

Application de plan de Plackett Et Burman dans le criblage des paramètres agissants sur le processus d'hydrodistillation de Thym du Maroc (*Thymus vulgaris L.*)

[The application of Plackett and Burman design in screening the parameters acting on the hydrodistillation process of Moroccan thyme (*Thymus vulgaris L.*)]

Mouhcine Fadil¹⁻², Abdellah Farah², Bouchaib Ihssane³, Taoufik Haloui¹⁻², and Saâd Rachiq¹

¹Laboratory of Functional Ecology and Environment, Faculty of Sciences and Techniques Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco

²Laboratory of Medicinal, Aromatic Plants and Natural Substances, National Institute of Medicinal and Aromatic Plants Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Taounate, Morocco

³Application Organic Chemistry Laboratory, Faculty of Sciences and Techniques Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco

Copyright © 2014 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: Thyme, *Thymus vulgaris L.*, is an herb widely used throughout the world. It is, without doubt, one of the most popular plants in Morocco. For the purpose of examining the factors affecting the extraction of the essential oil of this plant by hydrodistillation, a screening study by Hadamard matrix type Plackett and Burman was conducted. After an appropriate choice of six factors, sixteen experiments lead to a mathematical model of first degree connecting the response function (yield) to factors. Later than the realization of the experiments and data analysis, we concluded that five factors have a significant effect on the hydrodistillation process, namely: the extracting time, the harvest period, the individuality effect, the mass plant/water ratio and the temperature of heating. As for the drying of plant material, it presents a statistically negligible effect.

KEYWORDS: *Thymus vulgaris L.*, hydrodistillation, factors, screening, Plackett and Burman design, yield.

RESUME: Le thym, *Thymus vulgaris L.*, est une herbe médicinale largement utilisée à travers le monde. Elle est, sans doute, l'une des plantes les plus populaires au Maroc. Dans le but du criblage des facteurs qui influent sur l'opération d'extraction de l'huile essentielle de cette plante, une étude de criblage par matrice d'adamard de type Plackett et Burman a été menée. Après un choix approprié de six facteurs, 16 expériences ont conduit à un modèle mathématique du premier degré reliant la fonction de réponse (rendement) aux facteurs. Après la réalisation des expériences et l'analyse des données, nous avons conclu que cinq facteurs ont un effet significatif sur le procédé d'hydrodistillation, à savoir: le temps de traitement, la période de récolte, l'effet d'individualité, le rapport matière végétale/Eau et la température de chauffage. Quant au séchage des feuilles, il présente un effet statistiquement négligeable.

MOTS-CLEFS: *Thymus vulgaris L.*, hydrodistillation, facteurs, criblage, plan Plackett et Burman, rendement.

1 INTRODUCTION

Les plantes aromatiques et médicinales représentent une valeur considérable pour l'économie marocaine. En 2010, les exportations de plantes aromatiques et médicinales en produits semi-transformés ont augmenté à 900 millions de DH. Quant aux importations, elles ont dépassé les 600 millions de DH. De plus, les chiffres de l'Office des changes ne tiennent pas compte de la consommation locale, qui est estimée à près de 400 millions de DH, commercialisés par les herboristeries, parapharmacies et autres magasins spécialisés dans les produits du terroir [1]. Parmi ces plantes, il y a le Thym.

Thymus vulgaris L. est un arbuste à feuilles persistantes appartenant à la famille des *Lamiacée*. Il est indigène de l'Europe du sud, on le rencontre depuis la moitié orientale de la péninsule ibérique jusqu'au sud-est de l'Italie, en passant par la façade méditerranéenne française [2], [3]. Il est maintenant cultivé partout dans le monde comme thé, épice et plante médicinale [4].

L'essence du thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives [5], [6].

Le thym possède de nombreuses activités biologiques telles que l'effet antispasmodique, antimicrobien, antibactérien, antiviral, antioxydant et activité fongicide, anti-inflammatoire, antiseptique, carminatif [5], [7], [8].

Ainsi, il est primordial de comprendre les effets des facteurs qui agissent sur le processus d'hydrodistillation vu leur lien étroit avec l'amélioration du rendement en huile essentielle. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons procédé par l'application des techniques statistiques telles que les plans d'expérience pour rendre cette amélioration de plus en plus accessible. Ces méthodes, qui permettent l'expérimentation dans un nombre minimal d'expériences [9], donnent la possibilité de faire un criblage des facteurs, du plus influant au moins influant, et permettent aussi d'optimiser les conditions opératoires afin d'atteindre le meilleur résultat possible.

Dans cet article, nous avons fait un criblage des facteurs agissant sur l'opération d'hydrodistillation de *Thymus vulgaris* L. Nous nous sommes servis des plans de criblage dont les plus connus pour des facteurs à 2 niveaux sont les matrices d'Hadamard ou de Plackett et Burman [10]. L'expérimentation a consisté à mettre en évidence les effets de certains facteurs sur la réponse étudiée [11].

L'utilisation des plans d'expériences dans l'analyse et l'optimisation du processus d'hydrodistillation a été évoquée par plusieurs auteurs. Certains ont utilisé d'autres types de plans tels que les plans factoriels complets [11], [12], [13]. D'autres sont passés directement à l'optimisation en se servant des plans surface de réponse [14], [15], [16].

Le choix des plans de criblage pour notre étude au lieu des plans factoriels complets est basé sur le nombre des facteurs étudiés qui est égale à six. Ce nombre, élevé par rapport aux facteurs des études qui ont utilisé un plan factoriel complet, va entraîner une augmentation du nombre des essais ($2^6=64$ essais). Quant aux plans de surface de réponse, ils sont utilisés généralement pour l'optimisation. Cette dernière reste loin de notre objectif dans ce stade, qui est celui de comprendre l'effet de chacun des facteurs sur le processus d'hydro distillation. L'étude d'optimisation viendra en perspective et va porter seulement sur les facteurs ayant une influence sur le processus d'hydrodistillation. Dans notre cas, un plan de criblage de type Plackett et Burman est mieux préconisé.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les plantes de *Thymus vulgaris* L. ont été cueillies à partir du jardin de l'institut national des plantes médicinales et aromatiques de Taounat.

2.2 MATÉRIEL D'EXTRACTION

L'appareil utilisé pour l'hydrodistillation est de type Clevenger [17] selon le protocole recommandé par la pharmacopée Française [18]. Il est constitué d'une chauffe ballon, un ballon de 1L, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) et un collecteur en verre qui reçoit les extraits de la distillation. L'huile essentielle obtenue est conservée au réfrigérateur dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement à 4 °C et à l'ombre.

2.3 PLAN DE PLACKETT ET BURMAN

A propos d'un processus ou d'un phénomène, les premiers problèmes auxquels les plans d'expériences peuvent apporter de l'information sont ceux de criblage des paramètres. Une étude de criblage peut être définie comme une étape permettant de repérer rapidement, dans un grand nombre (k) de facteurs, ceux qui sont effectivement influents sur un processus dans un domaine expérimental fixé. Cette étude permettra de déterminer le "poids" de chaque niveau de chaque facteur, pour ensuite les classer par ordre d'importance.

Les matrices d'expériences de criblage les plus connues sont les matrices d'Hadamard [19] ou matrices de Plackett et Burman pour lesquelles le nombre de simulations est proche du nombre de facteurs étudiés [20]. Ces plans sont des matrices à colonnes orthogonales composées uniquement des valeurs +1 ou -1 [21] et pour laquelle la matrice d'information $X'X$ est telle que : $X'X = NI_N$ avec, I_N : matrice identité d'ordre N [22]. Ces plans sont le plus souvent saturés et le modèle mathématique est un modèle sans interactions [23].

Le plan de Plackett et Burman est un plan factoriel fractionné, et l'effet principal d'une telle conception peut être simplement calculé comme la différence entre la moyenne des mesures effectuées au niveau haut (+1) du facteur et la moyenne des mesures effectuées au niveau bas (-1). Cela permet la détermination de l'effet de chaque facteur. Un grand contraste coefficient positif ou négatif indique qu'un facteur a un grand impact sur la réponse; tandis qu'un coefficient proche de zéro signifie qu'un facteur a peu ou n'a pas d'effet [24].

2.4 DOMAINE EXPERIMENTAL DES FACTEURS ET REPONSES

Le choix des facteurs et leurs niveaux de variations a été effectué en tenant compte des limites expérimentales du fonctionnement, et en considérant les données de la littérature sur les conditions de l'Hydrodistillation [25] et les études précédentes [12], [13], [14], [15], [16].

Les facteurs susceptibles d'affecter le rendement en huile essentielle se divisent en deux catégories :

- Des facteurs continus ou quantitatifs:

- Le Temps de l'opération d'hydrodistillation compris entre 150 min et 210 min
- le rapport entre la matière végétale et l'eau dans le ballon de distillation : ce facteur varie entre 100/1200 et 100/400 (g/ml).
- La température de chauffage qui est directement liée au flux de vapeur sortant du ballon chauffé donc au débit de condensation. Afin de tester ce paramètre, deux températures de chauffage sont utilisées 250° et 350°.

- Des facteurs qualitatifs:

- La période de récolte du matériel végétal qui prend les deux modalités : Moitié du mois de juillet et moitié du mois de septembre.
- Le séchage des plantes étudiées avec les deux modalités : plante fraîche et plante séchée. Le séchage des plantes se fait dans l'ombre pendant 8 jours.
- L'effet du changement de l'individu traité : nous avons étudié deux pieds différents, donc nous avons les modalités "individu 1" et "individu 2"

Le Tableau 1 montre les six facteurs qui ont été étudiés simultanément afin de quantifier l'effet de chacun d'entre eux sur l'opération d'hydro-distillation.

La réponse étudiée est le rendement en huile essentielle de *Thymus vulgaris L.* qui se traduit par l'expression:

$$R_{HE}(\%) = \frac{M_{HE}}{M_s} \times 100$$

Avec : M_{HE} = La masse de l'huile essentielle (g), M_s = La masse de la matière végétale sèche (g) and R_{HE} = Le rendement en huile essentielle (%).

2.5 MATRICE D'EXPERIENCES

Puisque nous avons six facteurs, le plan d'expérience sera une matrice de 8 expériences. Pour plus de précision, nous avons dupliqué le plan choisi, ce qui mène donc à une matrice de 16 essais.

2.6 MODELE MATHEMATIQUE ET ANALYSE STATISTIQUE

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

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_5X_5 + b_6X_6 + \varepsilon$$

Avec:

Y: Le rendement en huile essentielle (réponse).

b_0 représente la valeur moyenne théorique de la réponse.

b_1, b_2, b_3, b_4, b_5 et b_6 : Les effets principaux des facteurs X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 et X_6 , respectivement

ε : Le terme d'erreur.

La qualité du modèle ajusté a été exprimée par le coefficient de détermination R^2 , et sa signification statistique a été vérifiée par un test F (analyse de variance) au niveau de signification de 5%. Autrement, Le R^2 mesure la proportion de la variation totale de la réponse moyenne expliquée par la régression, en fait, c'est la corrélation entre la réponse observée et prédite, et il est souvent exprimé en pourcentage en multipliant par 100 [26].

Les carrés moyens (MS) sont obtenus comme suit:

$$MS = SS/DF$$

Où SS est la somme des carrés de chaque source de variation et DF est le degré de liberté.

Le rapport entre la régression carré moyen (MSR) et le carré moyen résiduel (MSr), $F_{ratio (R/r)}$, a été utilisé afin de vérifier si le modèle était statistiquement significatif [12].

La valeur F explique de façon adéquate la variation des données autour de leur valeur moyenne, en plus, les effets des facteurs estimés sont vrais [27], [28].

Les coefficients du modèle ont été considérés comme significatifs pour des valeurs de $p < 0,05$. La signification statistique des coefficients de modèle a été déterminée en utilisant le test t (seuls les coefficients significatifs avec $p < 0,05$ sont conservés).

Durant cette étude, nous avons utilisé les logiciels de conception et de traitement des plans d'expériences NemrodW [29].

3 RÉSULTATS

Les valeurs de réponse observées avec les différentes combinaisons des six variables étudiés sont répertoriées dans Tableau 2.

3.1 VALIDATION STATISTIQUE DU MODELE RETENU

D'après le tableau de l'analyse de la variance (Tableau 3.), nous pouvons conclure que la régression explique bien le phénomène étudié puisque la signification du risque ($p\text{-value} < 0.0001\%$) est inférieure à 0.05. Bien évidemment, le calcul de $F_{Ratio(R/r)}$ (26.77) a montré qu'il est presque huit fois supérieur à la valeur de $F_{(0.05;6,9)}$ au niveau de confiance de 95% qui est égale à 3.37.

Comme règle pratique, le modèle est statistiquement significatif si la valeur de F calculée est au moins de trois à cinq fois plus grande que la valeur théorique [30].

En outre, le modèle ne présente pas un défaut d'ajustement. Cela signifie qu'il fait moins d'erreurs que l'expérimentation puisque la signification du risque ($p\text{-value} = 0,08$) est supérieure à 0.05. Le calcul de $F_{Ratio(LOF/PE)}$ qui est égale à 3,90 a montré qu'il est inférieur à la valeur de $F_{(0.05;1,8)}$ au niveau de confiance de 95% qui est égale à 5.32. Le coefficient de corrélation $R^2 = 94.7\%$ est très suffisant. La valeur donne une bonne concordance entre les valeurs expérimentales et prévues du modèle adapté.

Le graphe (Fig. 1) montre que la courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues a parfaitement l'allure d'une droite.

3.2 ÉTUDE DES EFFETS DES FACTEURS

Les effets principaux des six variables étudiés sont montrés dans le tableau 4.. Chaque coefficient est associé aux valeurs de t et p-value. Les valeurs de t sont employées pour déterminer la signification des coefficients de régression de chacun des paramètres ; et les valeurs de p sont définies comme plus petit niveau d'importance menant au rejet de l'hypothèse nulle [12]. En général, plus la grandeur de t est élevée, plus p value est petit, et plus le terme correspondant de coefficient est significatif [31].

La valeur de la constante b_0 est égale à 1.74. Cette valeur ne dépend d'aucun facteur. Les résultats du tableau 4. montrent que seul le facteur b_6 n'a pas d'influence sur l'opération d'hydrodistillation, puisque les 5 autres facteurs ont des significations des risques (P-value) inférieures à 0.05. Ces résultats sont plus clairs sur les deux graphes (Fig. 2) des effets des facteurs et leurs pourcentages de contribution dans la variation de la réponse étudiée (Rendement).

3.3 MODELE POSTULE

Le modèle mathématique statistique qui représente la réponse en fonction des variables les plus influents est:

$$Y = 1.74 + 0.032X_1 - 0.023 X_2 + 0.065X_3 - 0.019X_4 - 0.062X_5 + \varepsilon$$

L'erreur expérimentale (ε) a été calculée à partir des écarts types des réplifications des expériences et nous avons trouvé qu'elle a la valeur de 0.032.

4 DISCUSSIONS

4.1 PARAMÈTRES STATISTIQUEMENT NÉGLIGEABLE

4.1.1 SÉCHAGE

La figure 3 montre qu'il y a une petite augmentation dans le rendement en passant des plantes fraîches aux plantes séchées. Ce résultat est similaire à ceux trouvés pour d'autres plantes telles que *Rosmarinus officinalis L.* [32] et *Tetraclinis articulata* [33], qui ont prouvé que le séchage pendant une semaine entraîne une remarquable augmentation du rendement. Sauf que dans notre cas, cette augmentation n'est pas statistiquement significative.

Le test t pour le coefficient b_6 a montré que ce facteur n'a aucune influence sur le fonctionnement de l'hydrodistillation, car son risque de signification (P-value= 0.123) est de plus de 0,05.

4.2 PARAMÈTRES STATISTIQUEMENT NON NÉGLIGEABLES

4.2.1 TEMPS DE TRAITEMENT

Les deux graphes (Fig. 2) montrent que le temps (facteur b_3) est le facteur le plus influent sur l'opération d'hydrodistillation avec un coefficient de 0.065. Il contribue tout seul par 41.64% dans la variabilité de la réponse étudiée. Bien évidemment, le temps influe directement sur l'opération d'hydrodistillation, et son impact a été prouvé par plusieurs auteurs [12], [13], [14], [15], [16].

4.2.2 PÉRIODE DE RÉCOLTE

La période de récolte vient en seconde place avec un coefficient de -0.062 et une contribution de 37.73%. Ce résultat indique que le rendement est plus important en moitié du mois de juillet par rapport à celui inventorié en moitié du mois de septembre. Ces résultats sont conformes à ceux reportés par d'autres auteurs [34], [35], qui montrent que les meilleurs rendements d'huile essentielle de *Thymus vulgaris L.* correspondent au début de la phase de floraison, ce stage qui se déroule au cours du mois de juillet.

4.2.3 EFFET DE L'INDIVIDUALITÉ

L'effet de l'individualité est le troisième facteur qui affecte l'opération d'hydrodistillation avec un coefficient de 0.032 et une contribution de 10.13% dans la variabilité du rendement. Le signe négatif montre que le passage de l'individu 1 à

l'individu 2 dans la réalisation des essais entraîne une baisse dans le rendement en huile essentielle. Ce changement d'un individu a des facteurs tels que l'âge de la plante [36], le stade de croissance de ses organes [37], ou même à des facteurs génétiques [38].

4.2.4 RAPPORT ENTRE LA MATIÈRE VÉGÉTALE ET L'EAU

Un autre facteur qui a montré une influence significative sur le rendement a été inventorié : il s'agit bien évidemment du rapport entre la matière végétale et l'eau dans le ballon de distillation. Ce facteur a un coefficient de -0.023 et une contribution de 5.29 %. Le signe moins indique que le passage du niveau min (qui est le rapport 1/12) au niveau max (qui est le rapport 1/4) entraîne une baisse dans le rendement en huile essentielle. Plusieurs études ont montré que l'augmentation du rapport entre la matière végétale et l'eau entraîne une diminution du rendement [12], [14]. Cette diminution est expliquée par le fait qu'une quantité élevée de matière 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 [39].

4.2.5 TEMPÉRATURE DE CHAUFFAGE

Avec un coefficient de -0.019 et une contribution de 3.43 seulement, la température de chauffage est le dernier facteur ayant un effet significatif sur le rendement. Son augmentation entraîne une augmentation dans le débit de condensation, cette augmentation a un effet négatif sur le rendement. En effet, une grande augmentation du débit de condensation induit une diminution du temps de séjour du condensat dans le décanteur et ne laisse pas le temps aux huiles essentielles d'être séparées du liquide [40]. Ces résultats s'accordent parfaitement avec ceux obtenus par d'autres auteurs [11], [12], [39].

5 TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1. Facteurs et leurs niveaux réels et codés

Facteurs	Niveaux	Unités	Variables codés	Niveaux codés
Effet de l'individualité	Individus 1		X1	-1
	Individus 2			1
Ratio Matière/Eau	1/12		X2	-1
	1/4			1
Temps	150	Min	X3	-1
	210			1
Température de chauffage	250	°C	X4	-1
	350			1
Période de récolte	Moitié juillet		X5	-1
	Moitié septembre			1
Séchage	Fraiche		X6	-1
	Séchée			1

Tableau 2. Plan d'expériences du processus d'hydrodistillation de *Thymus vulgaris L.* avec les réponses enregistrées pour chaque essai

N°Exp	Effet de l'individualité	Ratio Matière/Eau	Temps	Température de chauffage	Période de récolte	Séchage	RDT
1	1	1	1	-1	1	-1	1.77
2	1	1	1	-1	1	-1	1.79
3	-1	1	1	1	-1	1	1.80
4	-1	1	1	1	-1	1	1.86
5	-1	-1	1	1	1	-1	1.68
6	-1	-1	1	1	1	-1	1.71
7	1	-1	-1	1	1	1	1.68
8	1	-1	-1	1	1	1	1.69
9	-1	1	-1	-1	1	1	1.58
10	-1	1	-1	-1	1	1	1.59
11	1	-1	1	-1	-1	1	1.99
12	1	-1	1	-1	-1	1	1.91
13	1	1	-1	1	-1	-1	1.71
14	1	1	-1	1	-1	-1	1.71
15	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.77
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.74

Tableau 3. Analyse de la variance pour le modèle postulé

Source de variance	Ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	p-value
Modèle	6	0,16375	0,027292	26.7748	<0,0001
Résidus	9	0,009225	0,001025		
Total	15				
Défaut d'ajustement	1	0,003025	0,003025	3,9032	0,0836
Erreur pure	8	0,0062	0,000775		
Erreur total	9	0,009225			
R ²	94,60%				

Tableau 4. Effets des coefficients du modèle qui relie la réponse aux facteurs

Nom	Coefficient	Effect	Ecart-Type	Ratio t	Prob
Constant	b0	1.749	0.008	220.48	< 0,0001 ***
Effet de l'individualité	b1	0.032	0.008	4.03	0,00303 **
Ratio Matière/Eau	b2	-0.023	0.008	-2.92	0,0167 *
Temps	b3	0.065	0.008	8.18	< 0,0001 ***
Température de chauffage	b4	-0.019	0.008	-2.35	0,0420 *
Période de récolte	b5	-0.062	0.008	-7.79	< 0,0001 ***
Séchage	b6	0.013	0.008	1.69	0,123

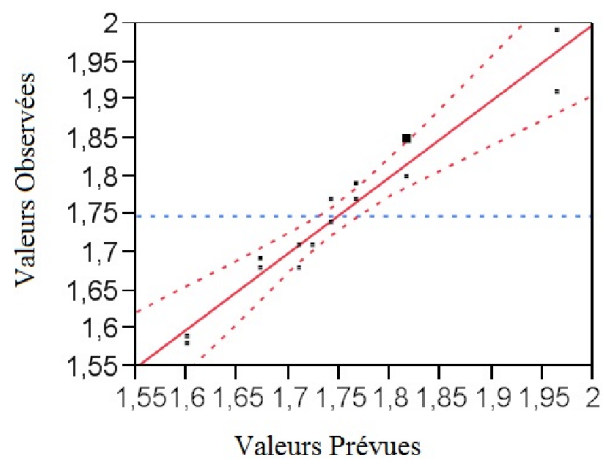


Fig. 1. Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues

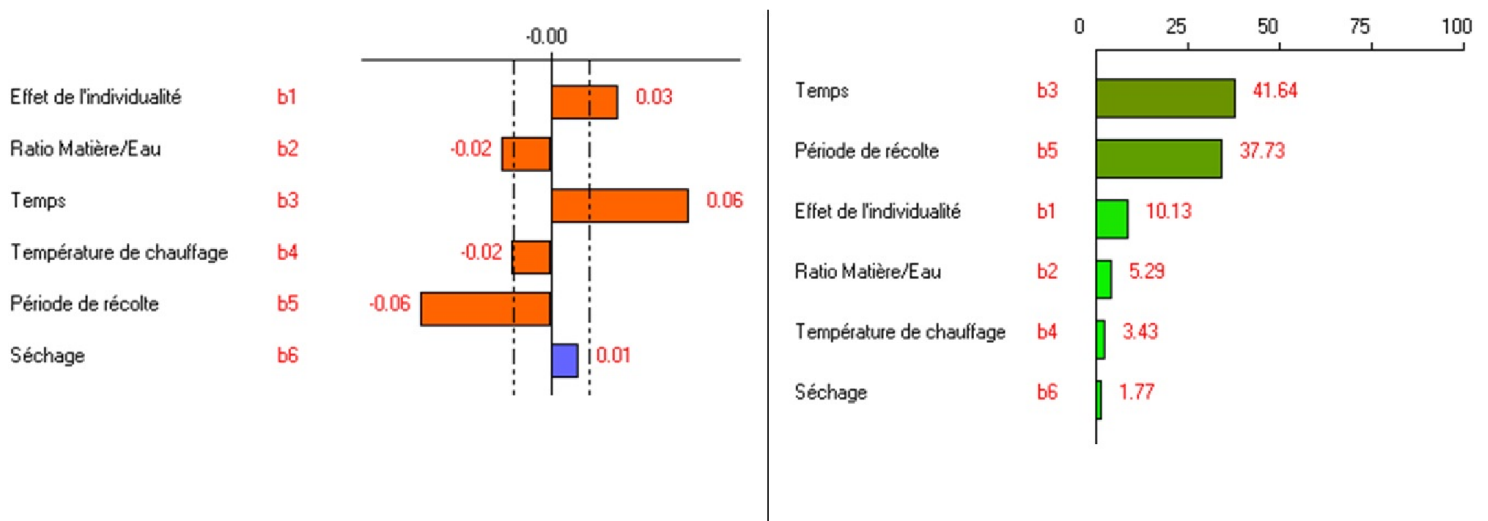


Fig. 2 A gauche: graphe des effets des facteurs, à droite: graphe qui montre le pourcentage de contribution de chacun des facteurs dans la variation de la réponse étudiée

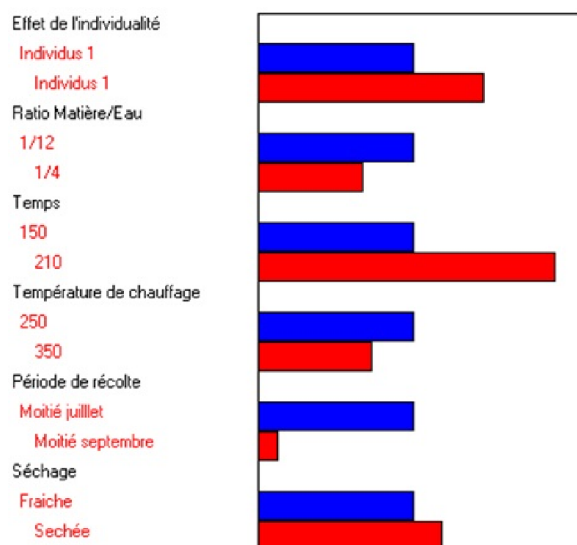


Fig. 3. Variation de la réponse en fonction de chacun des paramètres

6 CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons pu évaluer l'effet des conditions opératoires sur le rendement en huile essentielle de *Thymus vulgaris L.*, en utilisant comme stratégie la méthodologie des plans d'expériences. Les résultats montrent clairement que la conception expérimentale est une méthode appropriée pour faire le criblage des facteurs agissant sur l'opération d'hydrodistillation de la plante étudiée. Le plan de Plackett et Burman qui a été appliqué a conduit à un modèle du premier ordre dont les coefficients significatifs sont statistiquement relatifs aux facteurs les plus influents sur la réponse. Après la validation statistique du modèle obtenu, nous sommes passés à l'analyse des effets. Ainsi, ce modèle a permis, d'une part, de montrer que le temps de l'hydrodistillation, la période de récolte, l'effet de l'individualité, le rapport entre la matière végétale et l'eau et la température de séchage du ballon sont tous des facteurs qui influent sur l'hydrodistillation, ces facteurs ont tous des effets significatifs sur le rendement (0.065, -0.062, 0.032, - 0.023, - 0.019 Respectivement). D'autre part, ce modèle a démontré que, même si le séchage entraîne une légère augmentation dans le rendement, cette augmentation est jugée négligeable puisqu'elle est non significative statistiquement.

Afin de compléter cette étude, une étude d'optimisation doit être mise en jeu. Elle consistera à chercher les conditions opératoires optimales susceptibles de garantir un meilleur rendement, et ce, par l'utilisation d'un autre type de plans d'expériences conçu pour ce type d'études, Soit les plans d'optimisation de type surface de réponse en agissant sur les facteurs opératoires continus jugés influents par l'étude de criblage, tels que le temps, le rapport entre la matière végétale et l'eau et la température de séchage.

REFERENCES

- [1] H. El Arif, *Plantes médicinales Les boulets traînés par la filière*, 2011. [online] Available: <http://www.leconomiste.com/article/plantes-medicinales-brles-boulets-traines-par-la-filiere>
- [2] M. Özcan, J.-C. Chalchat, "Aroma profile of *Thymus vulgaris L.* Growing Wild in Turkey", *Bulgarian journal plantes physiology*. Vol. 30, no 4, pp. 68-73, 2004.
- [3] J. Amiot, *Thymus vulgaris, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaire*. Thèse de doctorat, Ecole nationale supérieure d'Agronomie de Montpellier, 2005
- [4] J. Kitajima, T. Ishikawa, A. Urabe and M. Satoh, "Monoterpenoids and their glycosides from the leaf of thyme". *Phytochemistry*, vol. 65, pp. 3279-3287, 2004
- [5] I. Rasooli, M.B. Rezaei and A. Allameh, "Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*", *International Journal of Infectious Diseases*, Vol. 10, pp. 236-241, 2006.
- [6] B.H. Naghdi, D. Yazdani, S. Mohammad Ali and F. Nazari, "Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris*", *Industrial Crops and Products*, Vol. 19, pp. 231-236, 2004.

- [7] G. Adwan, B. Abu-Shanab, K. Adwan and F. Abu-Shanab, "Antibacterial Effects of Nutraceutical Plants Growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa*", *Turkish Journal of Biology*, Vol. 30, pp. 239-242, 2006
- [8] E.A. Soto-Mendivil, J.F. Moreno-Rodriguez, M. Estarron-Espinosa, JA. Garcia-Fajardo and E.N. Obledo-Vazquez, "Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*", *E-Gnosis*, Vol. 4, no. 16, pp. 1-7, 2006.
- [9] S. Zeboudj, N. Belhanèche-Bensemra and R. Belabbès, "Use of surface response methodology for the optimization of the concentration of the sweet orange essential oil of Algeria by wiped film evaporator", *Journal of Food Engineering*, vol. 67, pp. 507-512, 2005.
- [10] R. L. Plackett and J. P. Burman, "The design of optimum multifactorial experiments". *Biometrika*, vol. 33, pp. 305-325, 1946.
- [11] T. Silou, M. Malanda and L. Loubaki, "Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* grâce à un plan factoriel complet 2^3 ", *Journal of Food Engineering*, vol. 65, pp. 219-223, 2004.
- [12] A. H. Ammar, F. Zagrouba and M. Romdhane, "Optimization of operating conditions of Tunisian myrtle (*Myrtus communis* L.) essential oil extraction by a hydrodistillation process using a 2^4 complete factorial design", *Flavour Fragrance Journal*, vol 25, pp. 503-507, 2010.
- [13] E. L. Wognin, Z. F. Tonzibo, K. A. Toure and Y. T. N'guessan, "Contribution à l'optimisation de la distillation des huiles essentielles extraites des fleurs de *chromolaena odorata* l king & robinson grâce à un plan factoriel complet 2^4 ", *Revue Ivoirienne des Sciences et Technologie*, vol. 15, pp. 23-37, 2010.
- [14] Q. Tan, X. Kieu, N. Kim and X. Hong, "Application of response surface methodology (RSM) in condition optimization for essential oil production from *Citrus latifolia*", *Emirates Journal of Food and Agriculture*, vol. 24, pp. 25-30, 2012.
- [15] K. Mu'azu, I.A. Mohammed-Dabo and S.M Waziri, "Development of Mathematical Model for the Prediction of Essential Oil Extraction from *Eucalyptus Citriodora* Leave", *Journal of Basic and Applied Scientific Research*, vol. 2, pp. 2298-2306, 2012.
- [16] M. S. Galadima, A. S. Ahmed, A. S. Olawale and I. M. Bugaje, "Optimization of Steam Distillation of Essential Oil of *Eucalyptus tereticornis* by Response Surface Methodology", *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 20, pp. 368-372, 2012.
- [17] J. Clevenger, "Apparatus for the determination of volatile oil", *Journal of the American Pharmacists Association*, vol. 17, pp. 345-349, 1928.
- [18] *Pharmacopée Française*. (10th edn). Maison neuve, Paris, 1983.
- [19] K.J. Horadam, *Hadamard Matrices and Their Applications*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 2007.
- [20] M. Claeys-Bruno, M. Dobrijevic and M. Sergent, *analyse de sensibilité : comparaison entre les plans d'expériences et la méthode monte carlo* in: 41èmes Journées de Statistique, Bordeaux, pp. 1-6, 2009.
- [21] W. Tinsson, *Plans D'expérience: Constructions et Analyses Statistiques*. Springer, Berlin, 2010.
- [22] M. Sergent, D. Dupuy, B. Corre and M. Claeys-Bruno, *comparaison de méthodes de criblage pour la simulation numérique* : 41èmes Journées de Statistique, pp. 1-6, Bordeaux, 2009.
- [23] J. Goupy, *Les plans d'expériences*. Revue MODULAD. Vol. 34, pp. 74-116, 2006.
- [24] L. Levin, F. Forchiassin and A. "Viale, Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements", *Process Biochemistry*, vol. 40, pp. 1381-1387, 2005.
- [25] L. Ganou, *Contribution à l'étude de mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielles*. PhD Thesis, Institut Polytechnique de Toulouse, Toulouse, 1993.
- [26] NR. Draper and H. Smith, *Applied Regression Analysis*. 3rd ed., Wiley, New York, 1998.
- [27] R.H. Myer and D.C. Montgomery, *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, Wiley, New York, 2002.
- [28] G.E.P. Box, W.G. Hunter and J.S. Hunter, *Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*, Wiley, New York, 1978.
- [29] NemrodW for Windows, experimental design software, 2000.
- [30] S. J. Kalil, F. Maugeri and M. I. "Rodrigues, Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization", *Process Biochemistry*, vol. 35, pp. 539-550, 2000.
- [31] K. Ravikumar, S. Krishnan, S. Ramalingam and K. Balu, "Optimization of process variables by the application of response surface methodology for dye removal using a novel adsorbent", *Dyes and Pigments*, vol.72, pp. 66-74, 2007.
- [32] B. Benjilali, *le matériel végétal et l'extraction* in : Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique, Corporation Laseve, pp. 61-80, Université Du Québec, Chicoutimi, 2005.
- [33] M. Bourkhiss, M. Hnach, B. Bourkhiss, M. Ouhssine, A. Chaouch and B. Satrani, "Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl)", *Agrosolutions*, vol. 20, pp. 44-48, 2009.

- [34] H. N. Badi , D. Yazdani, S. M. Ali, F. Nazari, "Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris L.*", *Industrial Crops and Products*, vol. 19, pp. 231–236, 2004.
- [35] A. R. Golparvar, "Determination of the Best Harvesting Times to Obtain Maximum Dry Herbage, Essential Oil and Thymol Yield in Garden Thyme (*Thymus Vulgaris L.*)", *International Journal of Life Science and Medical Research*, Vol. 1 no. 1, pp. 1-4, 2011.
- [36] M. Özgüven and S. Tansi, "Drug Yield and Essential Oil of *Thymus vulgaris L.* as in Influenced by Ecological and Ontogenetical Variation", *Journal of Agriculture and Forestry*, vol. 22, pp.537-542, 1998.
- [37] E. A. M. Al-Ramamneh, "Plant growth strategies of *Thymus vulgaris L.* in response to population density", *Industrial Crops and Products*, vol. 30, pp. 389–394, 2009.
- [38] A. C. Figueiredo, J. G. Barroso, L. Pedro and J.J.C. Scheffer, "Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils", *Flavour Fragrance Journal*, vol. 23, pp. 213–226, 2008.
- [39] J. Rabesiaka, R. Pierre and B. Razanamparany, "Optimization and Extrapolation to Pilot Scale of Essential Oil Extraction from *Pelargonium Graveolens*, by Steam Distillation", *Journal of Food Processing & Technology*, vol. 04, pp. 2–7, 2012.
- [40] N. Herzi, *Extraction et purification de substances naturelles: comparaison de l'extraction au CO2-supercritique et des techniques conventionnelles*, PhD Thesis, Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, 2013.