs agissants sur le procédé d'extraction par hydro-distillation de l'huile essentielle du *Pistachier lentisque*, nous nous sommes servis du plan de Plackett et Burman basé sur des matrices d'Hadamard [124]

Ce type de plan d'expérience est d'un grand intérêt pratique puisqu'il combine à la fois nombre minimal d'expériences (coût optimal) et nombre minimal de niveaux (facilité dans les changements de niveaux des différents facteurs) [110].

1.3.5. Matrice d'expérience

Le plan de Plackett et Burman à cinq facteurs nous a donné une matrice d'expérience à 8 essais. Le domaine d'étude est ainsi remplacé par le domaine (-1, +1) et les 8 essais décrits par la matrice d'expériences sont réalisés (Tableau 5).

Tableau 5 : Matrice d'expériences générée de l'étude de criblage.

Numéro de l'essai	X1	X2	X3	X4	X5
1	1	1	1	-1	1
2	-1	1	1	1	-1
3	-1	-1	1	1	1
4	1	-1	-1	1	1
5	-1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	-1
7	1	1	-1	1	-1
8	-1	-1	-1	-1	-1

I.4. Modèle mathématique et analyse statistique

Le rendement de l'hydro-distillation (Y) dépend des facteurs présents ci-dessus, ce qui se traduit mathématiquement par :

$$Y = f(X_1; X_2; X_3; X_4; X_5).$$

Avec :

Y: les rendements de la distillation (réponse).

f : la fonction de réponse.

X₁, X₂, X₃, X₄ et X₅ : les facteurs pris en compte.

a_i (a₀, a₁, a₂, a₃, a₄, a₅) : les coefficients des facteurs.

Le modèle mathématique résultant est un polynôme d'ordre 1 tel que:

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_4 + a_5X_5 + \varepsilon \quad \text{éq.14}$$

Durant cette étude, nous allons se servir du logiciel de conception et de traitement des plans d'expériences NEMROD [125]. Les modèles mathématiques obtenus ont été validés par le test de l'analyse de la variance (ANOVA) et les coefficients du modèle ont été considérés comme significatifs pour des valeurs de p<0,05.

II. RESULTATS ET DISCUSSIONS

II.1. Plan d'expérimentation

Les essais sont menés conformément au plan d'expériences et les résultats sont consignés dans le plan d'expérimentation qui est la traduction des variables codés en variables réelles (Tableau 6).

Tableau 6 : Plans d'expérimentation.

Numéro de l'essai	Individualité	Humidité	Division de la MV	Ratio Plante / Eau (g/mL)	Temps (min)	Réponse (%)
1	Individu 2	Sèche	Coupée	½	180	0,33
2	Individu 1	Sèche	Coupée	¼	60	0,23
3	Individu 1	Fraîche	Coupée	¼	180	0,25
4	Individu 2	Fraîche	Entière	¼	180	0,30
5	Individu 1	Sèche	Entière	½	180	0,26
6	Individu 2	Fraîche	Coupée	½	60	0,20
7	Individu 2	Sèche	Entière	¼	60	0,26
8	Individu 1	Fraîche	Entière	½	60	0,14

II.2. Analyse statistiques de la réponse

II.2.1. Analyse de la variance

Cette méthode consiste à tester l'influence d'une ou de plusieurs variables sur une variable quantitative, afin de contrôler si une variation des modalités prises par les variables explicatives, seules ou combinées, entraîne une variation de la variable expliquée Y.

Le but de l'utilisation de l'analyse de la variance (Annexe 1) est d'étudier la variabilité de la réponse en fonction de l'ensemble des facteurs étudiés dont nous pouvons contrôler systématiquement les modes d'intervention et dont nous souhaitons dissocier la part revenant à chaque facteur.

Nous allons construire la table de l'analyse de variance de notre étude et en déduire l'importance de chaque coefficient.

Le tableau 7 regroupe les données de base pour l'analyse de variance : les réponses mesurées, les réponses calculées par le modèle et les valeurs résidus qui correspondent à la différence entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées par le modèle.

Tableau 7 : Données de base de l'analyse de variance d'étude de criblage.

Essai n°	Réponses mesurées	Réponses calculées	Résidus
1	0,333	0,331	0,002
2	0,226	0,222	0,004
3	0,252	0,256	-0,004
4	0,302	0,298	0,004
5	0,263	0,265	-0,002
6	0,201	0,203	-0,002
7	0,259	0,263	-0,004
8	0,140	0,138	0,002

Le logiciel de traitement utilisé est menu d'un programme qui permet de construire un tableau d'analyse de variance (Tableau 8) qui comporte 6 colonnes (source des variations, sommes des carrées, degrés de liberté, carré moyen, rapport de Fisher et sa probabilité) et 4 lignes (titres, modèle corrigé de la moyenne, résidus et réponses mesurées corrigées de la moyenne).

La première colonne indique la source des variations. La deuxième colonne indique la somme des carrés des écarts à la moyenne. Ainsi, la somme des carrés des écarts des réponses mesurées corrigées de la moyenne est égale à la somme des deux autres sommes (sommes des carrés du modèle corrigé de la moyenne et somme des résidus).

La troisième colonne indique le degré de liberté (ddl) de chaque somme des carrés. Le degré de liberté des réponses mesurées est égal aussi à la somme des degrés de liberté du modèle et des résidus. La quatrième colonne donne le carré moyen qui est la somme des carrés divisée par le ddl correspondants. La cinquième colonne du tableau indique le F de Fisher qui est le rapport du carré moyen du modèle à celui des résidus.

Le rapport de Fisher permet de calculer la probabilité que les deux carrés moyens (carré moyen du modèle et carré moyen des résidus) ne soient pas égaux. Si le rapport de Fisher est élevé, la probabilité que le modèle soit celui de la moyenne est faible et les variations des réponses mesurées sont bien dues aux variations des facteurs. Si le rapport de Fisher est proche de 1, il y a une forte probabilité que le modèle soit celui de la moyenne [111].

Tableau 8 : Analyse de la variance de l'étude de criblage.

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté (ddl)	Carré moyen	Rapport de Fisher	<i>p-value</i>
Modèle corrigé de la moyenne	$2,4759 \cdot 10^{-2}$	5	$4,9519 \cdot 10^{-3}$	107,0681	0,0081
Résidus	$9,2500 \cdot 10^{-5}$	2	$4,6250 \cdot 10^{-5}$		
Réponses mesurées corrigées de la moyenne	$2,4852 \cdot 10^{-2}$	7			

D'après les résultats du tableau de l'analyse de variance (Tableau 8), nous pouvons conclure que l'effet principal du modèle est significatif puisque la probabilité de la signification du risque *p-value* est inférieure à 0,05.

L'analyse de variance permet de calculer le coefficient de détermination : le R^2 , qui est le rapport de la somme des carrés des réponses calculées corrigées de la moyenne à la somme des carrés des réponses mesurées corrigées de la moyenne :

$$R^2 = \frac{\text{somme des carrés des réponses calculées corrigées de la moyenne}}{\text{somme des carrés des réponses mesurées corrigées de la moyenne}} \quad \text{éq. 15}$$

Ainsi, nous pouvons conclure que le $R^2 = 0,996$ quantifie d'une manière claire la bonne qualité du modèle utilisé. Ceci indique que le modèle pourrait expliquer plus de 99% des effets globaux, ce qui prouve qu'il est bon et très fiable.

II.2.2. Analyse des résidus

Le modèle doit bien représenter les réponses mesurées ($R^2 = 0,996$) et la racine carrée du carré du moyen des résidus doit être du même ordre de grandeur que l'erreur expérimentale.

La représentation graphique des résidus en fonction des expériences réalisées indique une bonne dispersion. Les résidus semblent répartis au hasard (Figure 21).

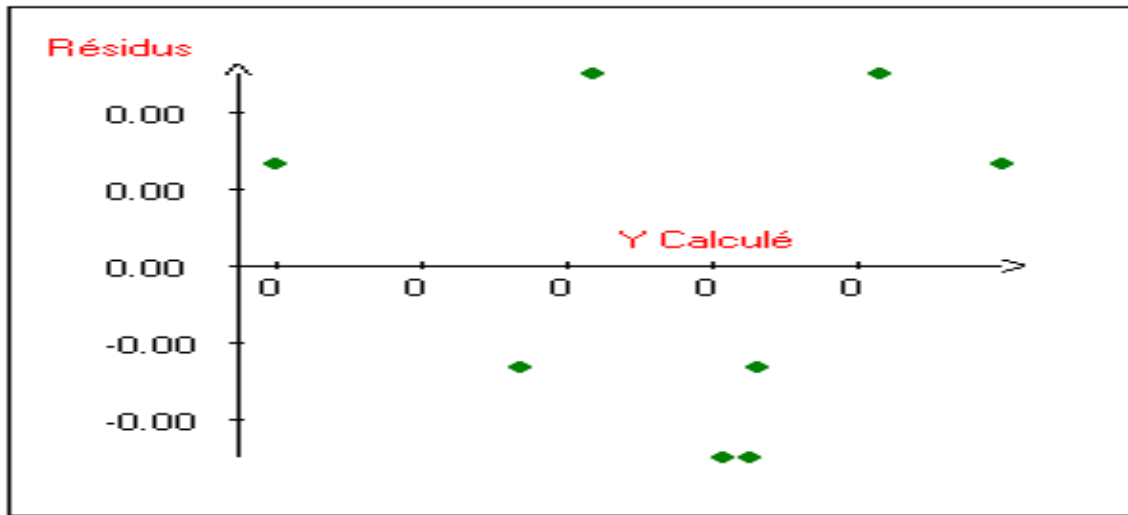


Figure 21 : Analyse des résidus de l'étude de criblage.

II.3. Étude des effets des facteurs

La *p-value* est la probabilité qu'un coefficient soit négligeable. Cette *p-value* est calculée à partir du rapport du coefficient à son écart-type (t-student) (Annexe 1).

Il est maintenant possible de construire un tableau où chaque coefficient figure accompagné de sa valeur, de son écart-type, du t-student et de sa *p-value* (Tableau 9).

Tableau 9 : Effet des coefficients du modèle de l'étude de criblage.

Coefficient	Valeur	Ecart-type	t-student	<i>p-value</i>
Constante (a_0)	0,247	0,002	102,73	0,0001 ***
Individualité (a_1)	0,027	0,002	11,13	0,005 **
Humidité (a_2)	0,023	0,002	9,67	0,007 **
Division de la matière végétale (a_3)	0,006	0,002	2,50	0,130
Ratio plante/ Eau (a_4)	0,013	0,002	5,30	0,030 *
Temps (a_5)	0,041	0,002	16,84	0,0021 **

*** : Coefficient hautement significatif ; **: Coefficient très significatif ; * : Coefficient significatif

Il est facile de comprendre la signification de tous les chiffres. La constante (a_0) a 1 chance sur 10 000 d'être égale à 0. Elle n'est donc certainement pas égale à 0, ce qui veut dire qu'elle est significative et il faut la conserver dans le modèle final.

Si nous fixons la probabilité d'acceptation des coefficients à une valeur *p-value* de 0,05, nous conserverons les coefficients des facteurs d'individualité (a_1), d'humidité (a_2), de ratio plante/

eau (a_4) et de temps d'extraction (a_5). Le coefficient de la division de la matière végétale a une p -value de 0,13 supérieure à 0,05. Elle n'est pas significative.

Le graphe des effets des facteurs (Figure 22) montre les effets de chacun des facteurs étudiés sur la variation de la réponse ainsi que le sens de cette variation.

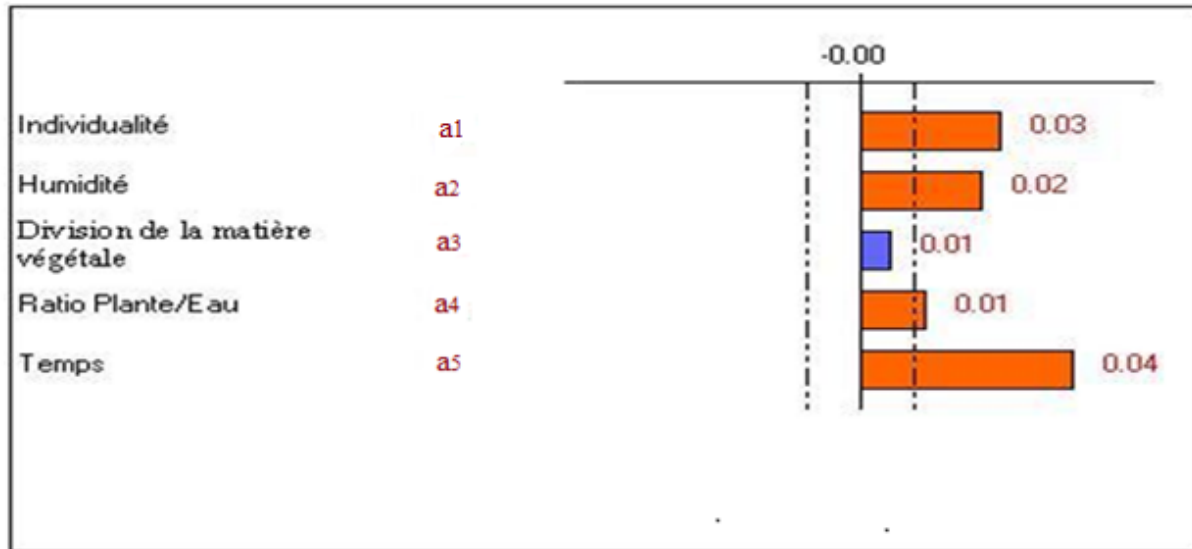


Figure 22 : Graphique des effets des facteurs.

Alors que le graphe de Pareto individuel (Figure 23) présente le pourcentage de contribution de chacun des facteurs étudiés sur la variation du rendement en huile essentielle.

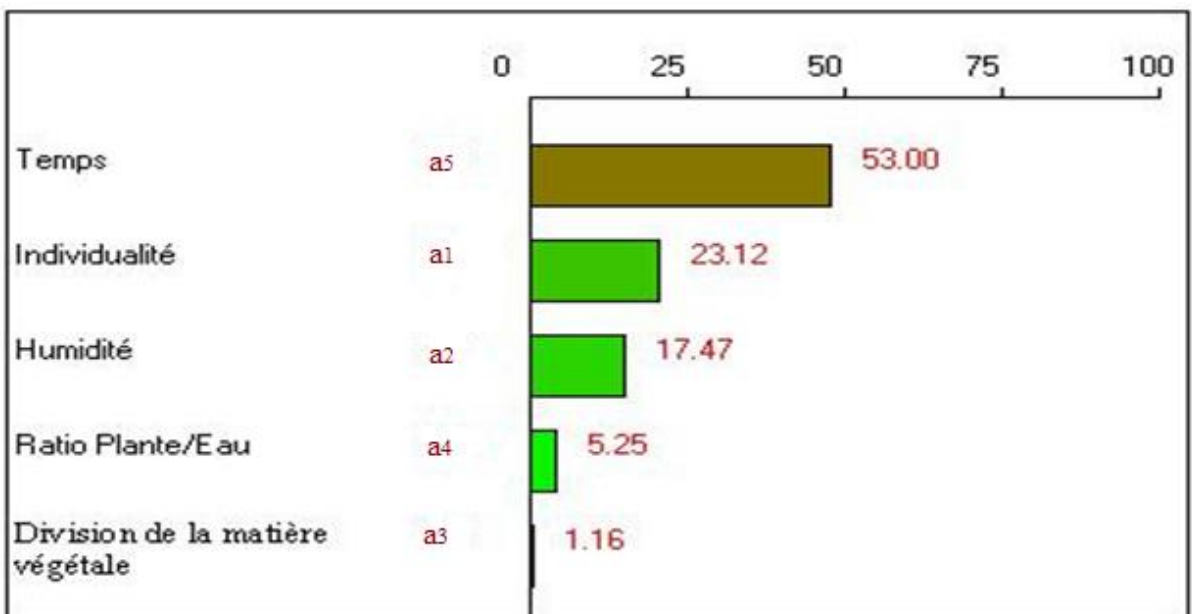


Figure 23 : Graphique de PARETO individuel.

II.4. Etude de la fonction réponse (Y)

Le modèle mathématique représentant le rendement de l'extraction par hydro-distillation de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* en fonction des variables les plus influents est le suivant :

$$Y = 0,247 + 0,027 X_1 + 0,023 X_2 + 0,013 X_4 + 0,041 X_5 \quad \text{éq.16}$$

II.5. Discussion des résultats de criblage des facteurs

II.5.1. Temps d'extraction

Le temps d'extraction apparut comme le facteur le plus influent sur l'opération d'hydro-distillation. Ce facteur a une influence significative sur le rendement en HE avec un coefficient de 0,041 (Tableau 9). Son effet est positif et la variation du temps d'extraction contribue à 53 % (Figure 23) dans la variabilité du rendement en HE.

Quand le facteur du temps d'extraction passe du niveau bas (60 min) au niveau haut (180 min), la variation de la réponse est importante. En conséquence, le niveau maximal de cette variable est recommandé.

L'impact du temps d'extraction sur cette opération a été prouvé par plusieurs auteurs [119 ; 126].

II.5.2. Individualité

L'individualité a été révélée comme le deuxième facteur par ordre d'influence qui affecte l'opération d'hydro-distillation.

Le tableau 9 montre que le coefficient qui correspond à ce facteur est de 0,027 avec un effet positif de 23,12 % sur la réponse (Figures 22; 23). Les variations de ce facteur du niveau bas au niveau haut influent significativement la réponse étudiée. Les feuilles issues de l'individu 2 ont été les plus recommandées pour avoir un rendement plus élevé.

Ce changement de rendement en HE d'un individu à l'autre peut être expliqué par le cycle végétatif de l'individu [127] ou à des facteurs tels que l'âge de la plante [128] ou même à des facteurs génétiques [129].

II.5.3. Humidité

L'humidité a une influence positive et significative sur le rendement en huile essentielle avec un coefficient de 0,023 (Tableau 9). La variation du niveau bas (plante fraîche) au niveau haut (plante séchée) de l'humidité contribue à 17,47 % sur la variabilité de la réponse étudiée (Figures 22 ; 23). En conséquence, l'utilisation des feuilles séchées est recommandée.

En effet, ces résultats concordent avec les résultats trouvés pour des études sur d'autres plantes [122 ; 130 ; 131], cette augmentation de la concentration en huiles essentielles s'expliquerait par une activité physiologique (réactions enzymatiques) importante. La biosynthèse des huiles essentielles continue et s'accélère après la récolte du matériel végétal en réponse au stress hydrique [132].

II.5.4. Rapport entre la matière végétale et l'eau

L'effet de ce facteur a montré une influence significative sur le rendement en HE. C'est le quatrième facteur par ordre d'influence sur la réponse étudiée. Le passage du rapport 1/2 au rapport 1/4 contribue légèrement à l'augmentation du rendement en HE avec un coefficient de 0,013 (Tableau 9) et un effet positif sur la réponse étudiée de 5,25 % (Figures 22 ; 23).

Plusieurs études sur d'autres plantes ont montré qu'il y a un effet du rapport entre la matière végétale et l'eau sur le rendement en huile essentielle [119 ; 126].

II.5.5. Division de la matière végétale

Ce facteur n'a pas eu d'effet significatif sur la réponse étudiée, puisque le coefficient (a_3) avait une signification de risque supérieure à 5 % (Tableau 9). Le test de student a montré que ce facteur n'a pas d'influence sur le processus d'hydro-distillation de l'HE. On peut travailler avec le niveau de ce facteur sans soucis de pertes du rendement en HE.

III. CONCLUSION

Dans cette partie d'étude, nous avons pu cerner et évaluer les facteurs influençant le rendement en HE extraite par hydro-distillation en adoptant la méthodologie des plans d'expériences par l'application des plans de criblage de Plackett-Burman.

Un modèle du premier ordre a été utilisé, dont les coefficients significatifs correspondent aux facteurs les plus influents sur la réponse étudiée.

La validation statistique du modèle par l'analyse de la variance et l'analyse des effets des coefficients par le test de student, nous a permis d'évaluer et de classer, par ordre d'influence, les effets des cinq facteurs étudiés sur la variation du rendement en HE de *P. lentiscus*. Ainsi, l'effet du temps d'extraction, de l'individualité, de l'humidité et du rapport entre la matière végétale et l'eau a été démontré comme significatif. Alors que l'effet de la division de la matière végétale est jugé comme statistiquement négligeable sur la variabilité du rendement en HE de *P. lentiscus*.

Afin de mieux exploiter ces résultats, d'autres études approfondies sur les facteurs jugés influents sur le procédé d'hydro-distillation de l'HE doivent être menés.

Elles consisteront à chercher les conditions opératoires optimales permettant d'obtenir un meilleur rendement en HE.

C. ETUDE DE L'EFFET DE L'INDIVIDUALITE SUR LE RENDEMENT EN HUILE ESSENTIELLE DE *Pistacia lentiscus*

I. MATERIEL ET METHODES

I.1. Matériel végétal

L'étude a été menée sur une population *P. lentiscus* dans la forêt « Ifran » de la région de Taounate.

La population étudiée est constituée de 22 individus sur lesquels nous avons relevé les valeurs de plusieurs caractères (variables). Le choix des individus se fait d'une façon aléatoire. Les individus de 1 à 11 ont été prélevés du versant abrité du soleil alors que les individus de 12 à 22 ont été prélevés du versant exposé au soleil.

I.2. Variables étudiés

Nous avons relevé, sur chacun des individus étudiés, les valeurs de plusieurs paramètres :

- Rendement en HE : l'extraction se fait par hydrodistillation des feuilles de chaque individu pendant 3 heures et les rendements seront calculés par rapport à la matière sèche.
- Hauteur : les mesures de hauteur de chaque individu ont été prises en utilisant un décamètre.

Sur chacun des individus étudiés, nous avons prélevé 30 feuilles de la section médiane de l'arbuste et nous avons mesuré deux paramètres :

- Longueur des feuilles : c'est la moyenne des longueurs des 30 feuilles mesurée par un pied à coulis de type " Vetools VC070181".
- Largeur des feuilles : c'est la moyenne des largeurs des 30 feuilles mesurée par un pied à coulis de type " Vetools VC070181".
- Altitude : pour chacun des individus étudiés, nous avons mesuré l'altitude par un GPS de type "OreGon RA123".

II. RESULTATS ET DISCUSSIONS

II.1. Données de bases de l'étude

Les résultats des mesures relevées sur chacun des individus étudiés sont représentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Données de bases de l'étude de l'individualité.

N° d'individu	Rendement X1 (%)	Hauteur X2 (m)	Longueur des feuilles X3 (cm)	Largeur de feuilles X4 (cm)	Altitude X5 (m)
1	0,25	1,95	2,17	0,92	456
2	0,24	2,3	2,85	1,27	455
3	0,26	1,9	3,09	1,22	452
4	0,21	2,45	2,03	0,71	459
5	0,24	2,85	2,82	1,1	462
6	0,22	2,53	2,58	0,87	463
7	0,18	1,73	2,25	0,9	448
8	0,21	1,75	2,35	0,8	446
9	0,25	2	2,83	0,82	451
10	0,21	2,1	2,47	0,82	447
11	0,18	1,3	2,44	1	456
12	0,24	1,05	2,32	0,7	466
13	0,24	1,93	2,21	0,8	467
14	0,32	1,9	2,79	0,9	473
15	0,25	2,2	2,46	1,14	477
16	0,24	1,7	2,14	0,71	481
17	0,24	1	2,18	0,91	482
18	0,32	1,54	2,19	0,7	484
19	0,35	1,4	2,54	0,73	489
20	0,25	0,9	2,15	0,63	492
21	0,25	1	2,22	0,95	489
22	0,25	1,75	2,51	0,78	488

II.2. Analyse statistique des données

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) fait partie du groupe des méthodes descriptives multidimensionnelles appelées méthodes factorielles.

L'ACP propose, à partir d'un tableau rectangulaire de données comportant les valeurs de « p » variables quantitatives pour « n » unités (appelées aussi individus), des représentations géométriques de ces unités et de ces variables.

Ces données peuvent être issues d'une procédure d'échantillonnage ou bien de l'observation d'une population toute entière. Les représentations des unités permettent de voir s'il existe une structure, non connue à priori, sur cet ensemble d'unités. De façon analogue, les représentations des variables permettent d'étudier les structures de liaisons linéaires sur l'ensemble des variables considérées. Ainsi, nous chercherons si nous pouvons distinguer des groupes dans l'ensemble des unités en regardant quelles sont les unités qui se ressemblent, celles qui se distinguent des autres, etc. Pour les variables, nous chercherons quelles sont celles qui sont très corrélées entre elles, celles qui, au contraire ne sont pas corrélées aux autres, etc [133].

Dans cette étude, nous disposons de 22 couples (x_i, y_i) constituant un échantillon d'observations indépendantes du couple de variables X (variables étudiées) et Y (rendement). Nous cherchons une relation statistique pouvant exister entre la variable expliquée Y et la variable explicative X.

Les résultats obtenus ont été traités par le logiciel "Lumière version 5.4". Une analyse en composante principale a été utilisée afin de regrouper les individus étudiés selon leurs similitudes ainsi que les corrélations existantes entre les variables étudiées.

II.2.1. Analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales (ACP), a pour but d'étudier les liens existant entre p variables mesurées sur n individus, d'éliminer les redondances (deux variables corrélées apportant à peu près la même information) et de remplacer les variables initiales par un petit nombre de variables, 1, 2 ou 3, appelées composantes principales. Ces variables sont des combinaisons linéaires des variables initiales non corrélées entre elles [134].

L'idée fondamentale de cette étude est basée sur la matrice de corrélation. Nous cherchons les corrélations entre les différentes caractéristiques. Si un ensemble de caractéristiques sont très corrélées entre elles, cela signifie qu'une seule suffirait à décrire notre système sans perte importante d'information [135].

II.2.1.1. Etude des variables

Les différentes caractéristiques statistiques des variables étudiées sont regroupées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Caractéristiques statistiques des variables étudiés.

Variabes	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-Type
X1 (%)	0,18	0,35	0,25	0,04
X2 (m)	0,90	2,85	1,73	0,51
X3 (cm)	2,03	3,09	2,4	0,28
X4 (cm)	0,63	1,27	0,88	0,17
X5 (m)	446,00	492,00	467,41	15,15

Les pourcentages des variances des facteurs extraits et leurs pourcentages cumulés sont présentés dans le tableau 12. La somme des valeurs propres est égale au nombre de variables. Afin de réduire le nombre de variables et de détecter la structure des relations entre ces variables, ce qui revient à les classer, nous nous sommes basés sur le critère de "Kaiser" qui est le critère le plus couramment utilisé : nous ne pouvons retenir que les facteurs ayant une valeur propre supérieure à 1. Au fond, c'est comme si nous disions qu'à moins qu'un facteur extrait soit au moins l'équivalent d'une variable originale, nous ne le retenons pas.

Seules les axes qui présentent des valeurs propres supérieures à 1 peuvent être retenues.

Tableau 12 : Valeurs propres et pourcentage de variabilité expliquée des axes.

Axe n°	Valeur propre	Pourcentage de variance (%)	Pourcentage cumulé (%)
1	2,47	49,38	49,38
2	1,20	24,07	73,46
3	0,68	13,65	87,11
4	0,37	7,57	94,68
5	0,26	5,31	100

Nous pouvons représenter les valeurs propres reportées dans le tableau de données ci-dessus dans un simple tracé linéaire (Figure 24).

C'est une méthode graphique qui teste les valeurs propres proposées par Cattell [136]. Cattell suggère de trouver l'endroit où les valeurs propres semblent s'équilibrer à droite du tracé.

Selon le critère de Kaiser et le test des valeurs propres [136], ce sont les deux premières composantes du tableau 12 qui peuvent être retenues dans l'explication de la variabilité des données.

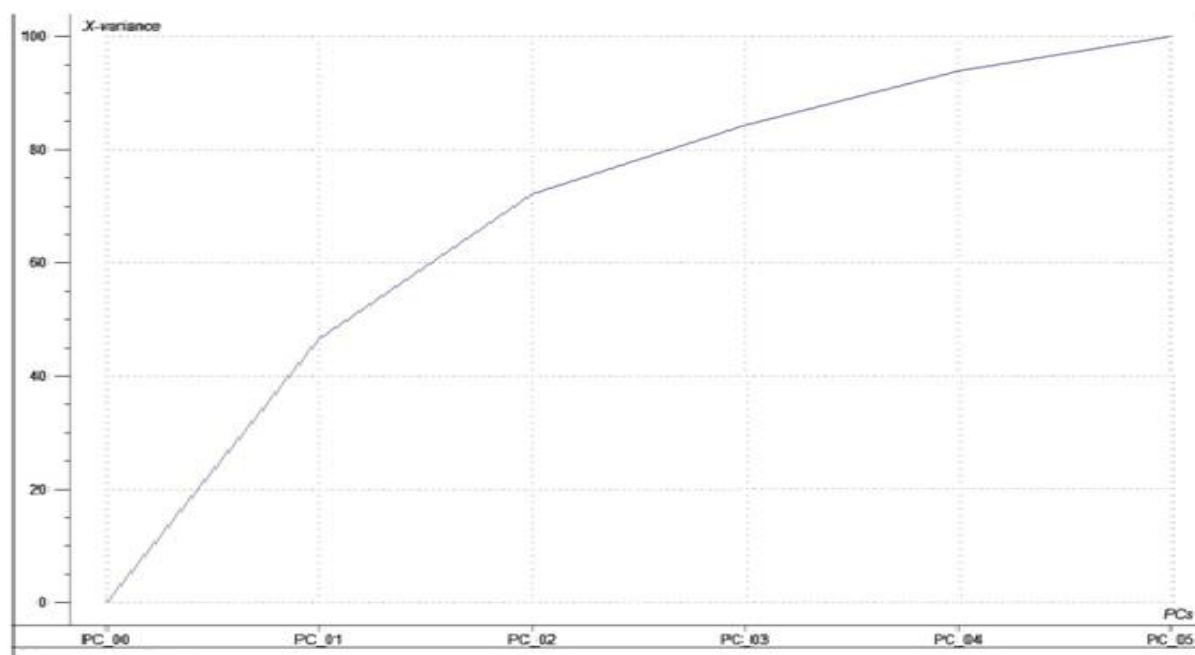


Figure 24 : Graphe de la variance expliquée en fonction du nombre de composantes étudiées.

Dans une étude statistique, nous mesurons, sur chaque unité d'un échantillon, différentes variables et nous chercherons s'il existe une certaine forme d'association entre elles. Le cas le plus simple est celui d'une dépendance statistique ou corrélation [134].

Le coefficient de corrélation r permet d'identifier s'il y a une relation linéaire entre deux variables X_i et X_j . r varie entre -1 et $+1$. Si $|r| = 1$, les variables sont parfaitement corrélées. Si $r = 0$, il n'y a pas la moindre corrélation, les variables sont parfaitement indépendantes [135].

Il y a corrélation entre deux variables observées sur les éléments d'une population si les variations de ces deux variables se produisent dans le même sens (corrélation positive) ou en sens contraire (corrélation négative).

La matrice de corrélation des cinq variables étudiées est présentée dans le tableau 13.

Tableau 13 : Matrice de corrélation des variables étudiées.

Variabes	Rendement	Hauteur	Longueur des feuilles	Largeur des feuilles	Altitude
Rendement	1				
Hauteur	- 0,24	1			
Longueur des feuilles	- 0,28	0,46	1		
Largeur des feuilles	- 0,15	0,33	0,55	1	
Altitude	0,58	- 0,56	- 0,39	- 0,35	1

Le coefficient de corrélation linéaire ne mesure pas une relation de cause à effet entre deux variables. En effet, deux variables peuvent être corrélées sans que les variations d'une variable entraînent les variations de l'autre, cela signifie seulement que les variations des deux variables sont dues à une même cause commune extérieure [134].

Les coefficients de corrélation partielle ne peuvent être calculés, que si les variables explicatives sont aléatoires (cas de la régression linéaire). Ces coefficients permettent de tester l'influence de chaque variable ou d'une combinaison d'un certain nombre de variables explicatives.

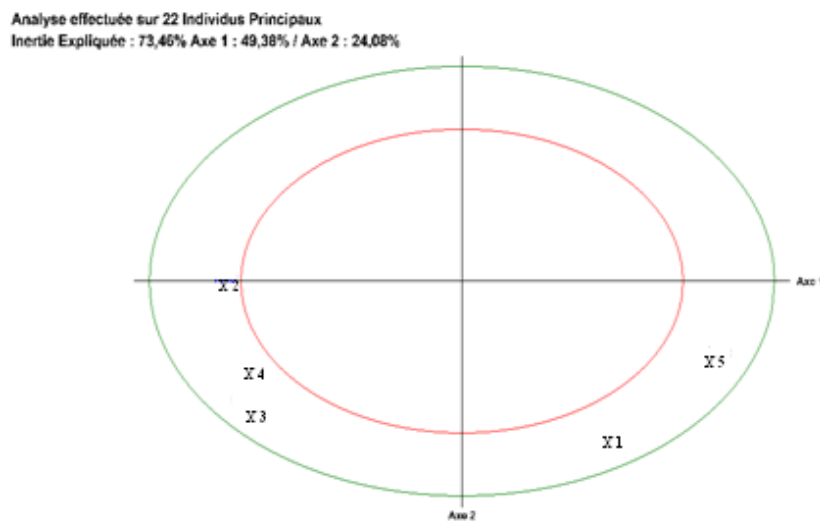


Figure 25 : Graphe des corrélations entre les variables étudiées.

La projection des résultats du tableau 13 sur le graphe montre que l'altitude est corrélée positivement avec le rendement en HE. Au contraire, le rendement est corrélé négativement avec la hauteur, la largeur et la longueur des feuilles.

II.2.1.2. Etude des individus

L'étude des variables montre que les deux premières composantes donnant une explication satisfaisante de la distribution des individus. La projection de la distribution des individus sur les deux axes retenus est illustrée dans la figure 26.

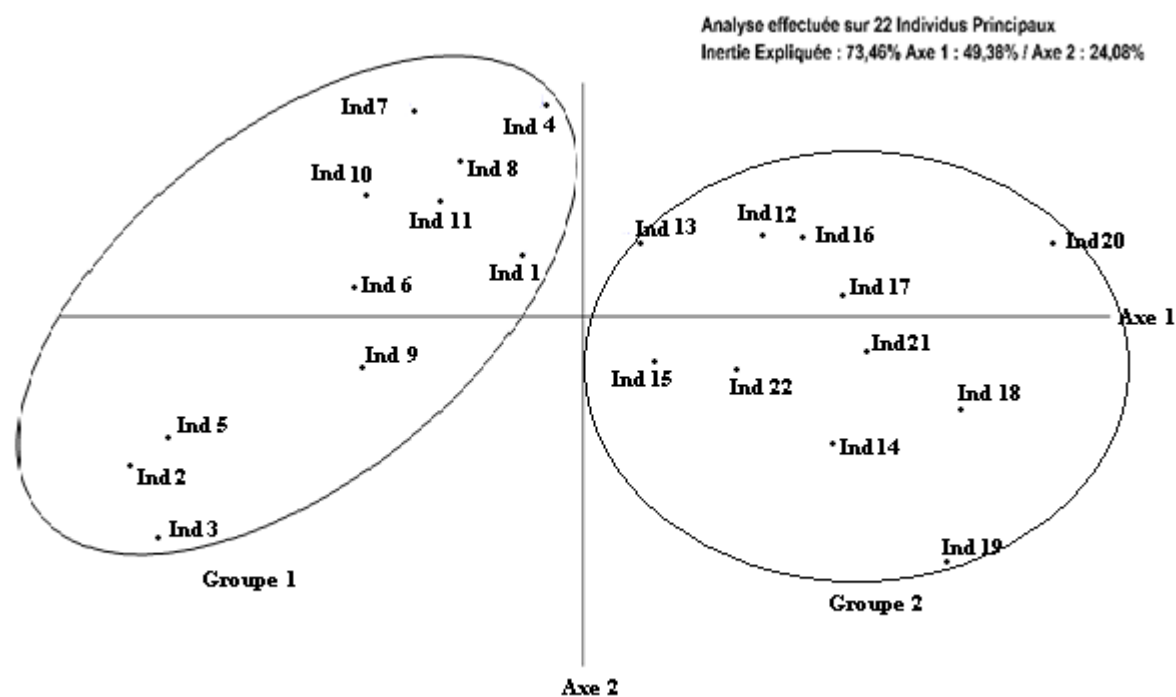


Figure 26 : Graphe de distribution des individus.

Deux regroupements apparaissent clairement dans ce graphe. Ainsi, le 1^{ère} groupe est formé par les individus de 1 à 11, alors que le 2^{ème} groupe est formé par les individus de 12 à 22.

Les individus qui forment le 2^{ème} groupe sont ceux situés dans le versant exposé au soleil et ils sont caractérisés par un rendement élevé en HE. Au contraire, les individus qui forment le 1^{ère} groupe sont ceux situés dans le versant abrité du soleil et ils sont pauvres en HE.

II.2.2. Modélisation du rendement en fonction des variables étudiées

La régression linéaire multiple nous a permis de trouver et d'expliquer les relations entre la variable expliquée (rendement en HE) et les variables explicatives (Hauteur, altitude, longueur et largeur des feuilles). L'ajustement du modèle étant obtenu par la méthode des moindres carrés.

Tableau 14 : Analyse de la variance de l'étude de l'individualité.

Modèle	Somme des carrés	Ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Régression	0,020	4	0,005	5,592	< 0,005
Résidu	0,015	17	0,001		
Total	0,036	21			

D'après les résultats du tableau de l'analyse de variance (Tableau 14), nous pouvons conclure que l'effet principal du modèle est significatif puisque la probabilité de la signification du risque est inférieure à 5 %.

Les coefficients de chacun des variables étudiées avec leurs valeurs ainsi que les valeurs statistiques de *t-student* et leurs significations sont regroupés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Effets des coefficients du modèle qui relie la variable dépendante aux autres variables étudiées.

Coefficient	Valeur	Ecart-type	<i>t-student</i>	Signification
Constante	- 0,775	0,259	- 2,991	0,008
Hauteur	0,005	0,015	0,299	0,769
Longueur des feuilles	0,087	0,030	2,850	0,011
Largeur des feuilles	- 0,073	0,050	- 1,466	0,161
Altitude	0,002	0,000	3,714	0,002

Le modèle mathématique retenu pour la modélisation du rendement en HE en fonction des cinq variables étudiées est représenté par l'équation suivante :

$$Y = - 0,775 + 0,005 X_1 + 0,005 X_1 + 0,087 X_2 - 0,073 X_3 + 0,002 X_4 \quad \text{éq. 17}$$

Avec : Y : Rendement (%) ; X1 : Hauteur (m) ; X2 : Longueur des feuilles (cm) ; X3 : Largeur des feuilles (cm) ; X4 : Altitude (m).

Le modèle obtenu lors de cette étude semble ne pas être suffisant pour une meilleure modélisation du rendement en HE en fonction des paramètres morphologiques et géographiques puisque le coefficient de détermination R² n'est pas assez suffisant. Ainsi, une augmentation des termes du modèle par l'ajout d'autres termes peut contribuer à leur amélioration.

II.3. Discussion des résultats

L'analyse en composantes principales montre que les paramètres morphologiques étudiés (Hauteur, longueur et largeur des feuilles) ont des valeurs plus élevées chez les individus de *P. lentiscus* de 1 à 11 qui sont situés au versant abrité du soleil (Ubac) aux altitudes plus basses et qui sont pauvres en HE. Alors que les individus de 12 à 22 qui ont des rendements plus élevés en HE, ils sont situés dans le versant exposé au soleil (Adret) et caractérisés par des paramètres morphologiques moins importants.

A la lumière des résultats de l'étude de l'ACP qui ont montré l'existence d'une corrélation positive entre le rendement en HE et l'altitude, ainsi que la différence observée dans le rendement en HE (plus élevé chez les individus du versant adret que chez ceux du versant ubac) et qui a été confirmés par l'analyse de la variance à un facteur qui a prouvé l'existence d'une différence significative entre les valeurs des rendements relevées pour les deux groupes d'individus étudiés. Nous pouvons admettre que la réduction de croissance ainsi que les teneurs élevées en HE observées chez les individus du versant Adret sont souvent liées aux mécanismes de réponse des ces individus au stress photooxydant, induit par l'exposition aux rayonnements solaires.

Dans les conditions naturelles, un stress dû à un fort rayonnement solaire est rarement un phénomène isolé. Il est souvent associé à une élévation de température [137]. En effet, si la feuille reçoit un rayonnement, sa température tend à s'élever, ce qui augmente la transpiration des feuilles [138].

La réponse de la plante à une forte température peut avoir pour conséquence, une accélération de l'installation d'une carence en eau [138]. Il semble que le déficit hydrique est intégré sous forme d'une fonction de réduction de la production journalière de biomasse chez les plantes stressées [139].

Ainsi, La différence observée dans les paramètres morphologiques de la population étudiée de *P. lentiscus* est due principalement à l'adaptation des individus du versant ensoleillé aux contraintes environnementales causées par l'élévation de température induit par l'exposition au fort rayonnement solaire. Le stress hydrique associé au stress photooxydant a eu probablement un effet négatif sur la croissance des individus de *P. lentiscus* exposés au soleil. La diminution de la hauteur des individus et de la longueur et largeur des feuilles est liée à l'adaptation de ses individus au déficit hydrique.

III. CONCLUSION

Cette partie d'étude nous a permis de classer les 22 individus étudiés selon les cinq paramètres proposés. Ainsi, les résultats de l'étude de l'ACP ont montré que les individus de la population étudiée se rassemblent pour former deux groupements distincts. Le 1^{ère} groupe est formé par les individus de 1 à 11 situés dans le versant ombragé et sont caractérisés par des teneurs faibles en HE, alors que le 2^{ème} groupe est formé par les individus de 12 à 22 situés dans le versant exposé au soleil et sont caractérisés par des teneurs plus élevées en HE.

La régression linéaire multiple nous a permis de montrer et d'expliquer les relations entre la variable expliquée (rendement en HE) et les variables explicatives (Hauteur, altitude, longueur et largeur des feuilles).

Les résultats obtenus ont montrés une corrélation positive entre le rendement en HE et l'altitude. Au contraire, le rendement est corrélé négativement avec la hauteur, la largeur et la longueur des feuilles.

Nous pouvons alors établir une liaison entre l'exposition au soleil et les paramètres morphologiques étudiées.

Cette partie d'étude peut avoir un intérêt économique très important dans le cadre d'une exploitation potentielle de l'huile essentielle de *P. lentiscus* de cette zone d'étude.

D. ETUDE DE L'EFFET DE SECHAGE SUR LE RENDEMENT EN HUILE ESSENTIELLE DE *Pistacia lentiscus*

I. MATERIEL ET METHODES

I.1. Matériel végétal étudié

Les feuilles récoltées ont été choisies en se basant sur les résultats obtenus en partie 2. La récolte se fait seulement à partir des individus du versant exposé au soleil et situés aux altitudes les plus élevées.

I.2. Traitement avant distillation

Pour réaliser cette partie d'étude, nous avons procédé aux expérimentations suivantes :

- Dans un premier temps, nous avons fait un suivi mensuel des extractions par hydrodistillation de l'huile essentielle des feuilles de lentisque (depuis le mois de janvier jusqu'au mois de décembre de la même année).
- Les feuilles récoltées ont été brassées afin d'homogénéiser le mélange qui a été placé à l'ombre et à l'air libre. La matière végétale a été étalée en fines couches et retournée fréquemment durant toute la période de séchage. Ensuite, des extractions par hydrodistillation de l'huile essentielle des feuilles de lentisque ont été réalisées chaque jour, pendant 15 jours de stockage à l'air libre et à l'abri du soleil, durant le mois au cours duquel les rendements sont les plus élevés.

I.3. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction se fait de la même façon que dans la partie A.II.2. L'humidité du matériel végétal est déterminée après étuvage à 105°C pendant 4 heures [122] par la formule :

$$H(\%) = \frac{M_f - M_s}{M_f} \times 100 \quad \text{éq. 18}$$

H : Humidité contenue dans la matière végétale (%)

M_f : Masse en matière végétale fraîche (g)

M_s : Masse en matière végétale sèche (g)

Les rendements sont exprimés par rapport à la matière sèche par la formule (éq. 1) :

Chaque essai a été réalisé en triple.

II. RESULTATS ET DISCUSSIONS

II.1. Effet de la période de récolte

La figure 27 présente les teneurs en HE obtenues suivant la période de récolte et durant les douze mois d'étude : janvier- décembre.

Le rendement minimal en HE obtenu est au mois de janvier avec un taux de $0,18 \pm 0,01$ %. Après le mois de janvier, les rendements augmentent continuellement.

Le meilleur rendement en HE obtenu à partir des échantillons récoltés est au mois de mai avec un taux de $0,32 \pm 0,015$ %. Alors que ceux obtenus à partir des collectes des mois de mars, avril et juin ont été relativement intéressants avec des taux de $0,25 \pm 0,01$ % ; $0,25$ % et $0,26 \pm 0,02$ % respectivement.

Après le mois de juin, les rendements en HE chutent jusqu'à un taux de $0,20$ % qui correspond au mois de décembre.

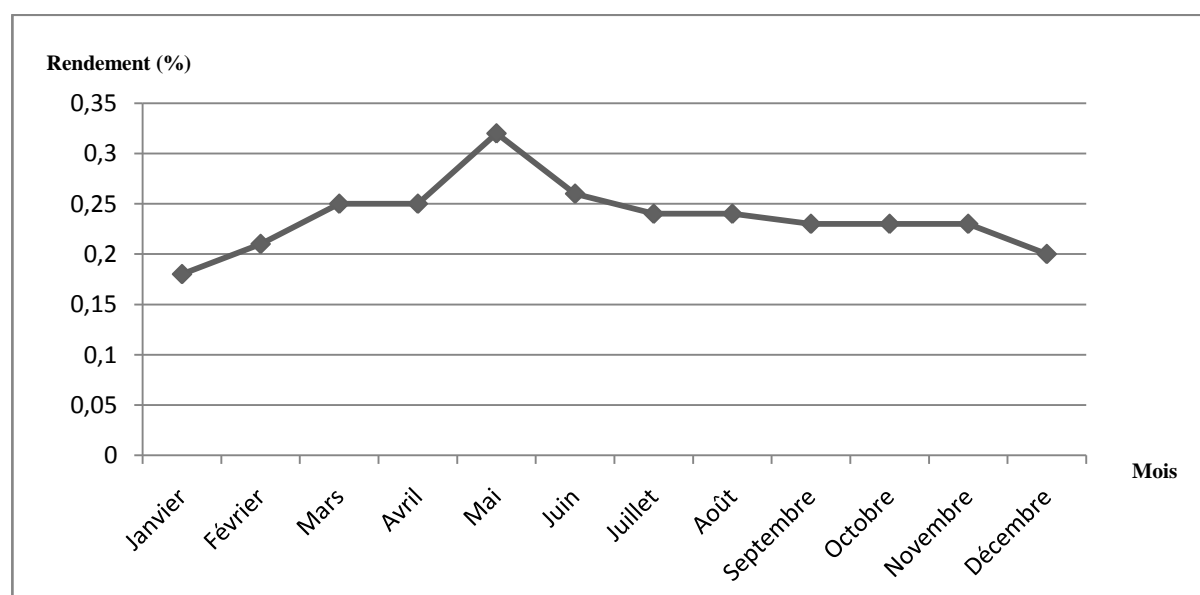


Figure 27 : Évolution du rendement en huiles essentielles des feuilles de *Pistacia lentiscus* en fonction de la période de récolte.

Nos résultats concordent avec ceux trouvés pour d'autres espèces telles que l'armoise blanche, le thuya de Berbère et le genévrier de Phénicie [127, 128, 141].

II.2. Effet de la durée de séchage

Les résultats obtenus des taux d'humidité et des rendements en HE des feuilles *P. lentiscus* à l'état frais et son évolution au cours du séchage à l'air libre ont été regroupés dans le tableau

L'évolution des taux d'humidité et du rendement en HE en fonction du temps de séchage est illustrée dans la figure 28.

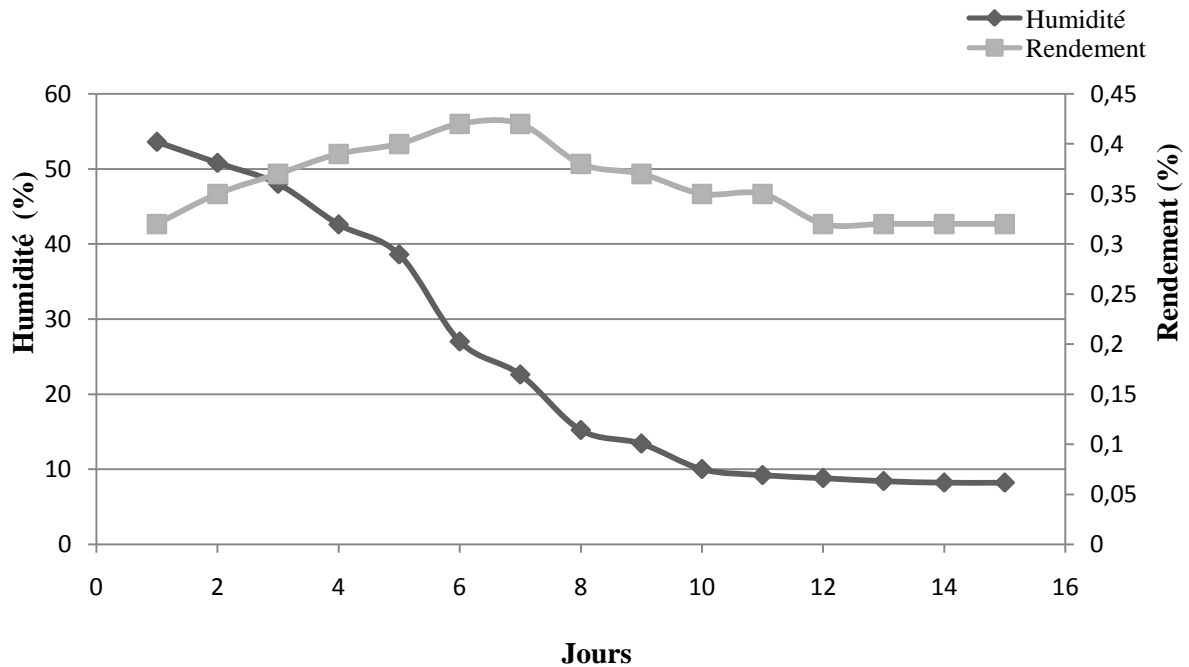


Figure 28 : Évolution du rendement en huile essentielle de *Pistacia lentiscus* en fonction de la durée de séchage à l'air libre.

L'analyse de la figure 28 montre que le taux d'humidité diminue progressivement au cours de la période de séchage, puis devient pratiquement constant. Ainsi, il passe de $53,6 \pm 0,5$ % au premier jour à $8,2 \pm 0,1$ % au quatorzième et quinzième jour de séchage.

Le rendement en HE, exprimé par rapport à la matière sèche, évolue durant le séchage du matériel végétal avant sa distillation. Dans une première phase, ce rendement commence par une nette augmentation pour atteindre un maximum. Puis dans une deuxième phase, il baisse régulièrement.

Le rendement en HE passe de $0,32 \pm 0,01$ % à $0,42 \pm 0,01$ % au bout de 7 jours, soit une augmentation de 31 %. Au-delà de cette période, il diminue progressivement puis devient pratiquement constant. Ainsi, le maximum de la teneur en huiles essentielles est obtenu au sixième et septième jour $0,42$ % et jusqu'au 15^{ème} jours de séchage le rendement en HE ($0,32$ %) reste toujours supérieur à celui des feuilles fraîches.

II.3. Modélisation du rendement en fonction de l'humidité

Nous avons cherché le modèle qui relie le rendement en huile essentielle à l'humidité contenue dans les feuilles de *Pistacia lentiscus*. Pour pouvoir aboutir à cet objectif, nous nous sommes servis de la modélisation par régression linéaire.

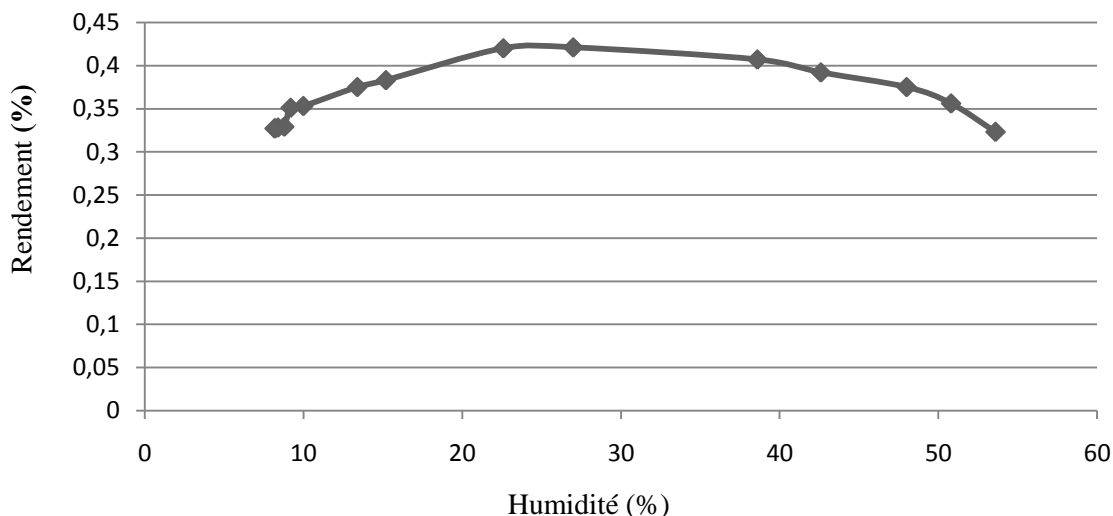


Figure 29 : Évolution du rendement en huile essentielle de *Pistacia lentiscus* en fonction de l'humidité.

L'allure parabolique de la figure 29 nous a mené à penser que le modèle le mieux adapté sera un polynôme de degré 2 :

$$Y = a_0 + a_1 X + a_{11} X^2 \quad \text{éq. 19}$$

Le traitement statistique a été réalisé à l'aide du logiciel du traitement statistique JMP version 8.1 [142]. D'après le tableau 16 de l'analyse de la variance, nous pouvons affirmer que l'effet principal de la régression est significatif puisque la probabilité de la signification du risque *p-value* est inférieure à 0,05.

Tableau 16 : Analyse de la variance du modèle linéaire reliant le rendement à l'humidité.

Source	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	Rapport F	Probabilité
Modèle	0,0163	2	0,00812	161,68	<0,0001
Résidu	0,0006	12	0,00005		
Total	0,0169	14			
R^2	97%				
R^2_a	96%				

Le coefficient R^2 est égal à 97%, cette valeur reflète la corrélation entre les valeurs expérimentales et prévues du modèle adapté. L'ajustement du modèle a été donné par le coefficient R_a^2 qui prend une valeur égale à 96%. Ces deux coefficients semblent être très suffisants.

Les effets de tous les facteurs étudiés ainsi que les valeurs statistiques de t-student et la probabilité observée (p-value) sont regroupés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Effets des coefficients du modèle de régression qui relie le rendement à l'humidité.

Terme	Coefficient	Effet	Ecart- Type	t-student	p-value
Constante	a_0	0,361	0,00325	111,12	<0,0001
Humidité (%)	a_1	0,002	0,00015	15,65	<0,0001
Humidité (%)×Humidité (%)	a_{11}	-0,0002	0,00001	-17,25	<0,0001

Les résultats du tableau 17 indiquent que les facteurs a_0 , a_1 et a_{11} présentent un effet statistiquement significatif puisque leur p-value est inférieur à 0,05.

II.4. Discussion des Résultats

L'augmentation de la teneur en huile essentielle pendant les premiers jours de séchage est proportionnelle à la diminution du taux d'humidité. Les analyses statistiques montrent que les rendements en huile essentielle varient significativement avec le taux d'humidité des feuilles.

Le séchage de la plante, avant sa mise en distillation, est un traitement qui a des effets très nets sur le rendement en huile essentielle [143].

La variation de la teneur en huile essentielle des feuilles en fonction de la durée de séchage est similaire à ce qui a été montré pour plusieurs autres espèces de PAM, telles que le thuya de Barbarie, l'eucalyptus, la verveine et le romarin [131 ; 144 ; 145 ; 146 ; 147].

Zrira et *al.* a conclu qu'il s'agit d'un phénomène biologique, la plante après sa récolte continue à vivre et son activité de biosynthèse des terpènes et dérivés s'accroît. C'est un moyen de défense contre le stress hydrique pour la plante [148].

C'est ce qui expliquerait l'augmentation des rendements en huiles essentielles des feuilles de *Pistacia lentiscus* pendant la première phase de la courbe représentée dans la figure 28.

Après la mort de la plante, toute l'activité de biosynthèse s'arrête et les pertes d'huiles essentielles par évaporation ne sont plus compensées, d'où les baisses des rendements de distillation [148].

Le modèle mathématique retenu pour la modélisation du rendement en huile essentielle en fonction du taux de l'humidité des feuilles de lentisque est représenté par l'équation suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = 0,361 + 0,002 \times \text{Humidité (\%)} - 0,0002 \times (\text{Humidité (\%)})^2 \quad \text{éq. 20}$$

Le modèle quadratique postulé et validé explique environ 97% de la variabilité totale avec un meilleur ajustement. Ainsi, ce modèle peut être utilisé pour estimer le rendement en HE en huile essentielle des individus de la zone d'étude.

III. Conclusion

Cette partie d'étude nous a permis d'évaluer l'influence de la période de récolte sur le rendement en huiles essentielles des feuilles de *P. lentiscus*. Ainsi, les meilleurs rendements ont été obtenus à partir des collectes du mois de mai.

Les résultats obtenus, au terme de ce travail, montrent aussi une influence significative du séchage à l'ombre et à l'air libre sur le rendement en HE. Le meilleur rendement, soit 0,42%, est obtenu entre six et sept jours pour une teneur en eau égale à 22 %. Jusqu'au 15^{ème} jours de séchage le rendement en HE qui est d'une valeur de 0,33 % reste toujours supérieur à celui des feuilles fraîches.

Le modèle quadratique postulé pour la modélisation du rendement en huile essentielle en fonction du taux d'humidité des feuilles peut présenter un outil pertinent de prédiction et d'estimation du rendement en huile essentielle en connaissant seulement le taux d'humidité des feuilles.

A la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que la meilleure période de récolte des feuilles de *P. lentiscus* est celle du stade de floraison, ainsi que la durée optimale de séchage à l'air libre est entre 6 et 7 jours. Pour la suite du travail, toutes les extractions se portent sur des feuilles de *P. lentiscus* séchées à l'air libre pendant 6 à 7 jours.

E. ETUDE DE L'OPTIMISATION DES FACTEURS INFLUENTS SUR L'EXTRACTION PAR HYDRODISTILLATION DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *Pistacia lentiscus*

Les études de séchage et de l'individualité nous ont permis d'améliorer le rendement en HE par l'optimisation des facteurs qualitatifs agissant sur le processus d'hydrodistillation.

L'utilisation d'une technique de PE tel que la méthodologie de surface de réponse (MSR) peut être considéré comme l'outil idéal qui nous offre la possibilité d'une étude de modélisation du phénomène d'extraction par hydrodistillation d'HE.

Jusqu'à maintenant, nous avons utilisé uniquement des plans dont les facteurs prenaient seulement deux niveaux et dont le modèle mathématique de la réponse était du premier degré. Mais il arrive assez souvent que l'explication des réponses mesurées obtenues par un modèle du premier degré soit insuffisante [113]. Il faut passer dans ce cas à un modèle du second degré dont l'objectif est la modélisation du phénomène, en abandonnant la simple recherche des facteurs influents qui était l'objectif des plans de criblage.

I. MATERIEL ET METHODES

I.1. Matériel végétal étudié

Les feuilles du *P. lentiscus* utilisées pour cette étude ont été choisies en se basant sur les résultats obtenus en partie 2 et 3. La récolte se fait seulement à partir des individus du versant exposé au soleil et situés aux altitudes les plus élevées. Les feuilles récoltées ont été brassées afin d'homogénéiser le mélange qui a été placé à l'ombre et à l'air libre. La matière végétale a été étalée en fines couches et retournée fréquemment durant une période de séchage de sept jours.

I.2. Extraction de l'huile essentielle

L'appareil utilisé pour l'hydrodistillation est de type Clevenger [121]. C'est le même appareillage utilisé lors de l'étude de criblage.

I.3. Méthodes d'études

I.3.1. Choix de la réponse

La réponse étudiée dans notre cas est le rendement en HE de *P. lentiscus* calculé par (éq. 1).

1.3.2. Choix des facteurs

Le choix des facteurs a été pris en tenant compte des résultats obtenus aux études effectuées précédemment (chapitre 2, 3 et 4) concernant les facteurs qui influents le rendement en HE de *P. lentiscus* extraite par hydrodistillation.

1.3.3. Choix des niveaux des facteurs

Il s'agit de choisir les niveaux haut et bas de chaque facteur (Tableau 18). Les niveaux des facteurs ont été choisis en tenant compte les limites expérimentales de fonctionnement de l'appareillage :

- Le Temps de l'opération d'hydro-distillation varie entre 60 et 180 min.
- Le rapport entre la matière végétale et l'eau dans le ballon de distillation : nous utilisons un ballon de 1000 mL, ce qui veut dire que les niveaux bas et haut de ce facteur sont : (200 mL d'eau/ 100 g de matière végétale/) et (400 mL d'eau/ 100 g de matière végétale).

Tableau 18 : Facteurs et leurs niveaux réels et codés de l'étude d'optimisation.

Facteurs	Code de variable	Unité	Centre	Pas de variation
Temps	X1	Min	120	60
Ratio (eau/plante)	X2	mL/g	3	1

1.3.4. Choix du plan d'expérience

Le choix du plan utilisé dans cette étude d'optimisation s'est porté sur un plan de surface de réponse du type composite (plan du second degré).

1.3.5. Matrice d'expérience

Le plan composite est constitué de trois éléments :

- ✓ Plan factoriel : constitué de points d'expériences situés aux sommets de carrés (pour deux facteurs). Ainsi que des points de contrôles au centre du domaine d'étude.
- ✓ Plan en étoile : le choix de l'emplacement des points en étoile est lié aux conditions expérimentales et à des considérations théoriques basées sur les critères d'optimalité.
- ✓ Points au centre : ces points sont importants et ont plusieurs rôles. Ils servent à tester la validité du modèle du premier degré, permettent d'obtenir une estimation de l'erreur expérimentale, diminuent l'erreur de prédiction près du point central et interviennent dans le calcul de " α " (Annexe 2).

Le nombre total n d'essais à réaliser dans un plan composite est :

$$n = n_f + n_\alpha + n_0 \quad \text{éq. 21}$$

Avec :

n_f : nombre des essais du plan factoriel ;

n_α : nombre des essais du plan en étoile ;

n_0 : nombre des essais au centre.

Le plan composite à deux facteurs nous a permis d'obtenir une matrice d'expérience à 12 essais. Le domaine d'étude est ainsi remplacé par le domaine (-1, +1) et les 12 essais décrits par la matrice d'expérience sont réalisées (Tableau 19).

Tableau 19 : Matrice d'expériences générée de l'étude d'optimisation.

Numéro de l'essai	X1	X2
1	-1,00	-1,00
2	1,00	-1,00
3	-1,00	1,00
4	1,00	1,00
5	1,21	0,00
6	-1,21	0,00
7	0,00	1,21
8	0,00	-1,21
9	0,00	0,00
10	0,00	0,00
11	0,00	0,00
12	0,00	0,00

I.4. Modèle mathématique et analyse statistique

Le modèle mathématique postulé utilisé pour les plans composites est un modèle du second degré dans lequel on conserve le coefficient constant, les termes du premier degré, les termes rectangles et les termes du second degré. Il n'y a pas d'interactions d'ordre 3 ou plus élevé [113].

Le rendement de l'hydro-distillation (Y) dépend des facteurs présentes ci-dessus, ce qui se traduit mathématiquement par :

$$Y = f(X_1; X_2).$$

Le modèle mathématique résultant est un polynôme d'ordre 2 tel que :

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + \varepsilon \quad \text{éq. 22}$$

Avec:

Y: le rendement en HE (réponse) ;

f : la fonction de réponse ;

X_1, X_2 : les facteurs pris en compte ;

b_i ($b_0, b_1, b_2, b_{12}, b_{11}, b_{22}$) : les coefficients des facteurs ;

ε : le terme d'erreur.

L'analyse statistique se fait en utilisant les mêmes modalités lors de l'étude de criblage (chapitre 1, paragraphe II.4).

I.5. Etude du Point test

Cette étape repose sur la réalisation d'un essai expérimental et la comparaison de la réponse expérimentale obtenue avec la réponse prédite par le modèle. La prédictibilité du modèle sera confirmée si les deux valeurs ne présentent pas de différence significative.

II. RESULTATS ET DISCUSSIONS

II.1. Plan d'expérimentation

Les essais inclus (points en étoiles et points centraux) sont menés en accord avec le plan d'expérience complémentaire. Les extractions du plan d'expérimentations qui est la traduction des variables codées en variables réelles sont effectuées et les résultats sont enregistrés (Tableau 20).

Tableau 20 : Plan d'expérimentation de l'étude d'optimisation.

Numéro de l'essai	Temps (min)	Ratio (mL/g)	Rendement (%)
1	60,00	2	0,40
2	180,00	2	0,51
3	60,00	4	0,46
4	180,00	4	0,58
5	192,60	3	0,56
6	47,40	3	0,42
7	120,00	4,21	0,52
8	120,00	1,79	0,45
9	120,00	3	0,50
10	120,00	3	0,50
11	120,00	3	0,50
12	120,00	3	0,51

II.2. Analyse statistique de la réponse

II.2.1. Analyse de la variance

Les données de base pour l'analyse de variance qui correspondent aux réponses mesurées, réponses calculées par le modèle et les valeurs résidus, sont représentées dans le tableau 21.

Tableau 21 : Données de base de l'analyse de variance d'étude d'optimisation.

Essai n°	Réponses mesurées	Réponses calculées	Résidus
1	0,4000	0,3993	0,0007
2	0,5100	0,5096	0,0004
3	0,4600	0,4562	0,0038
4	0,5800	0,5765	0,0035
5	0,5600	0,5626	-0,0026
6	0,4200	0,4231	-0,0031
7	0,5200	0,5254	-0,0054
8	0,4500	0,4504	-0,0004
9	0,5040	0,5039	0,0001
10	0,5040	0,5039	0,0001
11	0,5050	0,5039	0,0011
12	0,5056	0,5039	0,0017

Les résultats des calculs de l'analyse de variance figurent dans le tableau 22, qui indiquent que l'effet principal du modèle est significatif puisque la probabilité de la signification du risque *p-value* est inférieure à 0,05.

Tableau 22 : Analyse de la variance de l'étude d'optimisation.

Source de variation	Somme des carrés	Degré de liberté	Carré moyen	Rapport	<i>p-value</i>
Régression	$3.02880 \cdot 10^{-2}$	5	$6.05760 \cdot 10^{-3}$	265.2952	< 0.0001 ***
Résidus	$1.37001 \cdot 10^{-4}$	6	$2.28334 \cdot 10^{-5}$		
Total	$3.04250 \cdot 10^{-2}$	11			
Manque d'ajustement	$6.50000 \cdot 10^{-5}$	3	$2.06669 \cdot 10^{-5}$	0.8267	0.561
Erreur pure	$7.50000 \cdot 10^{-5}$	3	$2.50000 \cdot 10^{-5}$		

*** : Coefficient hautement significatif ; **: Coefficient très significatif ; * : Coefficient significatif

L'analyse de variance permet de calculer le coefficient de détermination R^2 . Le calcul de ce rapport nous donne un R^2 d'une valeur de 0,998. Ainsi, nous pouvons conclure que ce R^2 quantifie d'une manière claire la bonne qualité du modèle utilisé. Ce modèle prend en charge la plus grande partie de l'explication des réponses mesurées.

La somme des carrés due aux résidus a été divisée en somme de deux sources de variations : le manque d'ajustement et l'erreur expérimentale ou l'erreur pure.

Rappelons que les règles et les tests statistiques ne s'appliquent qu'aux variables purement aléatoires. Le manque d'ajustement n'étant pas une grandeur aléatoire mais une erreur systématique. Nous ne devons pas appliquer les règles statistiques aux écarts. Nous le faisons pourtant car nous supposons que le manque d'ajustement est de l'ordre de grandeur de l'erreur expérimentale. Il est donc bon de s'assurer de la validité de cette hypothèse : le manque d'ajustement est de l'ordre de grandeur de l'erreur expérimentale [111].

La mesure de la variance des résidus est tirée de l'analyse de variance et la mesure de l'erreur expérimentale est assurée par les répétitions. Nous pouvons donc calculer la variance de l'ajustement. En comparant la variance de l'erreur expérimentale à la variance de l'ajustement, il est possible de voir si l'hypothèse est valide. La rubrique du manque d'ajustement montre que le manque d'ajustement est plus petit que l'erreur expérimentale.

III.2.2. Analyse des résidus

Les résidus sont représentés dans la figure 30 en fonction des réponses calculées. Le graphe indique que les points semblent répartis au hasard et il n'apparaît pas de structures nettes. Dans ces conditions, nous considérons qu'il n'y a plus d'informations à extraire des données.

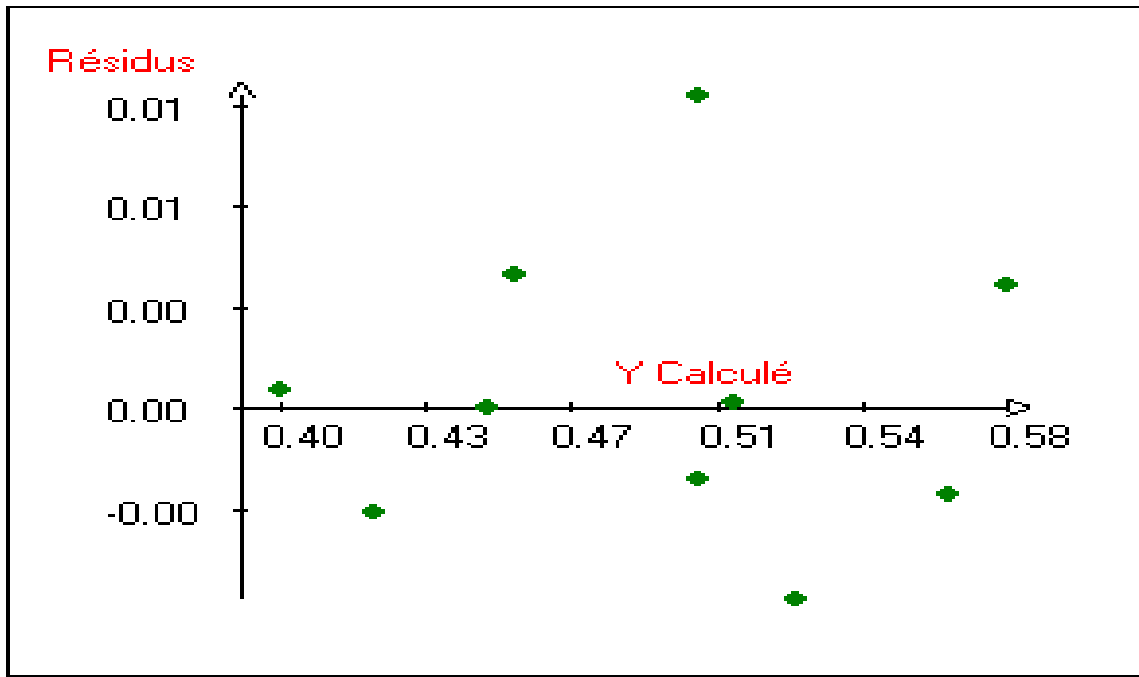


Figure 30 : Analyse des résidus de l'étude d'optimisation.

II.3. Étude des effets des facteurs

Le tableau 23 donne les valeurs des coefficients du modèle où chaque coefficient figure accompagné de sa valeur, de son écart-type, du t-student et de sa *p-value*.

Tableau 23 : Effet des coefficients du modèle de l'étude d'optimisation.

Nom	Coefficient	Ecart-Type	t-student	<i>p-value</i>
b0	0,502	0,002	214,89	< 0,0001 ***
b1	0,058	0,002	31,76	< 0,0001 ***
b2	0,031	0,002	17,07	< 0,0001 ***
b11	-0,006	0,002	-2,76	0,032 *
b22	-0,010	0,002	-4,24	0,005 **
b12	0,002	0,002	1,05	0,337

*** : Coefficient hautement significatif ; **: Coefficient très significatif ; * : Coefficient significatif

La probabilité de la signification du risque *p-value* qui correspond au coefficient de la constante b_0 est significative, il faut la conserver dans le modèle final. Au seuil de signification 0,05.

Nous conservons aussi les coefficients qui correspondent aux deux facteurs étudiés : temps d'hydrodistillation (b_1) et ratio (eau/plante) (b_2). Ainsi que les coefficients des termes quadratiques : b_{11} et b_{22} .

L'effet de l'interaction entre le temps d'hydrodistillation et ratio (eau/plante) s'est révélé non significatif puisque le coefficient b_{12} a une p -value de 0,337 supérieure à 0,05.

II.4. Modèle mathématique

Les coefficients du modèle du second degré donné par le tableau 23 nous permettent d'écrire le modèle du second degré qui résume l'ensemble des essais représentant le rendement de l'extraction par hydro-distillation de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* :

$$Y = 0,502 + 0,058 X_1 + 0,031 X_2 - 0,006 X_1^2 - 0,010 X_2^2 \quad \text{éq. 23}$$

II.5. Etude graphique

C'est avec le modèle mathématique retenu que tous les graphiques ci-dessous, vont être établis par le logiciel et que nous pourrons faire des prévisions dans le domaine d'étude.

Les graphes des courbes d'isoréponses et de surfaces de réponses tridimensionnelles pour le rendement en HE de *P. lentiscus* sont affichés sur les figures 31 et 32. Les deux figures déterminent la contribution du temps de distillation et le rapport (eau/plante) sur le rendement obtenu en HE.

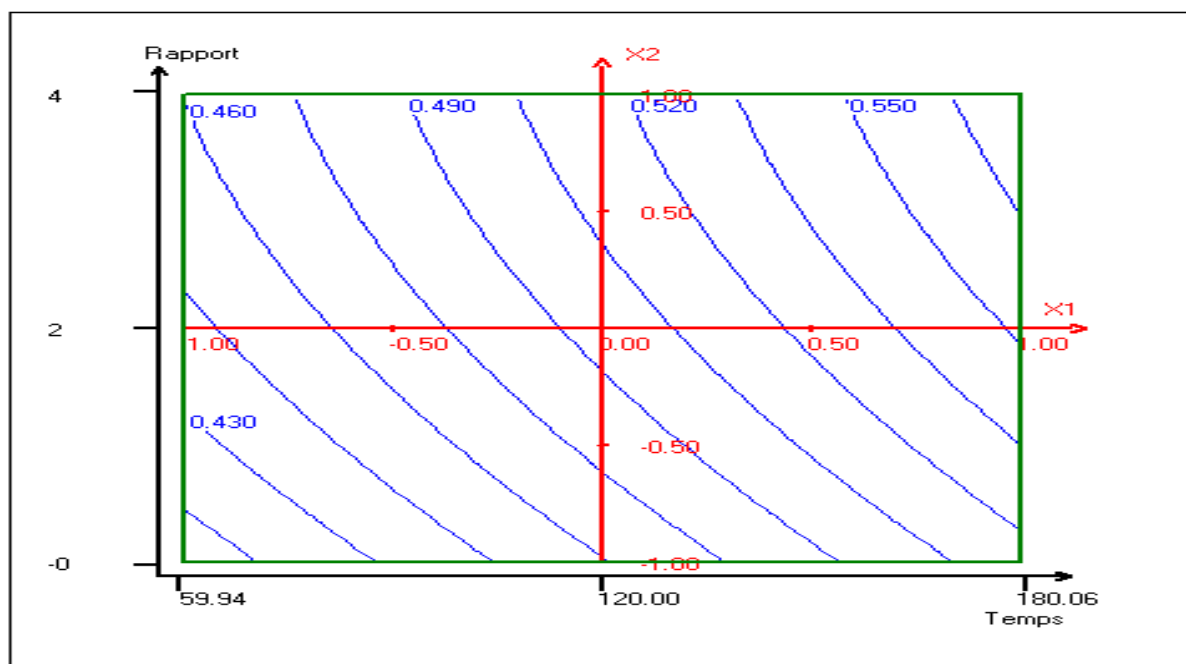


Figure 31 : Graphe des courbes d'isoréponses pour le rendement en huile essentielle de *P. lentiscus*.

La figure 32 montre que la variation des facteurs étudiés a une contribution très importante sur la variation du rendement en huile essentielle de *P. lentiscus* qui passe de 0,40 % à 0,58 %.

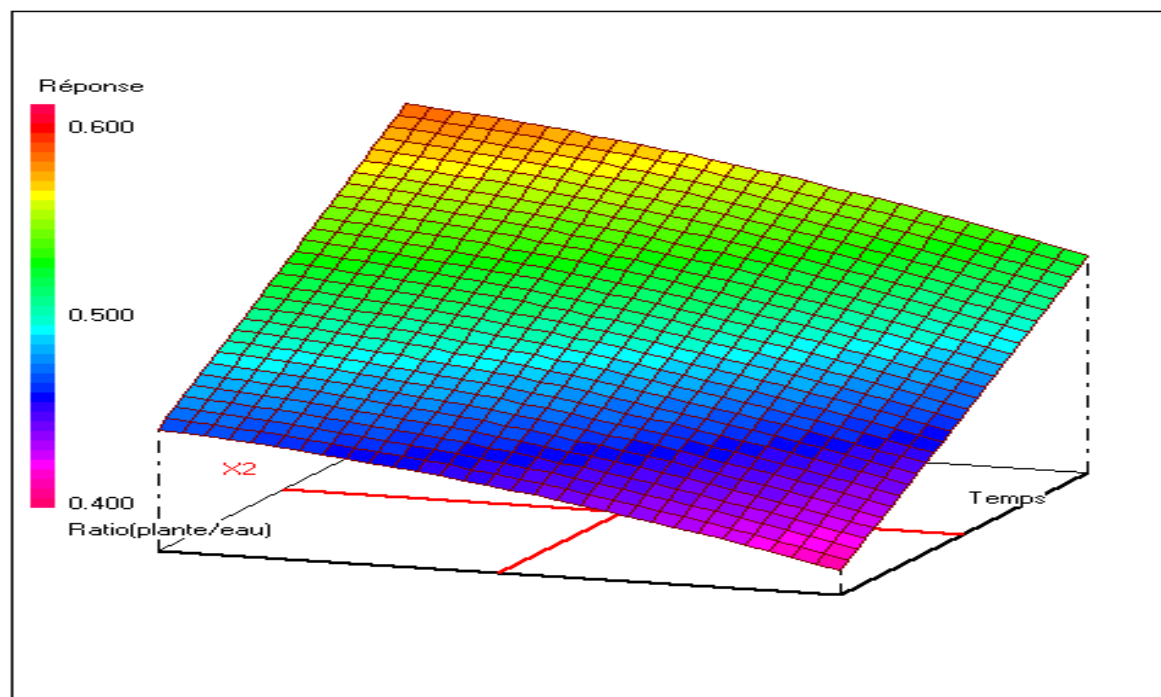


Figure 32 : Graphique de surface de réponse pour le rendement en huile essentielle de *P. lentiscus*.

II.6. Point test

Afin de confirmer les résultats obtenus et finaliser les tests de validité du modèle proposé, nous avons procédé à la vérification par un point test. Ainsi, nous avons réalisé un essai d'extraction par hydrodistillation de l'HE de *P. lentiscus*. Les conditions opératoires du point test ainsi que la réponse expérimentale et celle prédite par le modèle sont représentées dans le tableau 24.

Tableau 24 : Réponse prédite et expérimentale du point test.

Facteur	Valeur codée	Valeur réelle	Réponse prédite (%)	Réponse expérimentale (%)
Temps d'hydrodistillation (min)	0,5	150	0,544	0,550 ± 0,002
Ration (eau/plante) (mL/g)	0,5	3,5		

Les résultats obtenus indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les réponses expérimentales. Ce qui confirme le profil de prédiction du modèle postulé.

II.7. Discussion des résultats de l'optimisation des facteurs

Les résultats de l'analyse de variance (Tableau 22) ont prouvé que le modèle postulé prend en charge la plus grande partie de l'explication des réponses mesurées, ce qui nous a permis de calculer les coefficients des facteurs étudiés et leurs significations. Ainsi, tous les coefficients du modèle se sont révélés significatifs, sauf le coefficient b_{12} qui correspond à l'effet de l'interaction entre le ratio (eau/plante) et le temps de l'hydrodistillation. L'effet de l'interaction des deux facteurs étudiés est considéré comme négligeable et le coefficient b_{12} peut être éliminé de notre modèle.

La méthodologie des surfaces de réponses, nous a permis de modéliser le processus d'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle de *P. lentiscus* en utilisant un plan composite avec un modèle mathématique de second degré.

La rubrique du manque d'ajustement (tableau 22) confirme bien que l'erreur expérimentale est plus petite que le manque d'ajustement. Si nous avons besoin de faire des prévisions de grande précision et nous voulons améliorer les statistiques, le modèle trouvé ne serait pas suffisant et il faudrait adopter un modèle qui réduit le manque d'ajustement. Dans notre cas, cette précision nous convient et nous ne chercherons aucun autre modèle.

Pour finaliser les tests de validation du modèle retenu, l'outil de point test nous a permis de confirmer le profil de prédiction de notre modèle grâce auquel nous avons pu tracer les graphes des courbes d'isorréponses et de surfaces de réponses (Figures 31 ; 32).

Nos résultats concordent avec ceux trouvés pour d'autres espèces telles que *Pelargonium Graveolens*, *Myrtus communis*, *Rosmarinus officinalis* et *Thymus vulgaris* [149 ; 150].

Comme nous l'avons déjà prouvé lors de l'étude de criblage, la minimisation du rapport (plante/eau) entraîne une baisse du rendement en HE. En fait, une quantité élevée de la matière végétale dans l'eau empêche la vapeur d'eau formée dans la partie inférieure du réservoir de monter dans le tube de condensation, ce qui provoque une diminution du rendement [149].

En ce qui concerne le temps d'hydro-distillation, la cinétique d'extraction semble être généralisable à toutes les espèces végétales soumises à l'extraction des huiles essentielles. En fait, l'épuisement total de la masse végétale traitée est pratiquement impossible, elle demanderait une durée trop longue. Logiquement, on ne distille jamais une plante jusqu'à ce qu'on ne récupère plus aucune trace d'huile essentielle, mais on distille jusqu'à ce que les résultats obtenus ne justifient plus les coûts de la poursuite de l'opération de distillation. En effet, la quantité d'huile essentielle récupérée par unité de temps commence à baisser très rapidement, après la phase exponentielle de départ, alors que les coûts restent constants [132].

En suivant cette logique, nous pouvons avoir le rendement recherché dans le domaine d'étude pour des conditions opératoires variées. Ainsi, un rendement de 0,55 % peut être obtenu en utilisant un ratio (plante/ eau) de valeur 1/4 (g/mL) avec un temps de 150 min.

Ce même rendement peut aussi, être obtenu avec un ratio de 1/3 (g/mL) et un temps d'hydrodistillation de 180 min.

Il sera bien avisé de choisir les conditions les plus avantageuses économiquement. pour avoir un rendement de 0,5 % d'HE de *P. lentiscus*, l'expérimentateur peut diminuer le temps d'extraction de 165 à presque 95 min, voir un gain de 70 min, juste avec une simple variation du ratio (plante/ eau) dans le domaine d'étude.

III. CONCLUSION

L'hydrodistillation est une voie de valorisation des ressources végétales aromatiques et médicinales par l'extraction des huiles essentielles. Son efficacité dépend à la fois du matériel végétal et du procédé d'extraction mis en œuvre.

Dans cette partie d'étude, nous avons pu modéliser et optimiser l'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*, grâce aux plans d'expériences, et plus précisément à la méthodologie de surface de réponse via un plan composite. Ce plan associé à un modèle mathématique sous forme de polynôme du second degré, a permis de calculer la réponse moyenne, les effets des facteurs et les interactions entre ces facteurs. Ainsi, l'effet des différents paramètres étudiés sur le processus d'extraction a été étudié. Le rendement en huile essentielle selon le modèle mathématique postulé et validé dépend des termes linéaires b_1 , b_2 et des termes quadratiques b_{11} , b_{22} qui correspond au temps d'hydrodistillation et au ratio (plante/eau) respectivement.

La méthodologie de surface de réponse a été un outil utile d'enquêter sur les conditions optimales de l'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*.

Pour cette plante, un temps d'hydrodistillation de 180 min et un ratio (plante/ eau) de 1/4 g/mL présentent les conditions opératoires optimales pour maximiser le rendement en HE. Mais il sera toujours possible d'aviser de choisir les conditions les plus avantageuses économiquement en se basant sur le profil d'isoreponse obtenue ainsi que la surface de réponse.

Ces résultats peuvent être une base pour l'extrapolation de l'optimisation des conditions expérimentales de l'extraction de l'HE de lentisque par procédé pilote ou industriel. Donc, ils peuvent représenter un grand intérêt économique, surtout après la confirmation de l'effet du temps de l'hydrodistillation et du ratio (plante/ eau) sur la maximisation du rendement.

F. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES MELANGES A BASE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *Pistacia lentiscus* ET D'AUTRES HUILES ESSENTIELLES

Durant les dernières années, un intérêt accru s'est focalisé sur les substances biologiquement actives isolées des plantes [151], notamment en vue de l'élimination des micro-organismes pathogènes en raison de la résistance de ces derniers vis-à-vis des antibiotiques [66]. L'intérêt progressif de l'utilisation de ces plantes a poussé à la recherche de nouvelles méthodologies et à la conception appropriée pour développer de nouveaux produits à valeur thérapeutique avec d'efficaces principes actifs anti-infectieux en général et antibactériens en particulier [152 ; 153].

Depuis la découverte des divers effets additifs, synergiques et antagonistes et de leur importance dans le domaine thérapeutique, les interactions entre les agents biologiquement actifs sont devenues un sujet important pour la recherche scientifique [154].

L'utilisation d'une technique de « plans d'expériences » tel que la méthodologie des plans de mélange, peut être considérée comme une innovante approche, pour potentialiser et optimiser les effets biologiques des extraits des plantes.

I. MATERIEL ET METHODES

I.1. Souches bactériennes

L'effet antibactérien d'huiles essentielles a été testé *in vitro* contre les souches bactériennes suivantes : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 3366, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Escherichia coli* ATCC 25922. Toutes ces souches ont été conservées dans 20% de glycérol à -20°C.

La méthode de suspension directe des colonies a été utilisée pour la préparation des inoculums. Les bactéries ont été repiquées dans l'agar Luria Bertani (LB) et les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Une boucle complète de colonie isolée a été transférée aseptiquement dans une solution physiologique saline et la turbidité de la suspension a été ajustée à 0,5 McFarland [98].

I.2. Huiles essentielles

Pour réaliser cette étude, des feuilles de *Pistacia lentiscus* ont été recueillies de la forêt d'Ifran à la région de Taounate pour l'extraction. Les huiles essentielles de *Thym vulgaris*, *Origanum compactum*, *Mentha pulegium*, *Artemisia absinthium*, *Myrtus communis*, *Salvia officinalis*,

Rosmarinus officinalis, *Cymbopogon citrates* et *Pelargonium graveolens* ont été extraites des parties aériennes de ces plantes recueillies précédemment du jardin botanique de l'Institut National des Plantes Aromatiques et Médicinales de Taounates. L'extraction de ces huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation.

I.3. Mélanges des huiles essentielles

I.3.1. Mélanges binaires des huiles essentielles

Neuf mélanges ont été préparés à base des huiles essentielles citées précédemment et mises dans des tubes Eppendorf stériles, d'une façon à avoir dans chaque tube un mélange de 50 % de l'huile de *P. lentiscus* avec 50 % de l'un des huiles essentielles à tester.

I.3.2. Mélanges tertiaires des huiles essentielles

Soit un mélange ayant 3 constituants. Le premier constituant représente un certain pourcentage du mélange X_1 , le second constituant, un autre pourcentage du mélange X_2 etc. Ainsi, chaque constituant participe, pour certaine part, au mélange total et la somme de l'ensemble des teneurs des constituants du mélange est de 100 % (tableau 25).

En appliquant cette règle, des mélanges de trois huiles essentielles ont été préparés. Le premier constituant de tous les mélanges était l'HE de *P. lentiscus*. Alors que le choix des deux autres constituants du mélange a été basé sur les résultats obtenus du test des mélanges binaires.

L'utilisation de la méthode des plans de mélanges "centrés augmentés" nous a permis de définir les proportions des constituants des mélanges. Ainsi, douze mélanges ont été préparés afin de tester leurs activités antibactériennes contre chacune des souches bactériennes étudiées.

Le tableau 25 présente la variation des proportions des trois constituants des mélanges à tester :

Tableau 25 : Matrice d'expériences générée de l'étude des mélanges.

N° de mélange	X1 (%)	X2 (%)	X3 (%)
1	100,00	0,00	0,00
2	0,00	100,00	0,00
3	0,00	0,00	100,00
4	50,00	50,00	0,00
5	50,00	0,00	50,00
6	0,00	50,00	50,00
7	33,33	33,33	33,33
8	33,33	33,33	33,33
9	33,33	33,33	33,33
10	66,67	016,67	16,67
11	16,67	066,67	16,67
12	16,67	016,67	66,67

I.4. Activité antibactérienne

I.4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque

Le test de l'activité antibactérienne a été réalisé par la méthode de diffusion sur disque [98]. Cette méthode (Figure 33) permet d'évaluer l'activité antibactérienne d'une huile essentielle (ou mélange). Bien qu'elle soit reconnue, comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs.

Des boîtes de Pétri (90 mm de diamètre) contenant LB- Agar ont étéensemencées en utilisant l'inoculum préalablement préparé. L'ensemencement a été fait de manière à assurer une répartition homogène des bactéries, puis l'excès de liquide a été éliminé avec une pipette Pasteur et les boîtes ont été séchées pendant 20 minutes. Les disques de papier filtre stérile (6 mm de diamètre) ont été imbibés individuellement avec 10 μ L d'huile essentielle (ou mélange) à tester, puis placés à la surface des boîtesensemencées. Ces boîtes ont été placées à 4°C pendant 2 h. Après incubation pendant 24 h à 37°C. Le diamètre d'inhibition, qui traduit l'activité antibactérienne de l'huile essentielle (ou mélange), est ainsi déterminé. Tous les essais ont été effectués en triple. La sensibilité des différentes souches *vis-à-vis* des HE étudiées est classée suivant le diamètre d'inhibition (*DI*) selon les critères suivants : non sensible (-) pour $DI \leq 8$ mm ; sensible (+) pour 9-14 mm ; très sensible (++) pour 15-19 mm et extrêmement sensible (+++) pour $DI \geq 20$ mm [155].

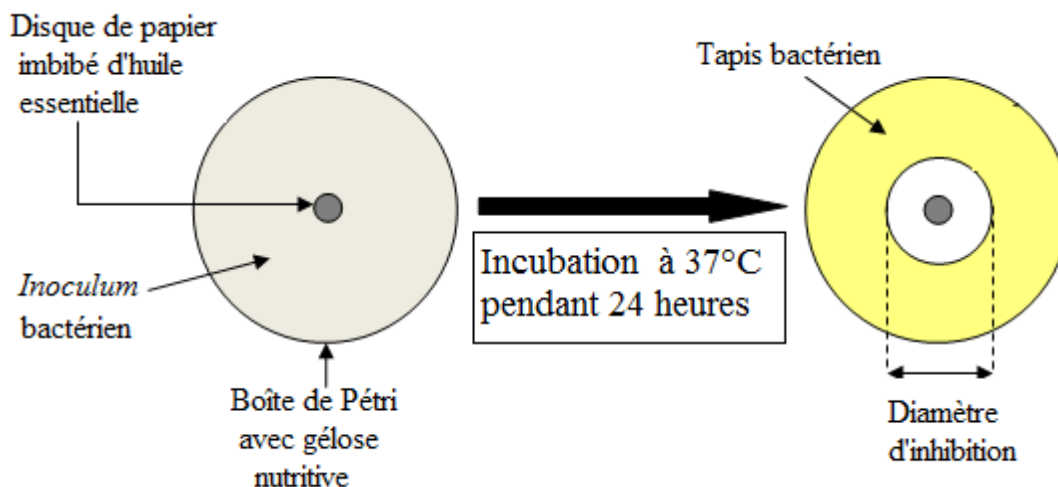


Figure 33 : Principe de la méthode de diffusion par disque.

1.4.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne.

La méthode de micro-dilution en milieu liquide a été utilisée pour évaluer la concentration minimale inhibitrice (CMI) selon les directives CLSI M7-A7 (CLSI, 2007). L'agar à 0,15% (m/v) a été utilisé comme émulsifiant. Tout d'abord, 50 μL de Mueller-Hinton (MH) liquide complété avec de l'agar bactériologique (0,15% m/v) ont été distribués à partir du deuxième au 12^{ème} puit d'une microplaque de polypropylène à 96 puits (Figure 34). Les dilutions des huiles essentielles (ou mélanges) à tester ont été préparées dans le MH complété avec de l'agar (0,15% m/v). Un volume de 100 μL de ces suspensions a été ajouté au premier puits de chaque ligne de microplaque et 50 μL ont été transférés du deuxième au 11 puit pour dilution scalaire de manière à générer une gamme de dilution de base 2. Le 12^{ème} puit de chaque ligne a été considéré comme contrôle de la croissance. Ensuite, 50 μL de suspension bactérienne a été ajoutée à chaque puits à une concentration finale d'environ 106 UFC / mL. La résazurine a été utilisé comme indicateur de la croissance bactérienne [156].

La concentration finale de l'huile essentielle (ou mélange) se situait entre 16 et 0,0015% (v/v). Après incubation à 37°C pendant 20 h ; 5 μL de la résazurine ont été ajoutés à chaque puits [156]. Après une incubation à 37°C pendant 2 h, la CMI a été déterminée comme étant la plus faible concentration d'huile essentielle qui a empêché un changement de couleur de résazurine [104 ; 157]. Des expériences ont été menées en trois exemplaires.

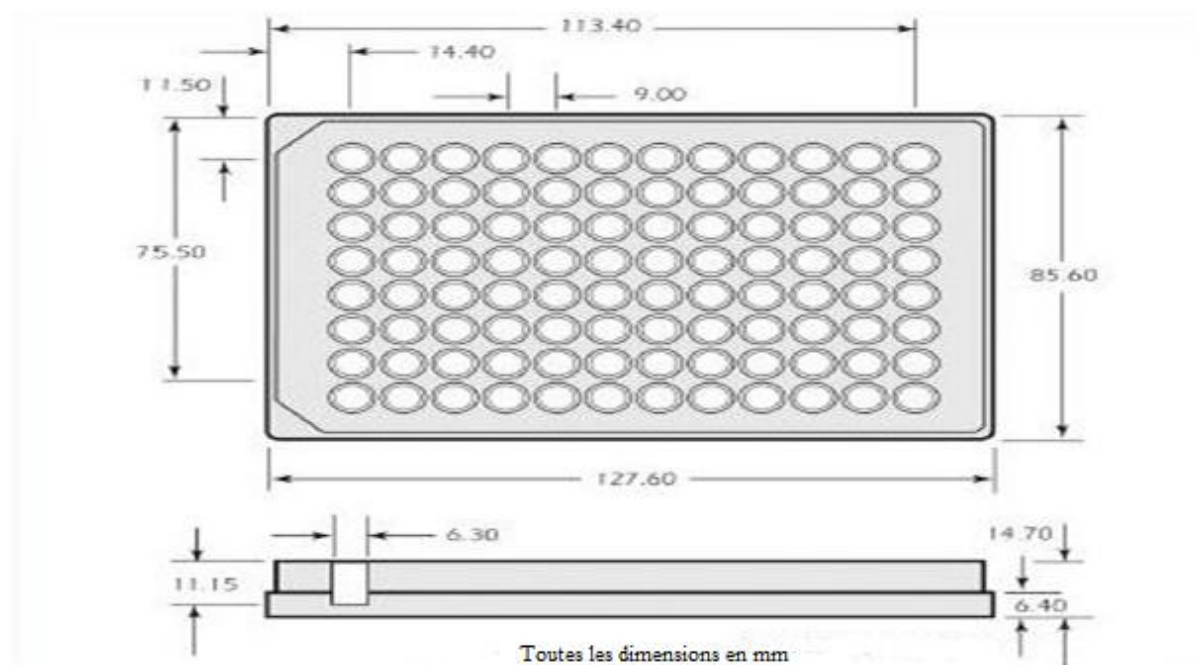


Figure 34 : Microplaque en polypropylène à 96 puits.

I.4.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Pour déterminer la concentration Minimale Bactéricide (CMB) des HE (ou mélanges) à tester, 2 μ L de chaque puit négatif de la microplaque, dans lequel la croissance microbienne n'a pas été observée, ont été mis dans des boîtes LB et ont été incubée à 37°C pendant 24 h. CMB correspond à la concentration la plus faible de l'huile essentielle au cours de laquelle le micro-organisme mis en incubation a été tué complètement [158]. Chaque essai a été réalisé en triple.

II. RESULTATS ET DISCUSSIONS

II.1. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *P. lentiscus*

II.1.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque

Les résultats ont prouvé que l'HE de *P. lentiscus* avait une activité significative contre *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* avec des diamètres des zones d'inhibition de 15 ± 1 mm ; $13 \pm 0,57$ mm ; $12,33 \pm 0,57$ mm et 8 ± 1 mm respectivement (Tableau 26).

Tableau 26 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *P. lentiscus* exprimé par les diamètres des zones d'inhibition.

Souche bactérienne	Bs	Sa	Ec	Pa
Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	15 ± 1	$13 \pm 0,57$	$12,33 \pm 0,57$	8 ± 1

Bs: *Bacillus subtilis*, Ec: *Escherichia coli*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*

II.1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles de *Pistacia lentiscus* contre *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa* sont présentés dans le tableau 27. Comme nous pouvons le remarquer, l'huile essentielle testée a montré un effet antibactérien remarquable. Ainsi, l'HE des feuilles de *P. lentiscus* était active contre toutes les souches bactériennes étudiées. En effet, les valeurs de CMI varient entre 4 et 0,015% (v/v). Par conséquent, l'huile essentielle des feuilles présente un effet antibactérien avec des valeurs de CMI de 0,015 ; 0,5 ; 1 et 4% respectivement contre *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. En outre, nous pouvons aussi noter que *E. coli* et *P. aeruginosa* (Gram négatif) étaient plus résistantes à l'huile essentielle des feuilles par rapport à *S. aureus* et *B. subtilis* (Gram positif).

Tableau 27 : Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle de *P. lentiscus*.

Concentration %	Bs	Sa	Ec	Pa
16	-	-	-	-
8	-	-	-	-
4	-	-	-	-
2	-	-	-	+
1	-	-	-	+
0,5	-	-	+	+
0,25	-	+	+	+
0,125	-	+	+	+
0,062	-	+	+	+
0,031	-	+	+	+
0,015	-	+	+	+

Bs: *Bacillus subtilis*, Ec: *Escherichia coli*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*.

II.1.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

En ce qui concerne les valeurs CMB de l'huile essentielle testée (Tableau 28), nous avons constaté que les valeurs CMB ont été semblables à leurs valeurs CMI contre *P. aeruginosa* et *B. subtilis*.

En outre, nous avons noté que les valeurs CMB étaient 2 ; 4 ; 8 et 2 fois plus élevée que les CMI contre *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* respectivement de MIC pour L'HE des feuilles de *Pistacia lentiscus*.

Tableau 28 : Détermination des valeurs des concentrations minimales bactéricides (CMB) de l'huile essentielle de *P. lentiscus* contre les bactéries testées.

Concentration %	Bs	Sa	Ec	Pa
16	-	-	-	-
8	-	-	-	-
4	-	-	+	+
2	-	-	+	+
1	-	+	+	+
0,5	-	+	+	+
0,25	-	+	+	+
0,125	-	+	+	+
0,062	-	+	+	+
0,031	-	+	+	+
0,015	+	+	+	+

Bs: *Bacillus subtilis*, Ec: *Escherichia coli*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*.

II.2. Activité antibactérienne des mélanges binaires des huiles essentielles

La majorité des huiles essentielles possède une activité antimicrobienne, mais dans des gammes très larges.

Les résultats de l'activité antibactérienne des mélanges binaires des HE ont été évalués en comparant la zone d'inhibition expérimentale du mélange d'HE obtenue expérimentalement à la zone d'inhibition théorique du mélange d'HE calculé comme la moitié de la zone d'inhibition résultante de l'effet de l'huile de *P. lentiscus* seule additionnée à la moitié de la zone d'inhibition résultante de l'effet de la deuxième composante du mélange.

Les tableaux 29 et 30 présentent les résultats obtenus de l'activité antibactérienne des neuf HE testées seules et en mélange avec l'HE de *P. lentiscus* contre les deux souches Gram positives *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* ainsi que les deux souches Gram négatives *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 29 : Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles seules et en mélange avec l'huile de *P. lentiscus* contre les souches bactériennes Gram positive testées.

Huile essentielle	Diamètre de la zone d'inhibition HE seule (mm)		Diamètre de la zone d'inhibition (Mélange avec <i>P. lentiscus</i>) (mm)		Rapport d'augmentation de la zone d'inhibition (%)	
	<i>Bs</i>	<i>Sa</i>	<i>Bs</i>	<i>Sa</i>	<i>Bs</i>	<i>Sa</i>
	<i>T. vulgaris</i>	27	50	14	29	- 33,33
<i>O. compactum</i>	41	44	18	34	- 35,71	+ 20,72
<i>M. pulegium</i>	14	14	14	12	- 3,45	- 8,85
<i>A. absinthium</i>	10	16	7	11	- 44,00	- 22,34
<i>M. communis</i>	14	12	15	11	+ 3,45	-9,57
<i>S. officinalis</i>	10	11	10	10	- 20,00	- 14,27
<i>R. officinalis</i>	7	10	9	14	- 18,18	+ 25,39
<i>C. citratus.</i>	44	43	16	26	- 45,76	- 6,01
<i>P. graveolens</i>	12	12	12	12	- 11,11	- 1,35

Bs: Bacillus subtilis ; Sa: Staphylococcus aureus

Tableau 30 : Les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles seules et en mélange avec l'huile de *P. lentiscus* contre les souches bactériennes Gram négative testées.

Huile essentielle	Diamètre de la zone d'inhibition de l'HE seule (mm)		Diamètre de la zone d'inhibition (Mélange avec <i>P. lentiscus</i>) (mm)		Rapport d'augmentation de la zone d'inhibition (%)	
	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>
	<i>T. vulgaris</i>	27	10	20	8	0,00
<i>O. compactum</i>	35	8	27	8	+ 12,5	0,00
<i>M. pulegium</i>	19	10	17	9	+ 6,25	0,00
<i>A. absinthium</i>	12	9	10	9	- 20,00	+ 5,88
<i>M. communis</i>	13	8	12	9	- 7,69	+ 12,50
<i>S. officinalis</i>	9	7	10	7	- 9,09	- 6,66
<i>R. officinalis</i>	15	8	10	9	- 28,57	+ 12,50
<i>C. citratus</i>	30	8	24	7	+11,63	- 12,50
<i>P. graveolens</i>	9	7	11	7	0,00	- 6,66

Ec: Escherichia coli ; Pa: Pseudomonas aeruginosa

II.3. Activité antibactérienne des mélanges tertiaires des huiles essentielles

Le choix des trois HE utilisées dans chaque mélange testé dans cette étude est basé sur les résultats du test des mélanges binaires des HE. Ainsi, l'HE de *P. lentiscus* n'a présenté d'effet améliorant qu'en interaction avec une seule HE (*M. communis*) contre *B. subtilis*. Le reste de l'étude se limite alors sur l'activité antibactérienne de trois mélanges tertiaires des HE contre les trois souches bactériennes *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*.

II.3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque contre *Escherichia coli*

Cette étude consiste à optimiser l'activité antibactérienne contre *Escherichia coli*. Le choix des constituants du mélange est basé sur les résultats du test des mélanges binaires des HE contre *E. coli*. Ainsi, le mélange tertiaire est constitué des HE de : *Pistacia lentiscus*, *Origanum compactum* et *Cymbopogon citrates*.

Nous avons supposé que la réponse (diamètre d'inhibition) est modélisable par un polynôme de troisième degré :

$$Y = b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 + b_{123} X_1 X_2 X_3 \quad \text{éq. 24}$$

Où : Y : le diamètre d'inhibition (mm) ; b_i : les coefficients des facteurs ; X_i : les facteurs étudiés.

Les résultats des mesures des diamètres d'inhibition des douze mélanges testés figurent sur le tableau 31.

Tableau 31 : Plan d'expérimentation de l'étude de mélange contre *Escherichia coli*.

N° de mélange	<i>Pistacia lentiscus</i>	<i>Origanum compactum</i>	<i>Cymbopogon citrates</i>	Diamètre d'inhibition (mm)
1	1,000	0,000	0,000	10,000
2	0,000	1,000	0,000	35,000
3	0,000	0,000	1,000	30,000
4	0,500	0,500	0,000	27,000
5	0,500	0,000	0,500	24,000
6	0,000	0,500	0,500	12,000
7	0,333	0,333	0,333	10,000
8	0,333	0,333	0,333	10,000
9	0,333	0,333	0,333	9,000

Les données de base pour l'analyse de variance qui correspondent aux : réponses mesurées, réponses calculées par le modèle et les valeurs des résidus, sont représentés dans le tableau 32.

Tableau 32 : Données de base de l'analyse de variance d'étude de mélange contre *Escherichia coli*.

Essai n°	Réponses mesurées	Réponses calculées	Résidus
1	10,000	9,982	0,018
2	35,000	34,619	0,381
3	30,000	29,801	0,199
4	27,000	26,600	0,400
5	24,000	23,782	0,218
6	12,000	11,419	0,581
7	10,000	9,067	0,993
8	10,000	9,067	0,993
9	9,000	9,067	-0,067

L'analyse de variance est basée sur l'utilisation de la somme des carrés des réponses mesurées corrigée de la moyenne (SCRM_m) et la somme des carrés des réponses calculées corrigée de la moyenne (SCRCC_m).

Le tableau 33 montre que le modèle choisi explique bien les résultats expérimentaux du plan exécuté avec un R² d'une valeur de 0,992 et R²_a d'une valeur de 0,989.

Tableau 33 : Analyse de la variance de l'étude de mélange contre *Escherichia coli*.

Source de variation	Somme des carrés	Degré de liberté	Carré moyen	Rapport	<i>p-value</i>
Régression	893,6206	6	148,9368	100,9145	0,0002 ***
Résidus	7,3794	5	1,4759		
Validité	6,7127	3	2,2376	7,4267	0,133
Erreur	0,6667	2	0,3333		
Total	901	11			

*** : Coefficient hautement significatif ; **: Coefficient très significatif ; * : Coefficient significatif

Le modèle devrait servir à faire des prévisions pour les réponses. Il est donc important de savoir s'il représente bien le phénomène que nous étudions.

Il est donc nécessaire de s'assurer de sa validité. Le tableau 34 montre que les valeurs prédites par notre modèle sont comparables aux valeurs mesurées aux points test.

Tableau 34 : Comparaison des réponses mesurées et calculées aux points tests de l'étude de mélange contre *Escherichia coli*.

Point de contrôle	Valeur mesurée	Valeur prédite
Y ₁₀	13,000	13,654
Y ₁₁	16,000	17,744
Y ₁₂	14,000	15,198

La part de chaque coefficient du modèle dans l'explication des réponses est représentée dans le tableau de l'analyse détaillée des coefficients du modèle (Tableau 35)

Tableau 35 : Effet des coefficients du modèle de l'étude de mélange contre *Escherichia coli*.

Nom	Coefficient	Ecart-Type	t.exp.	p-value
a ₁	9,982	1,173	8,51	0,0006 ***
a ₂	34,691	1,173	29,51	<0,000 ***
a ₃	29,801	1,73	25,40	<0,0001 ***
a ₁₂	17,201	5,908	2,91	0,033 *
a ₁₃	15,564	5,908	2,63	0,0459 *
a ₂₃	- 83,162	5,908	- 14,08	0,0001 ***
a ₁₂₃	- 273,657	32,143	- 8,51	0,0006 ***

Les termes les plus significatifs sont ceux qui représentent les effets des huiles pures (a₁, a₂ et a₃), celui de la combinaison binaire entre l'huile essentielle de *O. compactum* et celui de *C. citrates* (a₂₃) et celui de la combinaison tertiaire (a₁₂₃). Les autres termes restants sont aussi significatifs, mais par un degré d'importance plus bas.

Le calcul des coefficients conduit à un modèle :

$$Y = 9,982 X_1 + 34,691 X_2 + 29,801 X_3 + 17,201 X_1 X_2 + 15,564 X_1 X_3 - 83,162 X_1 X_2 X_3 - 273,657 X_1 X_2 X_3 \quad \text{éq. 25}$$

Maintenant que le modèle est validé, nous pouvons l'utiliser pour tracer les courbes d'iso-réponses. Nous avons ainsi une idée de l'évolution de la grandeur d'intérêt en fonction des proportions de chacun des constituants (Figure 35).

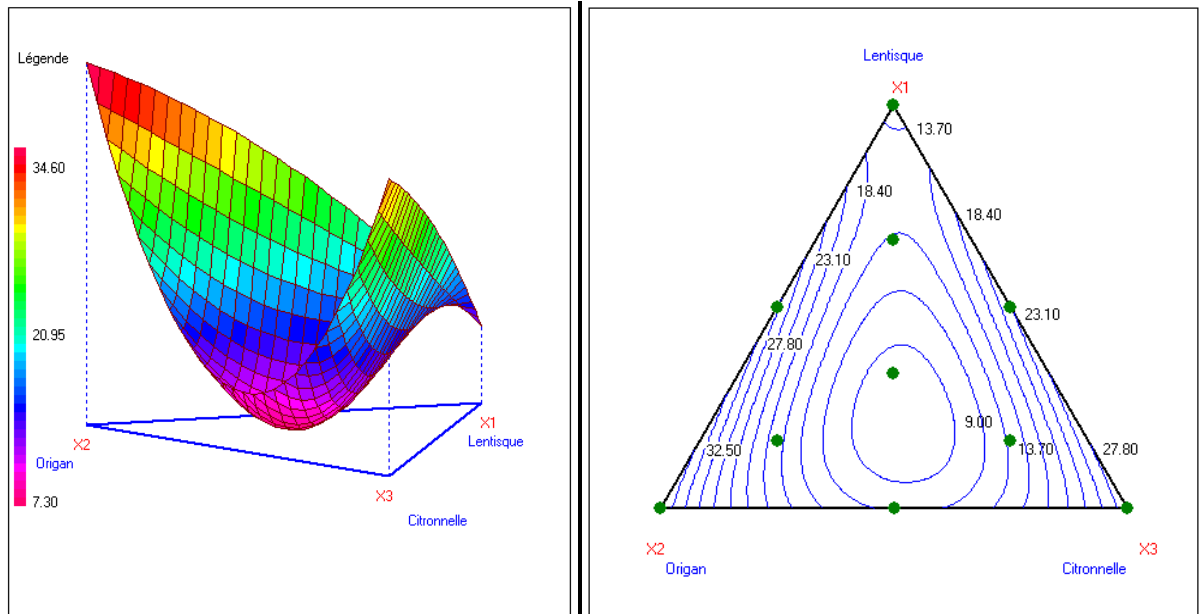


Figure 35 : Graphe de surface de réponse pour le diamètre des zones d'inhibition du mélange contre *Escherichia coli* (a) Graphe des courbes d'isoréponses pour le diamètre des zones d'inhibition du mélange contre *Escherichia coli* (b).

II.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque contre *Pseudomonas aeruginosa*

Le mélange tertiaire est constitué des HE de : *Pistacia lentiscus*, *Myrtus communis* et *Rosmarinus officinalis*,

Nous avons supposé que la réponse (diamètre d'inhibition) est modélisable par un polynôme de troisième degré (éq. 24) :

$$Y = b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 + b_{123} X_1 X_2 X_3$$

Où :

Y : le diamètre d'inhibition (mm) ;

b_i : les coefficients des facteurs ;

X_i : les facteurs étudiés.

Les résultats des mesures des diamètres d'inhibition des douze mélanges testés figurent sur le tableau 36.

Tableau 36 : Plan d'expérimentation de l'étude de mélange contre *Pseudomonas aeruginosa*.

N° de mélange	<i>Pistacia lentiscus</i>	<i>Origanum compactum</i>	<i>Cymbopogon citrates</i>	Diamètre d'inhibition (mm)
1	1,000	0,000	0,000	8,000
2	0,000	1,000	0,000	8,000
3	0,000	0,000	1,000	8,000
4	0,500	0,500	0,000	9,000
5	0,500	0,000	0,500	9,000
6	0,000	0,500	0,500	8,000
7	0,333	0,333	0,333	9,000
8	0,333	0,333	0,333	9,000
9	0,333	0,333	0,333	10,000

Le tableau 37 montre que le modèle choisi n'explique pas les résultats expérimentaux du plan exécuté avec un R^2 d'une valeur de 0,671 et R^2_a d'une valeur de 0,396.

Tableau 37 : Analyse de la variance de l'étude de mélange contre *Pseudomonas aeruginosa*.

Source de variation	Somme des carrés	Degré de liberté	Carré moyen	Rapport	<i>p-value</i>
Régression	4,1911	6	0,8382	2,4427	0,153
Résidus	2,0589	5	0,3432		
Total	6,2500	11			

*** : Coefficient hautement significatif ; ** : Coefficient très significatif ; * : Coefficient significatif

II.3.3. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque contre *Staphylococcus aureus*

L'objectif de la présente étude est d'optimiser l'activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*. En se basant sur les résultats du test des mélanges binaires des HE contre *S. aureus*, seules les HE qui présentent une synergie avec l'HE de *P. lentiscus* ont été sélectionnées. Ainsi, le mélange tertiaire est constitué des HE de : *Pistacia lentiscus*, *Origanum compactum* et *Rosmarinus officinalis*.

Nous avons supposé que la réponse (diamètre d'inhibition) est modélisable par un polynôme de troisième degré (éq. 24):

$$Y = c_1 X_1 + c_2 X_2 + c_3 X_3 + c_{12} X_1 X_2 + c_{13} X_1 X_3 + c_{23} X_2 X_3 + c_{123} X_1 X_2 X_3$$

Où : Y : la réponse étudiée (mm) ; c_i : les coefficients des facteurs ; X_i : les facteurs étudiés.

Les résultats des mesures des diamètres d'inhibition des douze mélanges testées figurent sur le tableau 38.

Tableau 38 : Plans d'expérimentation de l'étude de mélange contre *Staphylococcus aureus*.

N° de mélange	<i>Pistacia lentiscus</i>	<i>Origanum compactum</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Diamètre d'inhibition (mm)
1	1,000	0,000	0,000	12,000
2	0,000	1,000	0,000	44,000
3	0,000	0,000	1,000	10,000
4	0,500	0,500	0,000	34,000
5	0,500	0,000	0,500	14,000
6	0,000	0,500	0,500	19,000
7	0,333	0,333	0,333	12,000
8	0,333	0,333	0,333	12,000
9	0,333	0,333	0,333	12,000

Les réponses mesurées, réponses calculées par le modèle et les valeurs résidus, sont représentés dans le tableau 39.

Tableau 39 : Données de base de l'analyse de variance d'étude de mélange contre *Staphylococcus aureus*.

Essai n°	Réponses mesurées	Réponses calculées	Résidus
1	12,000	11,382	0,618
2	44,000	43,564	0,436
3	10,000	10,655	- 0,655
4	34,000	32,945	1,055
5	14,000	14,037	- 0,037
6	19,000	19,219	- 0,219
7	12,000	11,600	0,400
8	12,000	11,600	0,400
9	12,000	11,600	0,400

Les sommes de carrés sont constamment utilisées dans les calculs qui permettent d'évaluer la qualité des modèles mathématiques. La somme des carrés des réponses mesurées est décomposée en plusieurs sommes de carrés qui jouent un rôle important dans l'analyse de la somme des carrés et dans l'analyse de la variance [117].

Le tableau 40 montre que le modèle choisi explique bien les résultats expérimentaux du plan exécuté avec un R^2 d'une valeur de 0,990 et R^2_a d'une valeur de 0,978.

Tableau 40 : Analyse de la variance de l'étude de mélange contre *Staphylococcus aureus*.

Source de variation	Somme des carrés	Degré de liberté	Carré moyen	Rapport	<i>p-value</i>
Régression	1,27783 10^3	6	2,12971. 10^2	81,3432	0,0003 ***
Résidus	13,0908	5	2,61818		
Total	1,26625 10^3	11			

*** : Coefficient hautement significatif ; **: Coefficient très significatif ; * : Coefficient significatif

Nous avons comparé les réponses mesurées aux points de contrôle Y_{10} , Y_{11} et Y_{12} avec les réponses calculées en ces mêmes points. Le tableau 41 montre que les valeurs prédites par notre modèle sont comparables aux valeurs mesurées. Nous pouvons conclure que le modèle peut être utilisé pour faire des prévisions dans tout le domaine d'étude.

Tableau 41 : Comparaison des réponses mesurées et calculées aux points tests de l'étude de mélange contre *Staphylococcus aureus*.

Point de contrôle	Valeur mesurée	Valeur prédite
Y_{10}	12,000	14,254
Y_{11}	25,000	26,708
Y_{12}	11,000	9,436

Nous pouvons ainsi construire le tableau 42 de l'analyse détaillée des coefficients du modèle qui indique la part de chaque coefficient dans l'explication des réponses et qui permet de simplifier le modèle.

Tableau 42 : Effet des coefficients du modèle de l'étude de mélange contre *Staphylococcus aureus*.

Nom	Coefficient	Ecart-Type	t-student	<i>p-value</i>
c_1	11,382	2,18	7,28	0,0011**
c_2	43,564	2,18	27,88	< 0,0001***
c_3	10,655	2,18	6,82	0,0014***
c_{12}	21,890	2,96	2,78	0,0386 *
c_{13}	12,073	2,96	1,53	0,184
c_{23}	- 32,563	2,96	-4,01	0,010 *
c_{123}	- 284,434	3,60	-6,64	0,0016 **

*** : Coefficient hautement significatif ; **: Coefficient très significatif ; * : Coefficient significatif

Les termes les plus significatifs sont ceux qui représentent les effets des HE pures (c_1 , c_2 et c_3), les termes de la combinaison binaire (c_{12} ; c_{23}) et celui de la combinaison tertiaire (c_{123}). Le terme c_{13} n'a pas montré d'effet significatif. Le calcul des coefficients conduit à un modèle :

$$Y = 11,382 X_1 + 43,564 X_2 + 10,655 X_3 + 21,890 X_1 X_2 - 32,563 X_2 X_3 - 284,434 X_1 X_2 X_3 \quad \text{éq. 26}$$

Le modèle permet de tracer les courbes d'isoreponses dans le domaine d'étude (Figure 36).

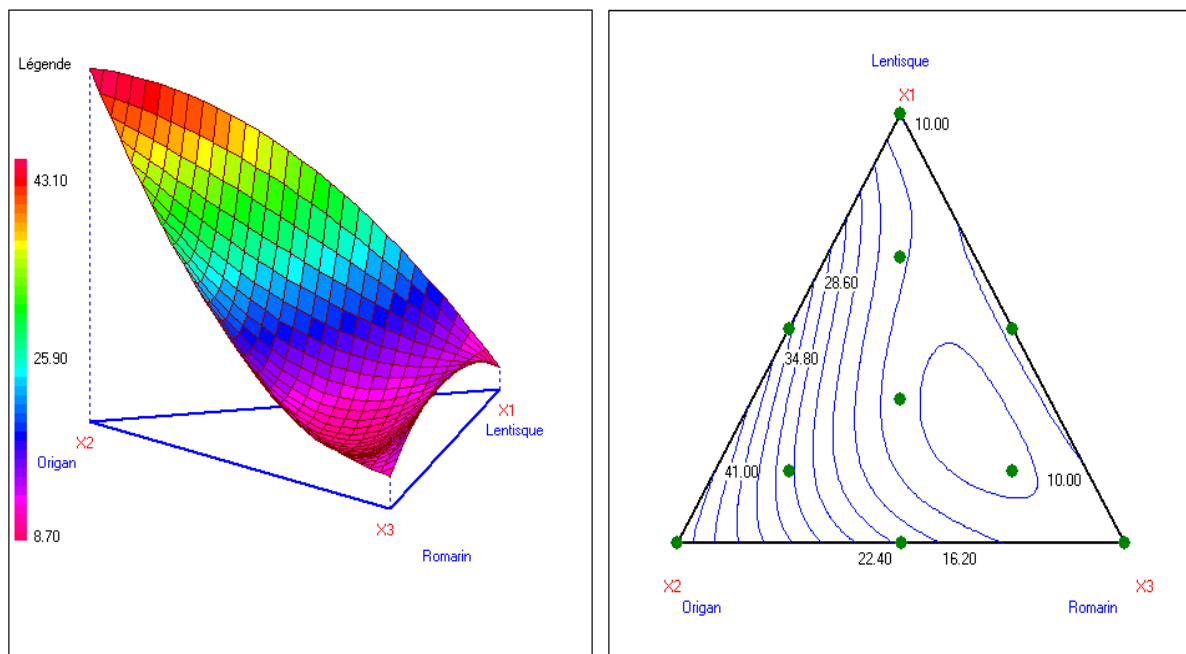


Figure 36 : Graphe de surface de réponse pour le diamètre des zones d'inhibition du mélange contre *Staphylococcus aureus* (a) Graphe des courbes d'isoreponses pour le diamètre des zones d'inhibition du mélange contre *Staphylococcus aureus* (b).

II.4. Discussions des résultats

II.4.1. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *P. lentiscus*

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *P. lentiscus* contre les bactéries testées a montré que les souches Gram-négatives étaient plus résistantes par rapport aux souches Gram positives. Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres auteurs [17 ; 159] qui ont constaté que les souches Gram négatives ont été moins sensibles à cette huile essentielle que les souches Gram positives. *Pseudomonas aeruginosa* a montré une faible sensibilité à l'HE de *P. lentiscus* d'une valeur de CMI de 8%.

En règle générale, les bactéries Gram-négatives sont plus résistantes aux HE que les bactéries Gram-positives, en raison des structures différentes de leur paroi cellulaire. La membrane externe des bactéries Gram négatives contient principalement des molécules

lipopolysaccharides et forme une barrière hydrophile conférant une protection contre les effets des composés très hydrophobes [160].

Le mécanisme d'action attribué à l'HE de *P. lentiscus* n'a pas été étudié en détail dans le passé. Les résultats de cette étude confirment les résultats dans les rapports précédents, qui stipulent que la force et le spectre d'activité varie entre le type Gram des bactéries cibles et les parties étudiées de *P. lentiscus* [15].

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *P. lentiscus* pourrait être attribuée à leur teneur élevée en différents groupes de composés chimiques connus pour leur effet antibactérien (Annexe 3). De nombreux rapports ont montré que α -terpinéol, présent avec un pourcentage élevé dans certaines huiles essentielles présente un effet inhibiteur contre *E. coli*, de la même façon géraniol, présente un effet antibactérien intéressant [81 ; 83 ; 161]. Cependant, les activités antibactériennes des huiles essentielles sont difficiles à mettre en corrélation avec un composé spécifique en raison de leur complexité [153 ; 161].

Certaines études ont permis de conclure que toutes les HE ont une plus grande activité antibactérienne que les principaux constituants en mélange, ce qui suggère que les composants mineurs sont essentiels à l'activité et qu'ils peuvent avoir un effet synergique ou potentialiser l'activité [81 ; 162 ; 163].

II.4.2. Activité antibactérienne des mélanges binaires des huiles essentielles

L'activité antibactérienne d'une huile essentielle pourrait se rapporter à la structure chimique de ses composants, aux proportions dans lesquelles ils sont présents et aux interactions entre eux [164 ; 165]. Nous parlons d'un effet additif lorsque l'effet combiné est égal à la somme des effets individuels. Une synergie est observée lorsque l'effet des substances combinées est supérieur à la somme des effets individuels. Alors qu'un antagonisme est observé lorsque l'effet de l'un ou des deux composés est moins prononcé lorsqu'ils sont utilisés simultanément que lorsqu'ils sont administrés individuellement [166].

A la lumière des résultats obtenus des mélanges binaires des huiles essentielles, nous pouvons constater que les huiles essentielles testées présentaient un large éventail d'effets d'interaction avec l'HE de *P. lentiscus* contre les quatre souches testées, de forts antagonismes à fortes synergies.

En général, l'effet améliorant de l'HE de *P. lentiscus* (changement positif de la zone d'inhibition obtenue pratiquement par rapport à la zone d'inhibition théorique d'interaction) a été plus marqué contre *S. aureus* et *E. coli* qu'à celui obtenue contre *B. subtilis* et *P. aeruginosa*. Ainsi, les interactions entre l'HE de *P. lentiscus* et deux autres HE : *O. compactum* et *R. officinalis* ont été synergiques contre *S. aureus*.

Contre *E. coli*, trois HE : *O. compactum*, *M. pulegium* et *C. citratus* ont présentés des interactions synergiques avec l'HE de *P. lentiscus*. Alors que, seule l'HE de *M. communis* qui a présenté un effet améliorant en mélange avec l'HE de *P. lentiscus*.

Les HE d'*A. absinthium*, *M. communis* et *R. officinalis* ont des interactions synergiques avec l'HE de *P. lentiscus* contre *P. aeruginosa* en utilisant la méthode de diffusion sur disque.

II.4.3. Activité antibactérienne des mélanges tertiaires des huiles essentielles

Les résultats obtenus de l'activité antibactérienne du mélange des HE de *P. lentiscus*, *O. compactum* et *C. citratus* contre *Escherichia coli* ont montré que le modèle mathématique choisi est validé. Ce modèle peut être utilisé pour faire des prévisions dans tout le domaine d'étude et pour tracer les courbes d'isoreponses (figure 35) qui nous permettrons par la suite de trouver les formulations optimales des trois huiles utilisées qui mènent à augmenter la sensibilité d'*E. coli*.

Par contre, l'analyse de variance des résultats des mesures obtenus des diamètres des zones d'inhibition du mélange des huiles essentielles testées contre *P. aeruginosa* montre que le modèle choisi ne permet pas d'expliquer le phénomène étudié. Cela est probablement dû aux valeurs très rapprochées (presque similaires) de toutes les mesures obtenues dans le plan d'expérimentations.

Alors que les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne du mélange des HE de *P. lentiscus*, *O. compactum* et *R. officinalis* contre *S. aureus* ont montré que le modèle mathématique choisi donne une idée générale de la forme de la surface de réponse et permet de déceler les zones du domaine d'étude qui sont intéressantes. Ainsi, nous pouvons profiter de l'effet synergique des interactions entre les trois HE utilisées afin de pouvoir générer des formulations qui mènent à augmenter la sensibilité de *S. aureus* tout en tenant compte de l'aspect économique des formules générées (les formules qui permettent d'obtenir des diamètres des zones d'inhibition intéressants au moindre coût).

III. CONCLUSION

Dans cette dernière partie de cette thèse, nous avons pu évaluer, dans un premier temps, le pouvoir antibactérien de l'HE de *P. lentiscus* contre quatre souches bactériennes *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Ainsi, cette HE a présenté un pouvoir antibactérien avec un large éventail contre les souches étudiées : les bactéries Gram-négatives étaient plus résistantes par rapport à celles Gram positives.

Ensuite, une étude de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque de neuf mélanges binaires entre l'HE de *P. lentiscus* et d'autres HE nous a permis de déceler les HE ayant un effet d'interaction synergique avec l'HE de lentisque. Ainsi, seule l'HE de *M. communis* a montré une synergie en mélange avec l'HE de lentisque contre *B. subtilis*, alors que les deux HE d'*O. compactum* et *R. officinalis* ont présenté un effet synergique avec l'HE de *P. lentiscus* contre *S. aureus*.

Contre *E. coli*, une synergie a été observée en mélange binaire de l'HE de lentisque avec trois HE : *O. compactum*, *M. pulegium* et *C. citratus*. Tandis que la synergie contre *P. aeruginosa* a été observée en interaction de l'HE de *P. lentiscus* avec l'HE d'*A. absinthium*, *M. communis* et *R. officinalis*.

Cette étude a été clôturée par l'élaboration des formulations à activités antibactériennes intéressantes en se servant de la méthodologie des plans de mélange afin d'augmenter la sensibilité des souches bactériennes testées envers des mélanges tertiaires des HE qui ont présenté une synergie. Pour le mélange contre *P. aeruginosa*, nous n'avons malheureusement pas pu modéliser les diamètres des zones d'inhibition obtenues et le modèle mathématique proposé n'avait pas de qualité prédictive pour la réponse. Au contraire, les modèles proposés pour les mélanges testés contre *E. coli* et *S. aureus* ont été validés et nous pouvons les utiliser pour faire des prévisions dans tout le domaine d'étude et pour tracer les courbes d'isoréponses qui nous permettent de trouver les zones de sensibilité souhaitée.

L'application des techniques telle que les plans d'expériences dans l'optimisation des formulations à intérêt biologique semble être une voie de recherche très efficace et nécessite une application dans le domaine de la pharmacie et de la pharmacologie.

Conclusion générale

Les éléments bibliographiques essentiels relatifs à la MPE, aux techniques d'extraction des HE à partir des PAM ainsi qu'à leurs mécanismes d'action antibactérienne, choisis pour apporter des réponses à notre problématique, ont été présentés dans la première partie.

Une approche qualitative correspondant à l'analyse de criblage permettant de cerner les facteurs influents sur le procédé d'extraction de l'HE de *P. lentiscus* dans la deuxième partie. Ainsi, nous sommes parvenus en se servant des plans d'expériences de type Plackett-Burman, à faire un criblage des facteurs qui agissent sur le processus d'hydro-distillation de l'HE et de les classer selon leurs poids d'effets. Entre les cinq facteurs étudiés, seuls les quatre facteurs : temps d'hydrodistillation, individualité, séchage et ratio (plante/eau), sont jugés influents. La forme des feuilles (entière/ coupée) n'a pas présentée d'effet significative sur le procédé d'extraction étudié.

Après validation statistique et graphique des résultats expérimentaux. Nous avons pu obtenir un modèle prédictif reliant le rendement en HE aux quatre facteurs influents.

La troisième partie de cette mémoire de thèse est consacré au développement de l'effet de l'individualité sur le rendement en HE de *P. lentiscus*. Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que l'effet significatif des conditions environnementales sur les paramètres métaboliques et morphologiques de la population étudiée. Ainsi, la réalisation d'une analyse par ACP nous a permis de distinguer entre les 22 individus de la population étudiée, deux sous-populations appartenant à des conditions environnementales différentes (versant ubac et versant adret) et qui se regroupent en fonction des paramètres morphologiques et métaboliques : altitude, hauteur des individus, largeur moyenne des feuilles, longueur moyenne des feuilles et rendement en HE. Aussi, les résultats obtenus par la RLM ont montré une corrélation positive entre le rendement en HE et l'altitude. Au contraire, le rendement est corrélé négativement avec la hauteur, la largeur et la longueur des feuilles. Ce qui nous permet de conclure que le changement de versant de l'ombragé (ubac) à l'exposé au soleil (adret) a un effet positif sur le rendement en HE.

L'étude de l'effet de la période de récolte et du séchage à l'air libre sur le rendement en HE des feuilles de *P. lentiscus* a été réalisée et développée dans la quatrième partie. Cette étude, qui a été basée sur les résultats de l'étude de criblage, nous a permis d'évaluer l'influence de la période de récolte sur le rendement en HE. Ainsi, les meilleurs rendements ont été obtenus à partir des collectes du mois de mai. L'influence de la durée de séchage à l'air libre a présenté un effet significatif sur le rendement en HE. L'étude révèle qu'au bout de 15 jours de séchage à l'air libre, le rendement passe de 0,32 % à 0,42 % pendant les 7 premiers jours.

Au-delà de cette période, une diminution du rendement a été remarquée. Au cours de la même période, la teneur en eau du matériel végétal diminue en passant de 53,6 % à 8,2 %. C'est ainsi qu'un séchage à l'air libre d'une durée de six à sept jours des feuilles de *P. lentiscus* récoltées dans le stade de floraison est fortement recommandé.

La cinquième partie est consacrée à une analyse quantitative fondée sur la construction et l'analyse de surface de réponses (MSR ou optimisation par plans d'expériences). Les études réalisées aux parties 3 et 4 nous ont permis de fixer les facteurs qualitatifs, jugés influents lors de l'étude de criblage, à des niveaux permettant une amélioration du rendement en HE. Un plan composite à 12 essais réalisé dans ce chapitre, nous a permis après analyse et validation statistique des résultats de comprendre l'intervention de chacun des facteurs étudiés (temps d'hydrodistillation et ratio plante/eau) et le comportement du rendement en HE en fonction de chacun d'entre eux. La définition du réglage optimal avec un minimum d'essais expérimentaux dans cette étude, nous a permis une maximisation du rendement en HE avec les moindres coûts.

La dernière partie de cette thèse est consacrée dans un premier temps à l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'HE de *P. lentiscus* seule et en combinaison avec neuf HE (connues pour leurs activités antibactériennes) contre quatre souches pathogènes : *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. Cette première démarche nous a permis de conclure que l'HE de *P. lentiscus* présente une activité antibactérienne contre les souches Gram positive supérieure à celle observée contre les souches Gram négative. Aussi, les résultats des diamètres des zones d'inhibition des mélanges binaires des HE contre les souches testées ont montré que l'HE de *P. lentiscus* a présenté des réactions synergiques en combinaison binaires avec l'HE de *M. communis* contre *B. subtilis*, alors que les deux HE d'*O. compactum* et *R. officinalis* ont présenté un effet synergique en combinaison avec l'HE de *P. lentiscus* contre *S. aureus*. L'HE de *P. lentiscus* a aussi présenté des réactions synergiques en combinaison binaires avec trois HE : *O. compactum*, *M. pulegium* et *C. citratus* contre *E. coli*. Tandis que la synergie contre *P. aeruginosa* a été observée en interaction de l'HE de *P. lentiscus* avec l'HE d'*A. absinthium*, *M. communis* et *R. officinalis*.

Dans un deuxième temps, nous avons procédé à l'étude de l'effet antibactérien de plusieurs formulations des HE (à base de l'HE de *P. lentiscus*) par utilisation des plans d'expériences de type « plans de mélanges ». En se servant des résultats du test d'activité antibactérienne des mélanges binaires, les HE ayant prouvées des synergies avec l'HE de *P. lentiscus* ont été choisies pour l'élaboration des mélanges tertiaires. Ainsi, le mélange tertiaire des HE testé contre *E. coli* a été constitué des HE de : *Pistacia lentiscus*, *Origanum compactum* et

Cymbopogon citrates. Alors que le mélange tertiaire des HE testé contre *Pseudomonas aeruginosa* a été constitué des HE de : *Pistacia lentiscus*, *Myrtus communis* et *Rosmarinus officinalis*. Le mélange tertiaire des HE testé contre *Staphylococcus aureus* a été constitué des HE de : *Pistacia lentiscus*, *Origanum compactum* et *Rosmarinus officinalis*.

La méthodologie des plans de mélanges nous a permis d'élaborer des formulations à activités antibactériennes intéressantes afin d'augmenter la sensibilité des souches bactériennes testées envers nos mélanges des HE. Pour le mélange contre *P. aeruginosa*, nous n'avons malheureusement pas pu modéliser les diamètres des zones d'inhibition obtenues et le modèle mathématique proposé n'avait pas de qualité prédictive pour la réponse. Au contraire, les modèles proposés pour les mélanges testés contre *E. coli* et *S. aureus* ont été validés et nous pouvons les utiliser pour faire des prévisions dans tout le domaine d'étude et pour tracer les courbes d'isoréponses qui nous permettent de trouver les zones de sensibilité souhaitée.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des mélanges tertiaires des HE contre les souches testées, par la technique de diffusion par disques en adoptant la méthode des plans de mélanges du type centré augmenté, nous a permis de modéliser et valider statistiquement ainsi que d'établir un profil de prédiction des phénomènes étudiés.

L'application des techniques telle que les plans d'expériences dans l'optimisation des formulations à intérêt biologique semble être une voie de recherche très efficace et nécessite une application dans le domaine de la pharmacie et la pharmacologie.

Ce travail constitue une ouverture vers des travaux de recherche futurs qui pourraient être menés en utilisant la méthodologie des plans d'expérience (MPE) connue pour son utilité dans la définition et l'organisation des essais destinés à obtenir des données permettant le calcul et la validation des modèles physiques, ainsi que pour son aide tout à fait pertinente afin de juger du niveau utile de complexité à adopter lors de l'élaboration ou lors du choix d'un modèle physique en vue d'une application donnée.

Le couplage de techniques expérimentales conventionnelles, telles que l'extraction par hydrodistillation, aux outils statistiques tels que la MPE, peut nous offrir la possibilité de développer des méthodes rapides et peu coûteuses permettant de découvrir de nouvelles voies de valorisation et de développement du secteur des PAM.

A l'issue des résultats obtenus tout au long de cette thèse, plusieurs pistes de recherche sont à notre portée et méritent d'être entamées.

- Extrapolation des résultats obtenus de l'échelle laboratoire, à l'échelle pilote et puis à l'échelle industrielle ;
- Elargissement des études de criblages et d'optimisation des conditions d'extraction des HE aux autres techniques d'extraction au laboratoire ;
- Utilisation de la formulation par les plans de mélanges pour HE de *P. lentiscus* en d'autres types d'activités biologique (anti-oxydante, insecticide, anti-inflammatoire.....) ;
- Utilisation d'autres types d'extraits à partir des plantes aromatiques et leur implication dans la formulation par les plans de mélanges ;
- Fractionnement des HE et des extraits et la réalisation de formulation avec les composés fractionnés ;
- Utilisation des plans de mélanges dans la combinaison des molécules biologiques avec d'autres synthétiques.

Références bibliographiques

- [1] Fleurentin J., **2008**. Plantes médicinales : Traditions et thérapeutiques. Edition *Ouest France*, Rennes, 8-13.
- [2] Ghanmi M., Satrani B., Aberchane M., Ismaili M.R., Aafi A., El Abid A., **2011**. Plantes aromatiques et médicinales du Maroc : Les milles et une vertu. Edition *La Collection Maroc Nature*, Rabat, 8-23.
- [3] Chemonics International, **2006**. Projet Filière Des Plantes Aromatiques Et Médicinales, Mission de l'USAID au Maroc, Agriculture & Agrobusiness Intégrés, Rabat.
- [4] Sauvage C., **1975**. L'état actuel de nos connaissances sur la flore du Maroc. Colloques internationaux du CNRS, n° 235.
- [5] Benabid A., **2000**. Flore et écosystèmes du Maroc : Evaluation et préservation de la biodiversité. Edition *Ibis Press*, Paris, 24-332.
- [6] Linnaei C., **1753**. *Species plantarum. Holmiae*.
- [7] Hmamouchi M., **2001**. Les plantes médicinales et aromatiques marocaines : utilisations traditionnelles, marchés, biologies, écologies, chimie, pharmacologie, toxicologie, lexiques. *2ème édition*, 140.
- [8] Bayer E., Buttler K. P., Finkenzeller X. & Grau J., **2009**. Guide de la flore méditerranéenne : Caractéristiques, habitats, distribution et particularités de 536 espèces. Edition *Delachaux et Niestlé*, Paris, 94.
- [9] Jaric S., Mitrovic M., Djurdjevic L., Kostic O., Gajic G., Pavlovic D., Pavlovic P., **2011**. Phytotherapy in medieval Serbian medicine according to the pharmacological manuscripts of the chilandar medical codex (15–16th centuries). *J. Ethnopharmacol.* 137, 601–619.
- [10] Aafi A., Taleb M.S., Fechtal M., **2002**. Espèces remarquables de la-flore du Maroc. Centre National de la Recherche Forestière, Rabat, 34.
- [11] De Pooter H.L., Schamp N.M., Aboutabl E.A., El Tohamy S.F., Doss S.L., **1991**. Essential oils from the leaves of three *Pistacia* species grown in Egypt. *Flavour and Fragrance journal* 6, 229-232.
- [12] Papageorgiou V.P., Bakola C.M.N., Apazidou K.K., Psarros E.E., **1997**. Gas chromatographic mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *J. Chromatography A.* 769, 263-273.
- [13] Al-Said M.S., Agel A.M., Parmar N.S., Tariq M., **1986**. Evaluation of mastic, a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *Journal of Ethnopharmacology* 15, 271–278.

- [14] Derwich E., Manar A., Benziane Z. & Boukir A., **2010**. GC/MS Analysis and *In vitro* Antibacterial Activity of the Essential Oil Isolated from Leaf of *Pistacia lentiscus* growing in Morocco. *World Applied Sciences Journal* 8 (10), 1267-1276.
- [15] Djenane D., Yangüela J., Montañés L., Djerbal M., Roncalés P., **2011**. Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control* 22, 1046-1053.
- [16] Duru M.E., Cakir A., Kordali S., Zengin H., Harmandar M., Izumi S., Hirata T., **2003**. Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia* 74, 170-176.
- [17] Benhammou N., Bekkara A.F., Panovska K.T., **2008**. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *Afri. J. Pharm. Pharmacol.* 2, 22-28.
- [18] Bachrouch, O., Ben Jemâa, J.M., Aidi, W.W., Thierry, T., Brahim, M., Manef A., **2010**. Composition and insecticidal activity of essential oil from *Pistacia lentiscus* L. against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller and *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Stored Products Research* 46, 242-247.
- [19] Daferera D., Pappas C., Tarantilis P.A., Polisiou M., **2002**. Quantitative analysis of pinène and myrcène in mastic gum oil using FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry* 77, 511-515.
- [20] Satrani B., **2010**. Valorisation de plantes aromatiques et médicinales du Maroc. *Edition Universitaire Européennes*, 23-55.
- [21] AFNOR NF T 75-006, **1986**. Recueil de normes Françaises sur les huiles essentielles : 2ème Edition, Paris.
- [22] Bouwmeester H.J., Davies J.A.R., Toxopeus H., **1995**. Enantiomeric composition of carvone, limonene and carveols in seeds of dill and annual and biennial caraway varieties. *J. Agric. Food Chem.* 43, 3057-3064.
- [23] Bruneton J., **1987**. Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie. *Lavoisier*, Paris, 136-162.
- [24] Arctander S., **2000**. Perfume and flavor chemicals Aroma chemicals. *Allured Pub. Corp.*, USA, 100-105.
- [25] Kaloustian J., Hadji-Minaglou F., **2012**. La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie : Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. *Springer- verlag*, Paris 13-16.

- [26] Dick A.J.S., Herry H.N., **1996**. Extraction of secondary metabolites from plant material: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 7 (6), 191–197.
- [27] Wang L., Weller C.L., **2006**. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology* 17 (6), 300-312.
- [28] Jurado R.F., Vega F.A., Corona N.R., Palou E., Malo L.A., **2014**. Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Eng. Rev.* 6(4), 105-162.
- [29] Warnod M.B., **1984**. Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils. *Perfumer & Flavorist* 9, 93-103.
- [30] Asbahani A.E., Miladi K., Badri W., Sala M., Aït Addi E.H., Casabianca H., El Mousadik A., Hartmann D., Jilale A., Renaud F.N.R., Elaissari A., **2015**. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* 1-2 (483), 220-243.
- [31] Masango, P., **2005**. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *J. Clean. Prod.* 13, 833–839.
- [32] Owens M.K., Straka E.J., Carroll C.J., Taylor J.R., **1998**. Technical note: A comparison of techniques for extracting monoterpenoids from *Juniperus (Cupressaceae)* species. *Journal of range management*, 540-544.
- [33] Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F., **2007**. Comparison of different isolation methods of essential oil from citrus fruits: cold pressing: hydrodistillation and micro wave dry distillation. *Flavour Fragr. J.* 22, 494–504.
- [34] Attokaran M., **2011**. Natural Food flavors and colorants. *IFT PRESS*, Iowa, 29-33.
- [35] Assami K., Pingret D., Chemat S., Meklati B., Chemat F., **2012**. Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds. *Chem. Eng. Process.* 62, 99–105.
- [36] Sereshti H., Rohanifar A., Bakhtiari S., Samadi S., **2012**. Bifunctional ultrasound assisted extraction and determination of *Elettaria cardamomum* Maton essential oil. *J. Chromatogr. A* 1238, 46-53.
- [37] Chemat F., Lucchesi M. E., **2006**. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: a rapid, clean and environmentally friendly approach. *Anal. Chim. Acta.*, 157–160.
- [38] Camel V., **2001**. Recent extraction techniques for solid matrices supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst* 126, 1182–1193.

- [39] Mehran M., Naghmeh S., Peyman R., **2013**. Comparison of Hydrodistillation, Microwave Hydrodistillation and Solvent Free Microwave Methods in analysis of the essential oils from aerial parts of *Haplophyllum robustum* by GC/MS method. *Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.* 1(9), 1058-1067
- [40] Nahar L., Sarker S. D., **2005**. Supercritical fluid extraction, in: Natural products isolation. 2nd edition *Humana Press*, New Jersey, 47–53.
- [41] Allaf T., Tomao V., Ruiz K., Chemat F., **2013**. Instant controlled pressure drop technology and ultrasound assisted extraction for sequential extraction of essential oil and antioxidants. *Ultrasonics Sonochemistry* 20, 239-246.
- [42] Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P., **1995**. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. *Edition Masson*, Paris, 700.
- [43] Tranchant J., **1996**. Chromatographie en phase gazeuse. In *Techniques de l'Ingénieur*, 4^{ème} édition *T.I. Masson*: Issy-les-Moulineaux, France, 1-27.
- [44] Cavalli J.F., **2002**. Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 des huiles essentielles de Madagascar. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse Pascal Paoli, 45.
- [45] Goodner K. L., **2008**. Practical retention index models of OV-101, DB-1, DB-5, and DB-Wax for flavor and fragrance compounds. *J. LWT* 41, 951-958.
- [46] National Institute of Standards and Technology, **1999**. PC version 1.7 of the NIST/ EPA/ NIH Mass Spectral Library. *The Perkin Elmer Corporation*.
- [47] McLafferty F.W., **2013**. Wiley registry of mass spectral data. *Edition Wiley Mass Spectral Library*, Newfield.
- [48] Adams R.P., **2007**. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. *Edition Allured Publishing Corp.* Carol Stream, 1-499.
- [49] Burgain C., Gaiani C., Linder M., Scher J., **2011**. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J. Food Eng.* 104:467-483.
- [50] Wu Y., Zou L., Mao J., Huang J., Liu S., **2014**. Stability and encapsulation efficiency of sulforaphane microencapsulated by spray drying. *Carbohydr. Polym.* 102, 497–503.
- [51] Piacentini E., Giorno L., Dragosavac M.M., Vladislavljevi G.T., Holdich R.G., **2013**. Microencapsulation of oil droplets using cold water fish gelatin/ gum-arabic complex coacervation by membrane emulsification. *Food Res. Int.* 53, 362–372.
- [52] De Vos P., Faas M.M., Spasojevic M., Sikkema J., **2010**. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* 20(4), 292–302.

- [53] Celia C., Trapasso E., Locatelli M., Navarra M., Ventura C.A., Wolfram J., Carafa M., Morittu V.M., Britti D., Di Marzio L., Paolino D., **2013**. Anticancer activity of liposomal bergamot essential oil on human neuroblastoma cells. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 112, 548–553.
- [54] Soto L.P., Frizzo L.S., Avataneo E., Zbrun M.V., Bertozzi E., Sequeira G., Signorini M.L., Rosminia M.R., **2011**. Design of macrocapsules to improve bacterial viability and supplementation with a probiotic for young calves. *Anim. Sci. Technol.* 165, 176-183.
- [55] Sherry M., Charcosset C., Fessi H., Greige G.H., **2013**. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *J. Liposome Res.* 232, 268–275.
- [56] Fabrocini V.C., **2007**. Comment se soigner avec l'aromathérapie et guérir. *Edition DE VECCHI*, 4-17.
- [57] Besombes C., **2008**. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques, Applications généralisées. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle, 289.
- [58] Padrini F., Lucheroni M.T., **2004**. Le grand livre des huiles essentielles. *Edition DE VECCHI*, 124.
- [59] Buronzo A.M., **2008**. Grand guide des huiles essentielles. *Hachette Pratique*, 23-26.
- [60] Vincent L.C., **1996**. Précis de bioélectronique. *Edition Pietteur M.*, 350.
- [61] Sourai P.G., **1989**. Antimicrobial action of dental materials used in operative dentistry. *Odontostomatol Proodos* 43(5), 399-408.
- [62] Kato T., Lijima H., Ishihara K., Kanek T., Hirai K., Naito Y., Okuda K., **1990**. Antibacterial effect of listerine on oral bacteria. *Bull. Tokyo. Dent. Coll.* 31(4), 301-307.
- [63] Roulier G., **1995**. Les huiles essentielles pour votre santé. *Traité pratique d'aromathérapie : propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. Dangles.* France.
- [64] Valnet J., **1990**. Aromathérapie: traitement des maladies par les essences des plantes. *Edition Maloine S.A.*, Paris, 12.
- [65] Klancnik A., Piskernik S., Mozina S.S., Gasperlin L., Jersek B., **2011**. Investigation of some factors affecting the antibacterial activity of rosemary extracts in food models by a food micro-dilution method. *International Journal of Food Science and Technology* 46, 413–420.
- [66] Kasrati A., Jamali A.C., Fadli M., Bekkouche K., Hassani L., Wohlmuth H., Leach D., Abbad A., **2014**. Anti-oxidative activity and synergistic effect of *Thymus saturejoides* Coss. essential oils with cefixime against selected food-borne bacteria. *Industrial Crops and Products* 61, 338–344.

- [67] Maruzzella J.C., **1962**. The germicidal properties of perfume oils perfumery chemicals. *Am. Perfum. Cosmet.* 77(1), 67-72.
- [68] Miyazawa M., Kamwoka H., Morinaga K., Negoro K., Mura N., **1989**. Hydroxycineole : Four new metabolites of 1,8-cineole in rabbits. *J. Agric. Food Chem.* 37, 222-226.
- [69] Vargas I., Sanz I., Prima Y.E., **1999**. Antimicrobial and Antioxidant compounds in the nonvolatile fraction of expressed range essential oil. *J. Food Prot.* 62(8), 929-932.
- [70] Lahlou M., **2004**. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Rsearch* 18(6), 435-448.
- [71] Mallea M., Soler M., Anfossa F., Charpin J., **1979**. Antifungal activity of aromatic essential oils. *Pathol. Biol.* 27, 597-602.
- [72] De Billerbeck V. G., Roques C., Vanière P. et Marquier P., **2002**. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes* 3, 248-251.
- [73] Chemonics International, **2006**. Projet filière de plantes aromatiques et médicinales. USAID au Maroc, 16-19.
- [74] USAID, HCEFLCD, **2008**. Stratégie nationale de développement du secteur des Plantes Aromatiques et Médicinales au Maroc.
- [75] MDSFS, **2007**. Contribution à la mise en œuvre de l'INDH, activités génératrices de revenus, module 2.
- [76] Rauha J.P., Remes S., Heinonen M., **2000**. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol.*, 56: 3.
- [77] Hala G.M., Christ H., Carla K., **2000**. Traditional uses of *Salvia libanotica* (East Mediterranean sage) and the effects of essential oils. *Journal of Ethnopharmacology* 71(3): 513-520.
- [78] Marino M., Bersani C., Comi G., **1999**. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *J. Food Prot.* 62(9), 1017-23.
- [79] Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G., **2000**. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microbiol.* 88(1): 170-175.
- [80] Essawi T., Srouf M., **2000**. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 70 : 343.
- [81] Goetz P., Ghedira K., **2012**. Phytothérapie anti-infectieuse. *Springer-Verlag*, Paris, 194-204.

- [82] Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V., **2002**. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(6), 1914-1920.
- [83] Dorman H.J.D., Deans S.G., **2000**. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 308-316.
- [84] Denyer S.P., Hugo W.B., **1991**. Mechanisms of Action of Chemical Biocides. *Oxford Blackwell Scientific Publication*, Oxford, 27, 171-188.
- [85] Thoroski J., Blank G., Biliaderis C., **1989**. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection* 52(6), 399-403.
- [86] Juven B.J., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H., **1994**. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 626-631.
- [87] Ultee A., Kets E.P.W., Smid E.J., **1999**. Mechanisms of action of carvacrol on the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(10), 4606-4610.
- [88] Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P., Nychas G.J.E., **2001**. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91, 453-462.
- [89] Griffin S.G., Wyllie S.G., Markham J.L., Leach D.N., **1999**. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragrance Journal* 14, 322.
- [90] Franchomme P., **1981**. L'aromatologie à visée anti-infectueuse. *Phytothérapie* 1, 25-47.
- [91] Cosentino S., Tuberoso C.I., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F., **1999**. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29, 130-135.
- [92] Periago P.M., Conesa R., Delgado B., Fernandez P.S., Palop A., **2006**. *Bacillus megaterium* spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials. *Food Technology and Biotechnology* 44(1), 17-23.
- [93] Pelczar M.J., Chan E.C.S., Krieg N.R., **1988**. Control of microorganisms, the control of microorganisms by physical agents. *In Microbiology*, 469-509.
- [94] Oosterhaven K., Poolman B., Smid E.J., **1995**. S-carvone as a natural potato sprouts inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Industrial Crops and Products* 4, 23-31.

- [95] Knobloch K., Pauli A., Iberl B., **1989**. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J Essent Oil Res.* 1(3), 119-28.
- [96] Das K., Tiwari R.K.S., Shrivastava D.K., **2010**. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(2), 104-111.
- [97] Tenover F.C., Swenson J.M., O'Hara C.M., Stocker S.A., **1995**. Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 33(6), 1524-1527.
- [98] Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.L., Pfaller M.A., **2007**. Manual of clinical microbiology. *Edition ASM Press*, Washington, D.C, 1152–1172.
- [99] Baris O., Gulluce M., Sahin F., Ozer H., Kilic H., Ozkan H., Sokmen M., Ozbek T., **2006**. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea Biebersteinii* Afan. (*Asteraceae*). *Turk. J. Biol.* 30, 65-73.
- [100] Beylier M.M.F., **1976**. Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana.* 58, 283-286.
- [101] Norrel S.A., Messley K.E., **1997**. Microbiology Laboratory Manual Principles and Applications. *Prentice Hall*, New Jersey, 85-90.
- [102] Tharib S.M., Gnan S.O., Veitch G.B.A., **1983**. Antimicrobial activity of compounds from *Artemisia campestris*. *J. Food. Prot.* 46, 681-685.
- [103] Mayachiew P., Devahastin S., **2008**. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *LWT-Food Science and Technology* 41(7), 1153-1159.
- [104] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), **2007**. Performance standards for antibacterial susceptibility testing; Seventeenth information supplement M 100- S17 27(1), 81-86.
- [105] Ma X., Wang X., Cheng J., Nie X., Yu X., Zhao Y., Wang W., **2015**. Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Biological Control* 90, 34–41.
- [106] Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J., **1996**. Microbiologie alimentaire : Aspect microbiologique de la sécurité et la qualité des aliments. *Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires*, Paris, 106-211.
- [107] Bertrand X., Slekovec C., Cholley P., Talon D., **2011**. Épidémiologie des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES*, N°435, 35-40.
- [108] Lepape A., **2003**. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 22, 520–522.

- [109] Munnich A., Becker A.L., **2004**. *Escherichia coli* infections in newborn puppies clinical and epidemiological investigations. *Theriogenology* 62, 562–575.
- [110] Tinsson W., **2010**. Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques, Mathématiques et Applications. *Springer-Verlag*, Berlin Heidelberg, 1-114.
- [111] Goupy J., Creighton L., **2009**. Introduction aux plans d'expériences. *Ed. DUNOD*, Paris, 3-199.
- [112] Goupy J., **2006**. Les plans d'expériences. *Revue MODULAD* 34, 75-108.
- [113] Goupy J., **2005**. Pratiquer les plans d'expériences. *DUNOD*, Paris, 295-444.
- [114] Dagnelie P., **2012**. Principes d'expérimentation : Planification des expériences et analyse de leurs résultats. *LES PRESSES AGRONOMIQUES DE GEMBLoux*, Gembloux, 23-110.
- [115] Myers R.H., Khuri A.I., Carter W.H., **1989**. Response Surface Methodology. *Technometrics* 31(2), 1966-1988.
- [116] Khuri A.I., Cornell J.A., **1996**. Response surfaces: Design and Analyses. *Marcel Dekker*, New York, 203.
- [117] Goupy J., **2000**. Plans d'expériences: Les mélanges. *DUNOD*, Paris, 3-196.
- [118] Cornell J.A., **1973**. Experiments with mixtures: A Review. *Technometrics* 15(3), 437-455.
- [119] Silou T., Malanda M., Loubaki L., **2004**. Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* grâce à un plan factoriel complet 2^3 . *Journal of Food Engineering* (65), 219-223.
- [120] Quoc L.P. T., Xinh N.T.K., Nguyet H.T.K., Xuyen N.T.H., **2012**. Application of response surface methodology (RSM) in condition optimization for essential oil production from *Citrus latifolia*. *Emir. J. Food Agric.* 24 (1), 25-30.
- [121] Clevenger J.F., **1928**. Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc.* (17), 341-346.
- [122] Zrira S., Benjilali B., Lamaty G., **1995**. Effet du séchage à l'air libre des feuilles d'*E. camaldulensis* sur le rendement et la composition de l'huile essentielle. *Actes Inst. Agron. Veto. Maroc* 15 (4), 27-35.
- [123] Denny E.F.K., **1991**. Field distillation for herbaceous oils. *Denny & Mckenzie Associate*, Australia, 210.
- [124] Plackett R.L., Burman J.P., **1946**. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* (33), 305-325.

- [125] Mathieu D., Nony J., Phan T.L., **2000**. NemrodW: New Efficient Methodology for Research using Optimal Design (NEMROD) Software, *LPRAI*, Marseille.
- [126] Haj Ammar A., Zagroubab F., Romdhanec M., **2010**. Optimization of operating conditions of Tunisian myrtle (*Myrtus communis* L.) essential oil extraction by a hydro-distillation processing a 2⁴ complete factorial design. *Flavour Fragr. J.* (25), 503-507.
- [127] Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Isamili M.R., Houti H., El Monfalouti H., Benchakroun K.H., Aberchane M., Harki L., Boukir A., Chaouch A., Charrouf Z., **2010**. Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bio-activité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guercif (Maroc oriental). *Phytothérapie* (8), 295–301.
- [128] Bourkhiss M., Hnach M., Lakhlifi T., Boughdad A., Farah A., Satrani B., **2011**. Effet de l'Age et du Stade Végétatif sur la Teneur et la Composition Chimique des Huiles Essentielles de Thuya de Berbere, *Les Technologies De Laboratoire* 23 (6), 63-68.
- [129] Bekkara F.A., Bousmaha L., Bendiab S.A.T., Boti J.B., Casanova J., **2007**. Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé* 1 (7), 6-11.
- [130] Noumi G.B., Njouokam Y.M., Njiné C.B., Ngameni E., Kapseu C., **2011**. Effets du séchage sur le rendement et la qualité de l'huile extraite de la pulpe de Safou. *Tropicultura* 3 (29), 138-142.
- [131] Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M., Chaouch A., Satrani B., **2009**. Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Agro-solutions* 1 (20), 44-48.
- [132] Benjlali B., **2005**. Huiles essentielles: de la plante à la commercialisation – Manuel pratique. *Corporation Laseve*, Université du Québec à Chicoutimi, 61-80.
- [133] Duby C., Robin S., **2006**. Analyse en Composantes Principales. *Institut National Agronomique*, Paris, 3-20.
- [134] Veysseyre R., **2006**. Aide mémoire : Statistique et probabilités pour l'ingénieur. *Ed. DUNOD*, 337-409.
- [135] Rouaud M., **2012**. Probabilités, statistiques et analyses multicritères. *Auto-édition*, 31-71.
- [136] Cattell R. B., **1966**. The Scree Test For The Number Of Factors. *Multivariate Behavioral Research* 1 (2), 245-276.
- [137] Havaux M., **1992**. Stress tolerance of photosystem II in vivo antagonistic effects of water, heat, and photoinhibition stresses. *Plant Physiology* 1(100), 424-432.

- [138] Hamlyn G. J., **2014**. Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology. *Edition Cambridge University Press*, 120-125.
- [139] Hirt H., Shinozaki K., **2004**. Plant responses to abiotic stress. *Springer-Verlag*, Berlin Heidelberg, 122-140.
- [140] Hmamouchi M., Fechtal M., **2000**. Gestion durable de la ressource. Actes de la journée de réflexion sur les plantes aromatiques et médicinales. *Ann. Rech. For. Maroc*, 105-107.
- [141] Ennajar M., Romdhane M., Abderrabba M., **2007**. Influence de la période de récolte sur la teneur et la composition de l'huile essentielle du Genévrier de Phénicie *Juniperus phoenicea L.* *Revue des régions arides* (2), 647-651.
- [142] SAS Institute, **2009**. JMP: The Statistical Discovery Software. Sas Inst.
- [143] Garneau F. X., Collin G. J., **2005**. Huile Essentielle : de la Plante à la Commercialisation. *Corporation Laseve*, Université du Québec à Chicoutimi, 185.
- [144] Singh A., Singh S. R., Duve R. N., Vithalbha C. L., Drysdale P., 1977. The distillation and properties of *Eucalyptus citriodora* oil. *Fiji. Agric. J.* (39), 33-38.
- [145] Silou T., Taty-Loumbou F., Chalchat J. C., **2002**. Etude de l'effet du séchage solaire sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles extraites des feuilles d'*Eucalyptus citriodora*. *Ann. Fals. Exp. Chim.* (960), 287-301.
- [146] Belanger A., Eddaouri M., Benjlali B., **1994**. La verveine, Effet du séchage du matériel végétal sur le rendement en huile essentielle et sur sa composition chimique. *Actes des 12^{ème} Journées internationales des huiles essentielles*, Digne-Les-Bains, 692-705.
- [147] El Amrani A., Zrira S., Ismaili Alaoui M. M., Bélanger A., Berrada M., Benjlali B., **1997**. Effet de séchage sur les rendements et la composition chimique des huiles essentielles du romarin du Maroc (*Rosmarinus officinalis L.*), Plantes aromatiques et médicinales et leurs huiles essentielles, *Actes Editions I.A.V. Hassan II*. Rabat.
- [148] Zrira S., Benjlali B., **1991**. Effect of drying leaf oil of Moroccan *E. camaldulensis*. *J. Ess. Oil Res.* (3), 443-444.
- [149] Rabesiaka J. R., Pierre R. H., Razanamparany B., **2013**. Optimization and Extrapolation to Pilot Scale of Essential Oil Extraction from *Pelargonium Graveolens* by Steam Distillation. *J. Food Process Technol*, 4 (208), 2.
- [150] Fadil M., Farah A., Ihssane B., Haloui T., Rachiq S., **2015**. Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis L.* par la méthodologie de surface de réponse. *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (8), 2346-2357.
- [151] Kon K., Rai M., **2012**. Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with other essential oils. *Nusantara Bioscience* 4, 50-56.

- [152] Hemaiswarya S., Kruthiventi A.K., Doble M., **2008**. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 15, 639–652.
- [153] Turgis M., Vu K.D., Dupont C., Lacroix M., **2012**. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Research International* 48, 696–702.
- [154] Delaquis P. J., Stanich K., Girard B., Mazza G., **2002**. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International journal of food microbiology* 74(1), 101-109.
- [155] Ponce A.G., Fritz R., Del V.C., Roura S.I., **2003**. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology* 36(7), 679-684.
- [156] Mann C.M., Markham J.L., **1998**. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology* 84, 538–544.
- [157] Patricia D.S.N., Ana R.M.M., Renata O.D.F., Luiz F.D.S., Mario C.A.M., Joao R.B.M., **2009**. CLSI broth microdilution method for testing susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to Thiabendazole. *Brazilian Journal of Microbiology* 40, 222-226.
- [158] Bassole H.N., Kabore Z.I., Traore A.S., **2001**. Etude des profils bactériostatiques et bactéricides d'extraits végétaux vis-à-vis de germes pathogènes impliqués dans la contamination des denrées alimentaires d'origines animale. *Pharm Méd Trad Afr* 11, 113-122.
- [159] Hafsé M., Benbrahim F.K., Saidi A., Farah A., **2013**. Volatile Components and Antibacterial Profile of Essential Oils Extracted from Leaves and Twigs of *Pistacia lentiscus* L.. *British Microbiology Research Journal* 3(4), 602-611.
- [160] Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M.G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G., **2005**. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother* 49, 2474–2478.
- [161] Caillet S., Millette M., Turgis M., Salmieri S., Lacroix M., **2006**. Influence of antimicrobial compounds and modified atmosphere packaging on radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* present in ready-to-use carrots (*Daucus carota*). *Journal of Food Protection* 69(1), 221–227.
- [162] Davidson P.M., Parish M.E., **1989**. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology* 43, 148-155.
- [163] Mourey A., Canillac N., **2002**. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13, 289-92.

- [164] Gill A.O., Delaquis P., Russo P., Holley R.A., **2002**. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology* 73, 83-92.
- [165] Delaquis P.J., Stanich K., Girard B., Mazza G., **2002**. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74, 101-9.
- [166] Dorman H.J.D, Deans S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants. *J. Appl. Microbiol.* 88, 308-316.

Annexes

Annexe I :
Les principaux tests statistiques

TEST DE L'ANALYSE DE VARIANCE

L'analyse de la variance consiste à rechercher les sources de variation des réponses. On suppose que les réponses ont été calculées avec le modèle postulé, $y_i = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n) + e_i$, en utilisant la méthode des moindres carrés c'est-à-dire en minimisant la somme des carrés des écarts. Dans ce cas, les réponses calculées s'écrivent et les écarts e prennent des valeurs particulières ri qui s'appellent les *résidus*. Les résidus sont donc des valeurs particulières des écarts. On a :

$$\hat{y}_i = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)$$

Avec ces nouvelles notations, la relation donnant la réponse peut s'écrire :

$$y_i = \hat{y}_i + ri$$

L'analyse classique de la variance fait intervenir non pas les réponses mais la différence entre les réponses et leur moyenne, $(y_i - \bar{y})$ ou $(\hat{y}_i - \bar{y})$. Cette différence est désignée soit par *écarts à la moyenne*, soit par *réponse corrigée de la moyenne*. Dans le cas des réponses calculées, on parle aussi de *modèle corrigé de la moyenne*.

Dans le cadre de la méthode des moindres carrés, la moyenne des réponses mesurées est égale à la moyenne des réponses calculées avec le modèle postulé. On a donc, \bar{y} étant la moyenne des réponses :

$$y_i - \bar{y} = \hat{y}_i - \bar{y} + ri$$

Lorsqu'on élève les deux membres de cette relation au carré, on obtient :

$$\sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum ri^2$$

C'est la relation de base de l'analyse de la variance. Le membre de gauche est la somme des carrés des écarts à la moyenne des réponses mesurées. Cette somme se décompose en deux éléments : la somme des carrés des écarts à la moyenne des réponses calculées avec le modèle et la somme des carrés des résidus. La somme des carrés des résidus est la plus faible valeur de la somme des carrés des écarts. On a donc :

$$\sum ri^2 = \text{Minimum de } \sum e_i^2 = \text{Minimum de } \sum (\Delta + \sigma)_i^2$$

Si l'on divise la somme des carrés des résidus par le nombre de degrés de liberté des résidus, on obtient la variance des *résidus*. La variance des résidus $V(ri)$ est donc la plus petite variance des écarts $V(e)$. On peut écrire :

$$V(ri) = \text{Minimum de } V(e) = \frac{1}{n-p} \sum_{i=1}^{i=n} ri^2$$

C'est cette valeur minimale de la variance des écarts qui est généralement adoptée comme étalon de comparaison pour évaluer l'importance d'un coefficient. La variance des coefficients est alors calculée :

– soit par la formule générale utilisée par les ordinateurs :

$$V(a_i) = K V(e) = V(ri)$$

– soit par la formule simplifiée lorsqu'il s'agit de plans factoriels et d'un modèle postulé polynomial :

$$V(a_i) = V(e) = V(ri)$$

En résumé, la variance des résidus de l'analyse de la variance sert à calculer la variance des coefficients. C'est la variance des coefficients qui sert d'étalon pour tester si un coefficient est significatif ou non [113].

L'analyse de variance permet de comparer des moyennes. L'idée d'analyser des variances pour comparer des moyennes de plus de deux échantillons indépendants repose sur le fait que lorsque plusieurs moyennes ne sont pas différentes entre elles (hypothèse nulle) leur variance totale (S_T^2) est égale à ce que l'on appelle leur variance résiduelle (S_R^2). Dans tous les autres cas, S_T^2 diffère de S_R^2 (elle lui est supérieure).

Dans l'hypothèse nulle, et dans cette seule hypothèse, la variance totale étant égale à la variance résiduelle, le rapport :

$$F = (S_T^2 - S_R^2) / S_R^2 \text{ est égale à } 0.$$

Dans tous les autres cas, S_T^2 est supérieure à S_R^2 . Une fois calculée la valeur de F , une table de F donne en fonction du nombre de degrés de liberté les seuils au-dessus desquels cette valeur F est statistiquement différente de 0, c'est-à-dire que les différences observées sont statistiquement significatives [134].

TEST DE *STUDENT*

Le test de *Student*, ou test *t*, est un ensemble de tests d'hypothèse paramétriques où la statistique calculée suit une loi de *Student* lorsque l'hypothèse nulle est vraie. Un test de *Student* peut être utilisé notamment pour tester statistiquement l'hypothèse d'égalité de l'espérance de deux variables aléatoires suivant une loi normale et de variance inconnue. Il est aussi très souvent utilisé pour tester la nullité d'un coefficient dans le cadre d'une régression linéaire.

REGRESSION LINEAIRE ET CORRELATION

La régression

La régression permet d'étudier et de mesurer la relation mathématique qui peut exister entre deux (régression simple) ou plusieurs (régression multiple) variables. Lorsque les variables sont quantitatives et que la relation entre elle est linéaires, on appelle ce modèle la régression linéaire. L'équation du modèle statistique simple de la droite de régression linéaire s'exprime sous la forme :

$$Y = b + ax.$$

Où b est une constante appelée ordonnée à l'origine car elle représente la valeur moyenne de y lorsque x est égale à 0 et a quantifie l'amplitude des variations de la moyenne de y en fonction de celles de x , c 'est la pente de la droite.

Le coefficient de corrélation

La force d'association entre les deux variables est estimée par le coefficient de corrélation (r). Il est égal au rapport de la covariance (la mesure d'indépendance entre deux variables. Si deux variables sont indépendantes, la covariance est nulle) entre x et y sur le produit de leurs écarts-types.

$$r = S_{xy}^2 / S_x \cdot S_y$$

Ce coefficient peut aller de -1 à +1. S'il est compris entre 0,8 et 1 (en valeur absolue), la force d'association entre les deux variables est importante, entre 0,5 et 0,8 elle est modérée, entre 0,2 et 0,5 elle est faible, et très faible en dessous. Un signe positif traduit une association positive : la valeur moyenne de y croît avec x . Une association négative traduit l'opposé : la valeur moyenne de y décroît lorsque x décroît [134].

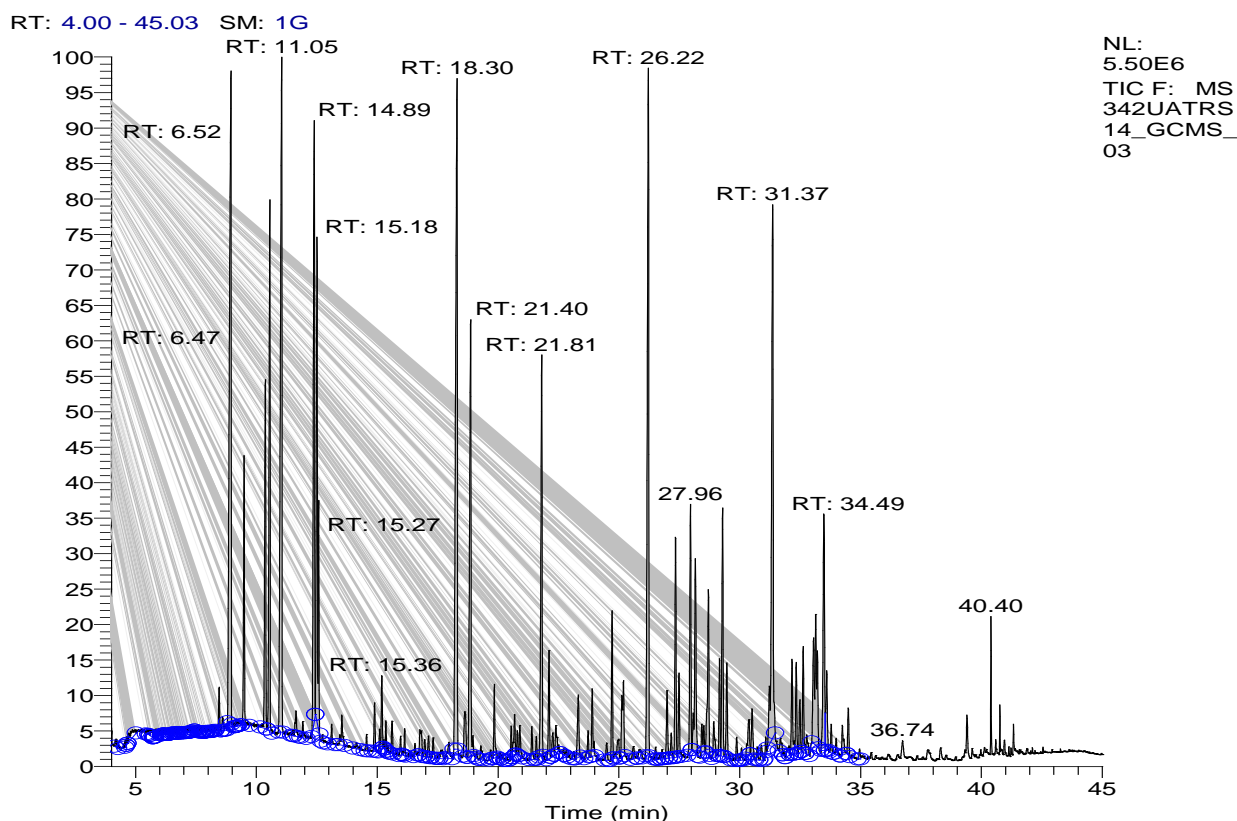
*Annexe II :**Valeur de α* **Annexe 2 : Valeur de α en fonction du nombre de points centraux [113]**

Nombre de facteurs	2	3	4	5	5	6	6
Plan	2^2	2^3	2^4	2^{5-1}	2^5	2^{6-1}	2^6
n_f	4	8	16	16	32	32	64
n_α	4	6	8	10	10	12	12
$n_0 = 1$	1	1,215	1,414	1,547	1,596	1,724	1,761
$n_0 = 2$	1,078	1,287	1,483	1,607	1,662	1,784	1,824
$n_0 = 3$	1,147	1,353	1,547	1,664	1,724	1,841	1,885
$n_0 = 4$	1,210	1,414	1,607	1,719	1,784	1,896	1,943

Annexe III : Composition chimique

Analyse chimique de l'huile essentielle

L'huile essentielle a été analysée par Chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à la spectrométrie de masse GC / MS (Polaris Q ion trap MS). Les analyses ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard (HP 6890) (FID), équipé d'une colonne capillaire HP-5 à 5% de phénylméthyl silicone (30 m x 0,25 mm x épaisseur de film 0,25 µm). La température a été programmée de 50 ° C après 5 min de maintien initial à 200 ° C à 4 ° C / min. N2 est le gaz porteur de Chromatographie (1,8 ml / min), on a utilisé le mode fractionné (Flux : 72,1 ml / min, rapport: 1/50), la température de l'injecteur et le détecteur était 250 ° C, le temps de maintien final était de 48 minutes. La machine était dirigée par un système informatique de type "HP Chem Station", gérant son fonctionnement et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques. Des échantillons dilués (1/20 dans du méthanol) de 1 µl ont été injectés manuellement.



Chromatogramme de l'huile essentielle des feuilles de *Pistacia lentiscus*

**Constituants principaux (%) de l'huile essentielle des feuilles
de *Pistacia lentiscus***

IR (min) ^a	Constituants ^b	(%)
915	Tricyclene	7.71
953	Camphene	1.65
974	Sabinene	6.96
1006	α - Phellandrene	2.61
1011	3-carene	4.44
1026	p-Cymene	5.04
1050	trans- β -Ocimene	3.89
1072	γ -Terpinene	0.63
1089	p-Cymenene	0.59
1180	Terpinen-4-ol	7.44
1192	α -Terpineol	4.16
1219	Trans- Carveol	0.62
1266	Geraniol	0.58
1288	Bornyl acetate	3.32
1294	Undecanone	0.80
1348	α -Cubebene	1.06
1381	α -Copaene	0.83
1395	β -Elemen	0.94
1418	Caryophyllene	6.62
1454	α -Caryophyllene	1.65
1462	Benzoic acid, pentyl ester	0.57
1464	Aromadendrene	0.65
1499	α -Muurolene	1.83
1513	γ -Cadinene	0.68
1523	Calamenene	0.80
1528	δ -Cadinene	1.97
1538	α -Cadinene	1.90
1581	Caryophyllene oxide	6.05
1652	α -Cadinol	2.72

a: Indice de rétention .

b: Les composés présents en traces (<0,5%) n'ont pas été enregistrés.