

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

BADJI MOKHTAR-ANNABA UNIVERSITY



جامعة باجي مختار - عنابة -

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA

Année 2012

Faculté des sciences  
Département de chimie

MEMOIRE  
Pour l'obtention du diplôme de *Magister*

*Etude par simulations numériques de la réactivité dans la  
réaction d'acylation enzymatique de substrats osidiques*

Option: Chimie Organique

Présenté par: *M<sup>me</sup>. BOUDJENIBA-BOUZAOUIT Nadia*

Devant le jury :

Directrice de mémoire:	<i>M<sup>me</sup>. Chahra BIDJOU-HAIOUR</i>	<i>Maître de conférences A</i>	<i>U.B.M., Annaba.</i>
Président:	<i>M. Abbes BOUKHARI</i>	<i>Professeur</i>	<i>U.B.M., Annaba.</i>
Examineurs:	<i>M. Fadhel ISMAIL</i>	<i>Professeur</i>	<i>U.B.M., Annaba.</i>
	<i>M. Zine REGAINIA</i>	<i>Professeur</i>	<i>U.B.M., Annaba.</i>

## *Résumé*

Ce travail est consacré à l'étude de l'effet des différents paramètres (température, temps, quantité du tamis moléculaire, quantité d'enzyme et équivalent de l'acide laurique) sur l'avancement de la réaction d'acylation enzymatique du D-xylose par l'acide laurique en utilisant la méthode des plans d'expériences.

Le plan de criblage de Blackett et Burman est utilisé afin d'identifier les facteurs les plus influents sur la conversion. Les résultats du criblage font apparaître trois facteurs importants. Ces facteurs sont ensuite étudiés par la méthodologie des surfaces de réponses (RSM), en utilisant le plan de Box et Behnken afin de déterminer les conditions optimales pour une conversion maximale.

**Mots clés** : acylation enzymatique, oses, plans d'expériences, criblage, surfaces de réponses (RSM).

## ملخص

يخصص هذا العمل لد راسة نأ ثبرمختلف المعايير المساهمة فى الأسترة الإنزيمية للكسيلوز (درجة الحرارة ، الزمن ، كمية المنخل الجزيئي ، كمية الإنزيم و تعادل حمض اللوريك ) باستعمال طريقة مخططات التجارب . نستعمل أولاً: تصميم " Plakett-Burman " لأجل التعرف على أهم العوامل المؤثرة على التحول. التصميم أظهر ثلاثة عوامل أكثر تأثير هي: درجة الحرارة، كمية المنخل الجزيئي و الزمن. هذه العوامل يتم دراستها باستعمال المخطط التجريبي " Box-Behnken " لتحديد قيم الشروط التجريبية المثلى لتحول أقصى الكسيلوز.

الكلمات المفتاحية:

الأسترة الإنزيمية ، سكر، مخططات التجارب .

## *Abstract*

This work is devoted to study the effect of the various factors (temperature, time, quantity of molecular sieves, quantity of enzyme and the equivalent of lauric acid) on the enzymatic acylation of D-xylose, using the method of the experimental designs.

The plan of screening of Plackett and Burman is used to identify the most influential factors on conversion. The results of the screening reveal the three most influential factors. These factors are then studied by Response Surface Methodology (RSM) for determination of optimal conditions for a maximum conversion.

**Key words:** enzymatic acylation, sugars, experimental design, Response Surface Methodology (RSM).

## ***Remerciements***

Je remercie vivement Madame *C.BIDJOU-HAIOUR*, Maître de conférences A, à l'Université d'Annaba, d'avoir accepté de me diriger tout au long de ce travail, qu'elle trouve ici le témoignage de ma gratitude.

Je remercie Monsieur *A. BOUKHARI*, Professeur à l'Université d'Annaba, de l'honneur qu'il me fait aujourd'hui de bien vouloir présider le jury de ce mémoire.

Monsieur *I. FADHEL*, Professeur au Département de génie chimique, à l'Université d'Annaba, a bien voulu accepter de faire partie de ce jury. Je le prie de croire en mes sincères remerciements.

Je remercie également Monsieur *Z. REGAINIA*, Professeur à l'Université d'Annaba, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier Madame *O. FERDJANI-SELAIMIA*, Maître assistante A à l'Université d'Annaba, pour toute l'aide et les précieux conseils qu'elle m'a prodigués

Mes remerciements vont également à tous ceux qui m'ont aidé de loin tout au long de ce travail.

# *Dédicaces*

*A mes chers parents,*

*A mon mari Abdallah,*

*A mes filles Imane et Wafa,*

*A toute ma famille,*

*A tous ceux qui me sont chers.*

## *Symboles et abréviations*

AL	Acide l'aurique
C	Conversion
[C]	Concentration
CCL	Lipase du <i>Candida cylindracea</i>
CCLimmo	Lipase du <i>Candida cylindracea</i> immobilisée
CM	Carrés moyens
EtOH	Ethanol
eq	Equivalent
F	Coefficient de Fisher
h	Heures
P	Coefficient de Probabilité
Qe	Quantité d'enzyme
R <sup>2</sup>	Coefficient de détermination
SM	Somme des carrés
TM	Tamis moléculaire
T°	Température
t	Temps
THF	Tétrahydrofurane

## *Sommaire*

Liste des tableaux.....	I
Liste des figures.....	II
Liste des schémas.....	III
Symboles et abréviations.....	IV

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
-----------------------------------	----------

### *Chapitre 1: Synthèse des esters de sucres par voie enzymatique.*

1. Introduction.....	2
2. Les esters de sucres.....	2
2.1. Définition.....	2
2.2. Obtention.....	3
2.2.1. Synthèse chimique.....	3
2.2.2. Synthèse enzymatique.....	4
2.2.3. Optimisation des conditions d'une réaction enzymatique.....	5
2.3. Applications des esters de sucres.....	7
3. Les enzymes.....	7
3.1. Définition.....	7
3.2. Les lipases.....	7
3.3. Immobilisation des lipases.....	8
4. Conclusion.....	9

### *Chapitre 2: Les plans d'expériences.*

1. Introduction.....	10
2. Historique.....	11
3. Définition et domaine d'application des plans d'expériences.....	11
4. Vocabulaire.....	11
4.1. Facteur.....	11
4.2. Réponse.....	12
4.3. Domaine expérimental et domaine d'étude.....	12



4.4 Matrice d'expérience.....	12
4.5. Effet d'un facteur.....	13
4.6. Interaction.....	13
4.7. Modèle mathématique.....	14
5. Différents types des plans d'expériences.....	14
5.1. Plans de mélanges.....	14
5.2. Plans de criblages.....	14
5.2.1. Plans factoriels complets à deux niveaux.....	14
5.2.2. Plans factoriels fractionnaire à deux niveaux.....	15
5.2.3. Plans de Plakett et Burman.....	15
5.3 Plans de modélisation.....	16
5.3.1. Plans composites centrés.....	16
5.3.2. Plans de Box-Behnken.....	17
6. Logiciels de plans d'expériences.....	18
7. Technique d'analyse.....	19
7.1. Analyse de la variance.....	19
7.2. Probabilité P.....	21
7.3. Coefficients de détermination ( $R^2$ , $R^2_{ajusté}$ ).....	21
7.4. Validation du modèle.....	22
7.5. Courbes d'isoréponses et surfaces de réponses.....	23
8. Conclusion.....	24

### ***Chapitre 3: Résultats et discussion***

1. Introduction.....	25
2. Préparation du plan d'expériences.....	25
2.1. Objectifs.....	25
2.2. La réponse.....	25
2.3. Détermination des facteurs et du domaine d'étude.....	26
2.4. Choix du Plan d'expériences.....	27
3. Le plan de criblage ( Plakett-Burman).....	27
3.1. Réalisation des essais.....	27

3.2. Analyse statistique des résultats.....	27
3.2.1. Représentation graphique des effets.....	28
a. Diagramme de Pareto.....	28
b. Diagramme des effets principaux.....	28
3.2.2. Détermination des effets significatifs et des coefficients du modèle.....	29
3.2.3. Equation du modèle mathématique.....	31
3.2.4. Analyse de la variance.....	31
4. Plan de Box-Behnken.....	32
4.1. Résultats statistiques et interprétations.....	34
4.2. Détermination du modèle mathématique.....	35
4.3. Validation du modèle.....	37
4.3.1. Validation primaire du modèle .....	37
4.3.2. Représentation graphique des réponses théoriques en fonction des réponses mesurées.....	38
4.4. Optimisation de la conversion.....	38
4.5. Vérification.....	41
4.6. Conclusion.....	41
 <b>Conclusion générale</b> .....	 43
 Protocoles expérimentaux.....	 44
Bibliographie .....	...49

## *Liste des tableaux*

### **Chapitre 2**

<b>Tableau 1:</b> Plan de Box-Behnken pour 3 facteurs.....	18
<b>Tableau 2:</b> Principaux logiciels des plans d'expériences.....	19
<b>Tableau 3:</b> Présentation générale d'un tableau d'analyse .....	21

### **Chapitre 3**

<b>Tableau 1:</b> Facteurs et domaine d'étude du plan de Plackett-Burman.....	26
<b>Tableau 2:</b> Plan de Plackett-Burman d'après la matrice d'expérimentation.....	27
<b>Tableau 3:</b> Effets et coefficients estimés pour la conversion (unités codées).....	29
<b>Tableau 4:</b> Effets et coefficients estimés pour la conversion (unités non codées).....	30
<b>Tableau 5:</b> Analyse de la variance pour C(%).....	32
<b>Tableau 6:</b> Facteurs et domaine d'étude du plan de Box-Behnken.....	33
<b>Tableau 7:</b> Plan de Box-Behnken avec les réponses expérimentales.....	33
<b>Tableau 8:</b> Coefficients de régression estimés pour la conversion C(%).....	34
<b>Tableau 9:</b> L'analyse de la variance pour la conversion C(%).....	34
<b>Tableau 10:</b> Coefficients de régression estimés pour la C(%) après exclusion des termes non significatifs (unité codées).....	36
<b>Tableau 11:</b> Analyse de la variance pour la C(%) après exclusion des termes non significatifs.....	36
<b>Tableau 12:</b> Comparaison entre les résultats expérimentaux et les valeurs calculées.....	37

### **Protocoles expérimentaux**

<b>Tableau 1:</b> Produits chimiques utilisé dans l'acylation enzymatique du D-xylose.....	45
--	----

## *Liste des schémas*

### **Chapitre 1**

<b>Schéma 1:</b> Estérification chimique du (2,3,4-tri-O-benzyl)-D-xylopyranose.....	4
<b>Schéma 2:</b> Estérification enzymatique de D-mannose.....	5
<b>Schéma 3:</b> Influence de l'activité de l'eau.....	5
<b>Schéma 4:</b> Influence de la nature du solvant organique.....	6
<b>Schéma 5:</b> Influence de la température.....	7

### **Chapitre 3**

<b>Schéma 1:</b> Estérification enzymatique de l' $\alpha$ -(+)-D-xylose.....	25
---	----

## *Introduction générale*

## *Introduction general*

L'industrie des tensioactifs est à la recherche de nouvelles molécules possédant des caractéristiques fonctionnelles bien précises et respectueuses de l'environnement. Les esters de sucres [1] sont dans ce contexte des tensioactifs non-ioniques qui présentent les avantages d'être biodégradables, non toxiques et non allergènes. Leur synthèse par voie enzymatique est une alternative pour la production de molécules intervenant dans la formulation de produits agro-alimentaires [2], cosmétiques [3] ou détergents [4]. Actuellement, les esters de sucres sont principalement employés en tant qu'agents émulsifiants ou dans la formulation de microémulsions [5].

Les travaux présentés dans ce mémoire portent sur l'application de la méthode des plans d'expériences à l'étude des différents facteurs (la température, le temps, la quantité du tamis moléculaire, la quantité d'enzyme et l'équivalent de l'acide laurique) qui affectent l'avancement de la synthèse enzymatique du 1-*O*-dodécanoyle-D-xylopyranose, un tensioactif non ionique.

La méthode des plans d'expériences, introduite au second chapitre, consiste en un ensemble homogène d'outils et de méthodes algèbro-statistiques visant à établir et à analyser les relations existants entre les grandeurs étudiées (réponses) et leurs sources de variation (facteurs). Les deux principales utilisations de la méthode des plans d'expérience sont :

-La technique du screening qui permet de déterminer parmi les facteurs recensés par l'expérimentateur, ceux qui sont les plus influents sur la variation de la réponse. On procède ainsi implicitement à une simplification du problème.

-La méthodologie des surfaces de réponses qui consiste à calculer les variations des réponses en fonction des facteurs jugés précédemment influents.

Pour mener cette étude nous avons fait appel dans un premier temps à un plan de criblage de Plakett-Burman, réalisé pour sélectionner les facteurs les plus influents sur la conversion. Ces facteurs sont par la suite étudiés par la méthodologie des surfaces de réponses.

Le présent mémoire est composé de quatre chapitres distincts :

Le premier chapitre sera consacré à une étude bibliographique sur la synthèse des esters de sucres par voie enzymatique et à des généralités sur la biocatalyse.

Dans le deuxième chapitre, nous aborderons la méthodologie des plans d'expériences. Nous montrerons l'efficacité de cette méthode par rapport à la méthode classique.

Le troisième chapitre sera consacré à la présentation et à la discussion des résultats obtenus.

Après une conclusion générale vient, la partie expérimentale dans laquelle les protocoles opératoires sont détaillés. Les références bibliographiques sont réunies par chapitre à la fin de ce mémoire.

## *Chapitre 1*

### *Synthèse des esters de sucres par voie enzymatique*

## 1. Introduction

L'industrie des tensioactifs est à la recherche de nouvelles molécules possédant des caractéristiques fonctionnelles bien précises et répondant aux exigences de plus en plus strictes en termes de qualité environnementale. Les tensioactifs sont de plus en plus utilisés dans les formulations et, par conséquent, une quantité importante de tensioactifs est produite et se retrouve ensuite dans la nature. Ceci implique la production de composés à la fois économiques (matières premières et procédés de fabrication) et respectueux de l'environnement.

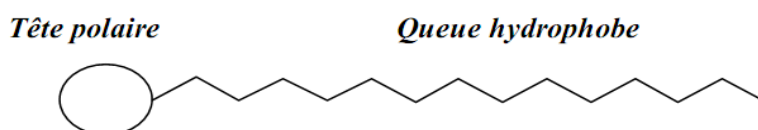
Les esters de sucres sont arrivés dans ce contexte, apportant de nouvelles solutions aux industriels du secteur des tensioactifs [1]. Les avantages des esters de sucres seront sans doute décisifs dans un avenir proche. Constitués d'un groupement osidique hydrophile et d'une chaîne grasse hydrophobe, les sucroesters possèdent un caractère amphiphile. Cette caractéristique leur confère une affinité particulière pour les interfaces de type air/eau et eau/huile et, en conséquence, la capacité d'abaisser l'énergie libre de ces interfaces. Ce phénomène est à la base de la stabilisation des systèmes dispersés.

Les esters de sucres amphiphiles et de structure simple ne sont pas disponibles dans la nature. Leur synthèse est réalisée par voie chimique, entraînant la production d'une quantité non négligeable de produits secondaires. Ces derniers doivent être éliminés, ce qui implique des coûts de purification relativement importants. Ce problème peut être contourné en optant pour une voie de synthèse beaucoup plus spécifique: la biocatalyse [2]. L'utilisation de lipases permet d'envisager le greffage d'un acide gras sur un sucre grâce à une liaison ester.

## 2. Les esters de sucres

### 2.1. Définition

Les esters de sucres sont des tensioactifs non-ioniques possédant d'une part une chaîne à caractère lipophile (chaîne grasse apolaire) et d'autre part un groupement à caractère hydrophile (groupement osidique polaire) comme illustré sur la figure 1.



**Figure 1:** Schéma simplifié d'un tensioactif



Les esters de sucres ont plusieurs avantages en tant que tensioactifs:

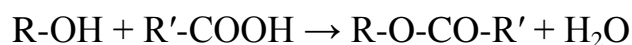
- Matières premières peu coûteuses et renouvelables.
- Biodégradabilité complète.
- Molécules ne présentant ni toxicité ni caractère irritant.
- Absence de goût et d'odeur.
- Molécule non ionique.
- Large gamme de structure disponibles et le caractère inoffensif, tant pour la santé que pour l'environnement.

## 2.2. Obtention

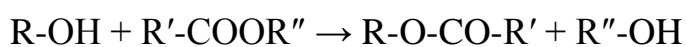
Les esters de sucres amphiphiles et de structures simples ne sont pas disponibles dans la nature. Leur synthèse est réalisée par voie chimique ou par voie enzymatique.

### 2.2.1. Synthèse chimique

D'un point de vue général, la réaction envisagée est une estérification (Figure 1) ou une transestérification (Figure 2) réalisée à haute température en présence d'un catalyseur alcalin [3].



**Figure 2:** Équation générale de la réaction d'estérification.



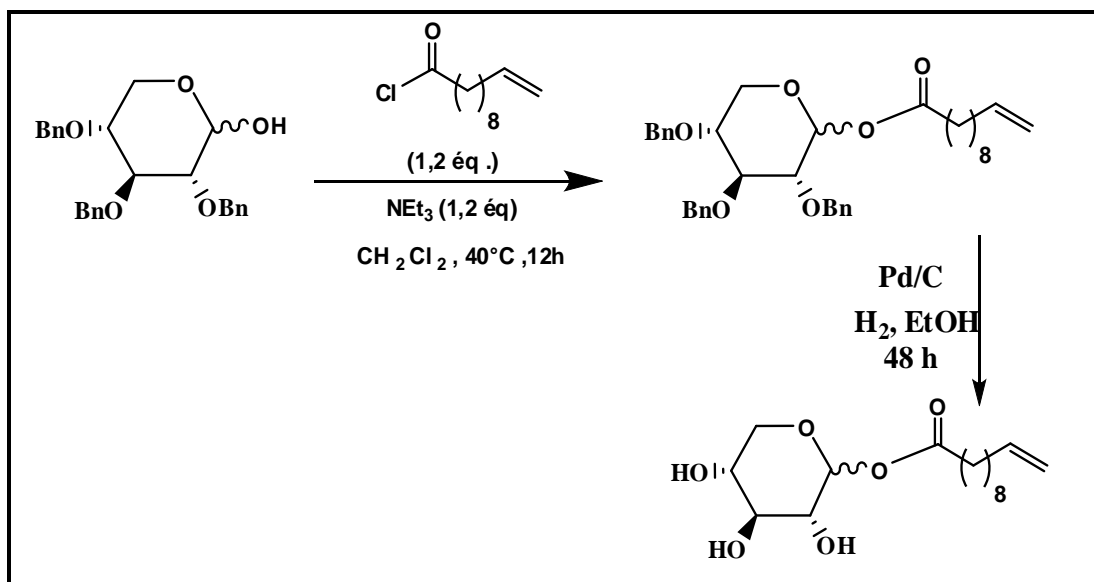
**Figure 3:** Équation générale de la réaction de transestérification

### Exemple de synthèse chimique

Un exemple de synthèse chimique tiré de la littérature est donné ci-après.

Damez C. a réalisé l'estérification du (2,3,4-tri-*O*-benzyl)-*D*-xylopyranose (Schéma 1) avec du chlorure d'un décénoyle en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane pendant

20h. Le produit de la réaction est un mélange  $\alpha/\beta$  (55/45) d'undéc-10'-énoyl (2,3,4-tri-*O*-benzyl)-D-xylopyranoside avec un rendement de 96% [4].



**Schéma 1:** Estérification chimique du (2,3,4-tri-*O*-benzyl)-D-xylopyranose.

### 2.2.2. Synthèse enzymatique

L'utilisation d'enzymes pour catalyser les réactions de synthèse permet de cibler le site de réaction et d'opérer dans des conditions plus douces, limitant ainsi les réactions secondaires, comme la caramélisation. Les seuls contaminants présents suite à la synthèse enzymatique sont le sucre et l'acide gras résiduels [5].

Le principe de la synthèse enzymatique est d'utiliser une enzyme hydrolytique (le plus souvent une lipase, nom abrégé d'une triacylglycérolacylhydrolase) dans un milieu non aqueux [6]. Dans ces conditions, l'activité de la lipase est inversée, passant de l'hydrolyse à l'estérification [7]. La biocatalyse permet d'envisager la production sélective de structures complexes et originales.

### Exemple de synthèse enzymatique

Favel. Aet coll. [8] ont réalisé l'estérification enzymatique du D-mannose avec l'acide myristique en présence de la lipase du *Candida antarctica* B (CALB) dans le 2-méthylbutan-2-ol avec un rendement de 31% comme illustré sur le schéma suivant :

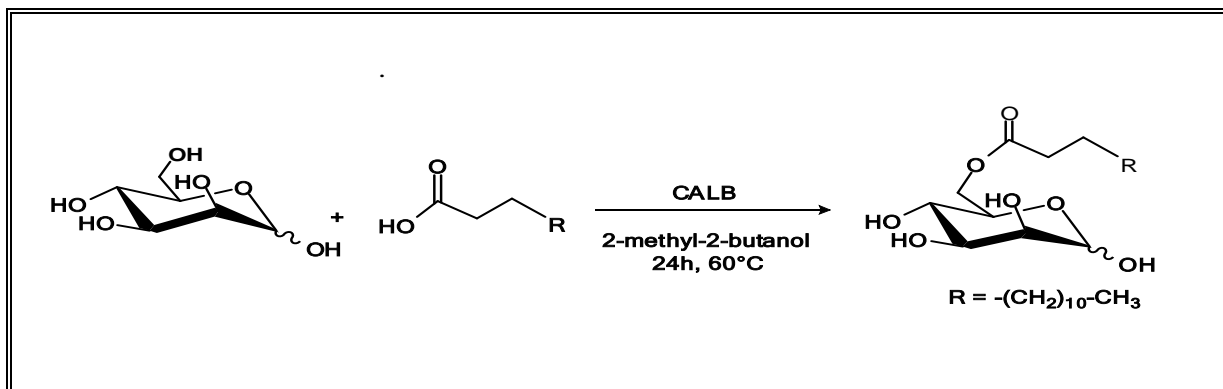


Schéma 2: Estérification enzymatique du D-mannose.

### 2.2.3. Optimisation des conditions d'une réaction enzymatique

L'optimisation d'une réaction bio-catalysée doit tenir compte de nombreux paramètres [9]. Nous en citons quelques-uns dans ce paragraphe.

- L'activité d'eau

Une teneur minimale en eau est nécessaire afin de maintenir l'enzyme dans sa conformation active [10]. Cette teneur varie en fonction du type de lipase [11].

Chamouleau et coll. ont réalisé une étude, qui relie la quantité de l'eau et la concentration du fructose monopalmitate [12] formée dans la réaction (schéma 3).

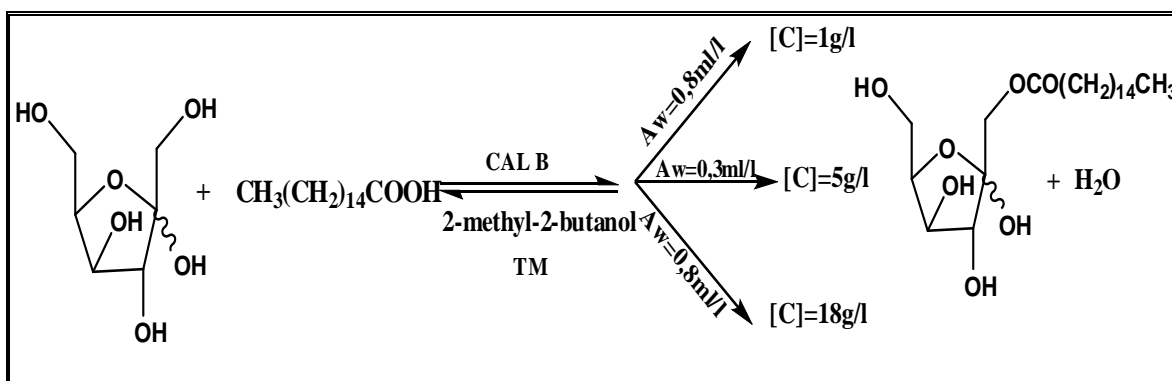
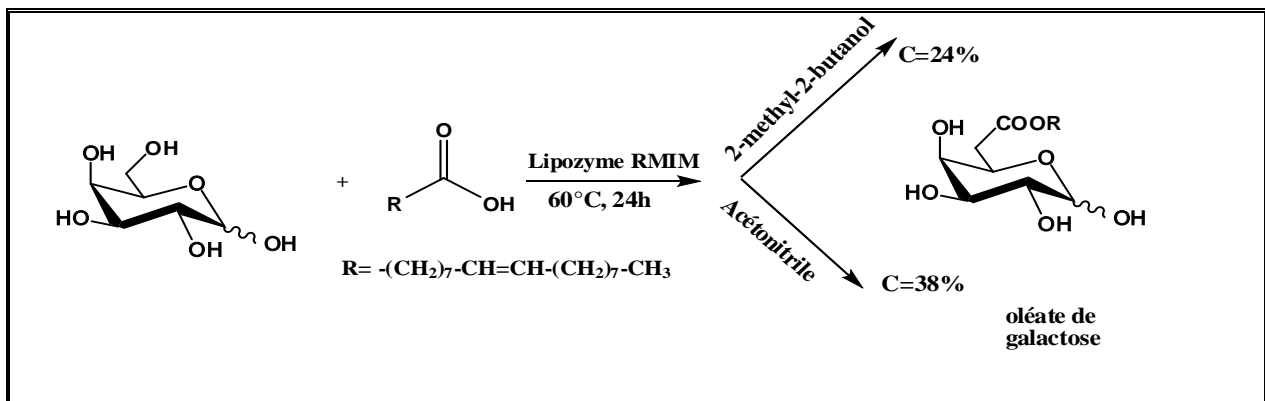


Schéma 3: Influence de l'activité de l'eau.

- **La nature du solvant organique**

Trois aspects sont à prendre en compte, à savoir le rendement réactionnel, la rentabilité et le respect de la législation concernant l'utilisation des solvants dans le domaine alimentaire. De plus, le solvant doit pouvoir solubiliser les substrats. Le volume de solvant doit également être optimisé afin de ne pas diminuer le contact des réactifs avec l'enzyme. Dans les solvants polaires la plupart des lipases sont désactivées, car les solvants polaires absorbent l'eau constitutive de la lipase qui joue le rôle d'un lubrifiant pour que l'enzyme garde sa forme active. D'autre part la solubilité des sucres est augmentée dans les solvants polaires, pour cette raison le choix d'un solvant approprié pour l'acylation enzymatique est primordial.

Le schéma ci-dessous montre l'influence de la nature du solvant [13].



**Schéma 4 :** Influence de la nature du solvant organique.

- **La Température:**

La température est aussi un des facteurs non négligeables qui affectent l'avancement et le rendement d'une réaction enzymatique. Elle influe sur la solubilité du substrat et sur la stabilité et l'activité de l'enzyme [14].

Zaidan et Coll. ont fait une étude concernant l'influence de la température sur l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du lactose par l'acide caprique en présence de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) immobilisée [15]. Ceci est illustré sur le schéma 5.

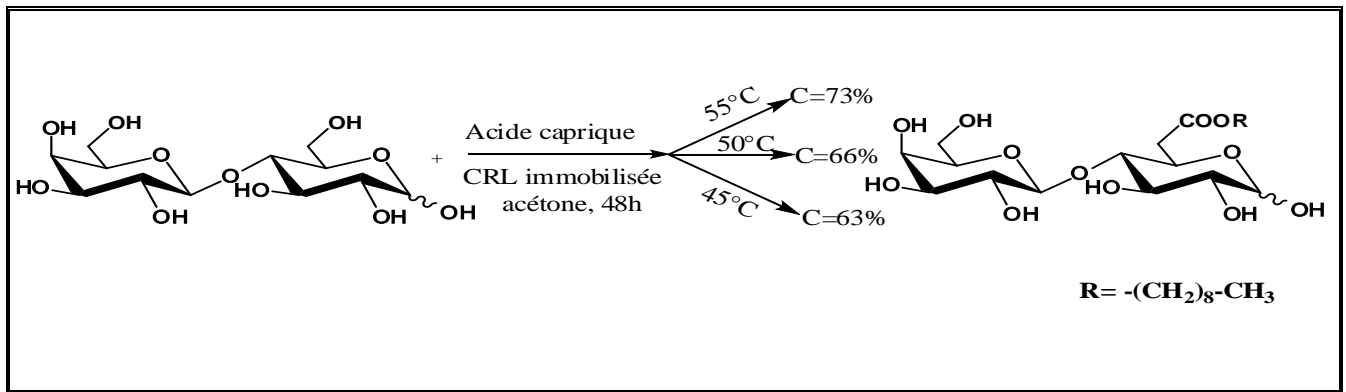


Schéma 5: Influence de la température.

### 2.3. Applications des esters de sucres

Les esters de sucres sont des tensioactifs non-ioniques possèdent des propriétés spécifiques (émulsifiant, dispersant, agent moussant et solubilisant). Leurs applications sont multiples. Ils jouent le rôle soit de matière première de base pour la formulation de produits détergents, pharmaceutiques ou cosmétiques, soit de produits axillaires dans les procédés de fabrication de l'industrie des additifs alimentaire, des peintures, du cuir, du phytosanitaire ...etc [16].

## 3. Les enzymes

### 3.1. Définition

Les enzymes sont des protéines qui allient la capacité de reconnaître très spécifiquement des molécules, au pouvoir de catalyser efficacement leurs transformations en composées utiles au métabolisme des organismes vivants.

Au cours de ces dernières années, le nombre d'enzymes connues a considérablement augmenté et leurs applications sont multiples, en chimie analytique, en pharmacologie, en toxicologie, dans l'industrie agro-alimentaire et dans le secteur biomédical [17].

Les réactions chimiques dans les systèmes biologiques se font rarement en l'absence d'enzymes.

Une enzyme ne favorise pas seulement une réaction chimique donnée, elle empêche aussi la présence de réactions secondaires gênantes.

### 3.2. Les lipases

Les lipases constituent un groupe d'enzymes très largement utilisées en biotechnologie qui trouve de nombreuses applications dans différents secteurs industriels tels que l'industrie pharmaceutique, l'industrie alimentaire, l'agrochimie (pesticides), l'industrie des détergents,

l'industrie des cosmétiques et des parfums, l'industrie du papier, l'industrie du cuir...etc [18, 19,20].

Elles jouent un rôle important dans le métabolisme des graisses et sont présentes dans la plupart des tissus animaux et végétaux, mais aussi dans de nombreux micro-organismes [21, 22]. La fonction biologique des lipases est de catalyser l'hydrolyse d'esters comme les triglycérides. Elles reconnaissent différemment les acides gras selon leur degré d'insaturation et la longueur de la chaîne carbonée. Cependant, elles sont capables d'hydrolyser une très grande variété de substrats naturels et non-naturels et de réaliser en milieu organique des réactions de synthèse.

### 3.3. Immobilisation des lipases

Du point de vue industriel, les biocatalyseurs immobilisés présentent une stabilité augmentée [23] et des changements dans l'activité enzymatique [24]. Il existe cinq méthodes générales d'immobilisation qui opèrent toutes en milieu tampon, ce sont:

- 1- Immobilisation par liaison covalente
- 2- Immobilisation par réticulation
- 3- Immobilisation par microencapsulation
- 4- Immobilisation par inclusion
- 5- Immobilisation par adsorption

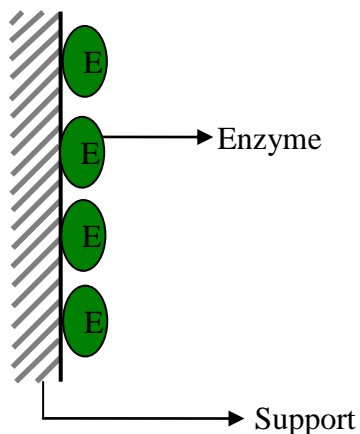
Parmi les diverses techniques d'immobilisation, l'adsorption est la méthode la plus économique et la plus simple à mettre en œuvre [25]. Dans ce procédé, l'enzyme est retenu à la surface d'un corps adsorbant, minéral ou organique, grâce à des liaisons de Van der Waals et des interactions homophiles, hydrophobes et/ou hydrophiles (Figure 4).

Les supports adsorbants utilisés sont très variés, tant du point de vue de leur structure chimique que du point de vue de leurs propriétés physiques (densité, granulométrie, porosité, etc.).

Différents supports tels que la céélite [26] et le carbonate de calcium [27] ont été exploités pour l'immobilisation des enzymes.

Les quantités d'enzyme immobilisé par adsorption sont extrêmement variables et sont fonction de la nature du support.

La figure suivante représente l'immobilisation par adsorption.



**Figure 4:** Immobilisation par adsorption.

#### 4. Conclusion

Les esters de sucres sont des molécules très présentes dans le domaine des industries cosmétique, pharmaceutique ou agroalimentaire du fait de leur structure particulière. Leur synthèse enzymatique est généralement préférée à la synthèse chimique. En effet, cette dernière consomme beaucoup d'énergie et est moins sélective envers les différents groupes hydroxyles du sucre. Ce problème peut être contourné en optant pour leur synthèse par voie la biocatalytique.

*Chapitre 2*  
*Les plans d'expériences*



## 1. Introduction

Dans toutes les disciplines, il est fréquent de souhaiter étudier un phénomène dépendant de différents paramètres. La méthode intuitive n'est pas toujours la meilleure. Elle consiste généralement à fixer le niveau de toutes les variables sauf une et de mesurer la réponse pour plusieurs valeurs de la variable mobile. Si plusieurs paramètres doivent être étudiés, il faut répéter cette technique pour chaque paramètre. Par exemple, si l'on souhaite étudier 7 paramètres à 4 niveaux il faut donc réaliser 16384 ( $4^7$ ) expériences. Ce nombre d'expériences représente un travail gigantesque et souvent irréalisable.

Pour résoudre ce problème, il faut donc réduire le nombre d'expériences à effectuer sans pour autant perdre sur la qualité des résultats recherchés. L'utilisation d'un plan d'expériences donne alors une stratégie dans le choix des méthodes d'expérimentation. Leur succès dans la recherche et l'industrie est lié au besoin de compétitivité des entreprises, ils permettent une amélioration de la qualité et une réduction des coûts.

L'objectif principal de l'expérimentation est d'établir le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt  $y$ , et des variables  $x_i$  de type:  $y=f(x_i)$ .

Pour cela il existe deux approches:

La première est une application classique intuitive adoptée par les chercheurs pendant plusieurs années. Elle consiste généralement à fixer le niveau de tous les facteurs sauf un, puis on recommence la procédure jusqu'au dernier facteur. Malheureusement cette méthode a des inconvénients [1] :

- Les interactions entre les facteurs ne sont pas estimées.
- Beaucoup d'expériences sont exigées quand le nombre des facteurs augmente.
- Seulement une petite partie du domaine expérimental est examinée.
- Les puissances optimums globales ne sont pas trouvées.

Donc cette méthode ne permet pas d'étudier l'évolution du système par rapport à la variation d'un seul facteur (Le modèle mathématique est impossible à ajuster).

La seconde est une approche multivariée qui consiste à varier plusieurs facteurs simultanément. Cette approche est subdivisée en approches séquentiels et simultanés [2,3].

- L'approche séquentiel consiste à conduire quelques expériences initiales et utilise leurs résultats pour définir les expériences qui suivent [4]. Cette approche peut être appliquée quand le domaine expérimental contient un optimum inconnu.
- L'approche simultanée donne une représentation du nombre d'expérience prédéfini, d'après une organisation expérimentale précise. Par exemple un plan expérimental [2,3,5-7].

La méthode des plans d'expériences est introduite principalement pour évaluer plusieurs facteurs simultanément et pour prévoir les interactions entre les facteurs.

## **2. Historique**

Les méthodes rigoureuses d'expérimentation, basées sur l'utilisation des plans d'expériences, sont dues aux travaux de Sir Ronald Fisher (1890-1962). Ce brillant mathématicien, très productif dans le domaine de la statistique, a été amené à s'intéresser aux techniques d'expérimentation suite à son emploi, en 1919 à la "Rothamsted Experimental Station" [8]. On trouve dans les travaux de Fisher les notions de répétition, de constitution de blocs, d'expérience factorielle confusion, d'interactions ou d'effets principaux et d'interactions et d'expériences en parcelles divisées [9,10]. Les idées de Fisher furent reprises par des spécialistes des sciences agronomiques.

En 1931, Fisher est rejoint à Rothamsted par Frank Yates (1902-1993). De leur collaboration, résultent entre autres de nouveaux développements en ce qui concerne les expériences factorielles, ainsi que les notions d'expériences en blocs aléatoires incomplets et d'expériences factorielles fractionnaires [11-12].

A partir des années 1935-1940, les notions d'expérimentation, qui jusque-là avaient été conçues et appliquées essentiellement dans le secteur agronomique, interviennent également dans le secteur industriel. Des concepts nouveaux apparaissent alors, tels que les plans de Plackett et Burman [13], la notion des surfaces de réponses [14, 15], l'application de cette notion au cas particulier des mélanges [16], les plans optimaux [17].

## **3. Définition et domaine d'application des plans d'expériences**

Un plan d'expériences est une méthode pour planifier ou organiser les expériences scientifiques et industrielles dans le but de retirer l'information correspondante à l'objectif fixé préalablement [18,19]. Leur but est d'obtenir un maximum d'informations avec un minimum d'expérimentations par rapport à l'objectif que l'on s'est fixé. Les plans d'expériences sont appliqués dans différents domaines des sciences : agronomie, biologie, calcul numérique, chimie, électronique, marketing, mécanique, physique... et cela, à tous les niveaux, depuis la recherche fondamentale jusqu'à la satisfaction du client [18].

## **4. Vocabulaire**

### **4.1. Facteur**

Les facteurs sont les variables que l'on désire étudier et qui sont supposées avoir une influence sur le système. Ils peuvent être quantitatifs ou qualitatifs, continues ou discrets,

contrôlables ou non contrôlables. Généralement, on prend en compte les facteurs caractérisés par une seule variable naturelle qualitative ou quantitative que l'on contrôle. Les facteurs sont limités par deux bornes, inférieure (bas) et supérieure (haut). On désigne le niveau bas par le signe (-1) et le niveau haut par le signe (+1) [20].

## 4.2. Réponses

Une réponse expérimentale est une manifestation mesurable que l'on observe lorsque l'on fait varier les paramètres étudiés. Un phénomène peut être éventuellement décrit par plusieurs réponses expérimentales [21].

## 4.3. Domaine expérimental et domaine d'étude

Une interprétation géométrique permet de mieux comprendre la construction des plans d'expériences et de mieux interpréter les résultats. Lorsqu'il y a  $n$  facteurs, il faut raisonner dans des espaces à  $n$  dimensions. Pour fixer les idées, on prend l'exemple de deux facteurs  $x$  et  $y$  à deux niveaux (+1) et (-1). Le domaine expérimental est le plan  $x$ - $y$  dans lequel toutes les valeurs de  $x$  et de  $y$  sont possibles. Mais, en général, un expérimentateur limite les variations des facteurs étudiés. On appelle domaine d'étude tous les points de la surface délimitée par les niveaux bas et haut de chaque facteur (surface en tramé bleu de la figure 1) [22].

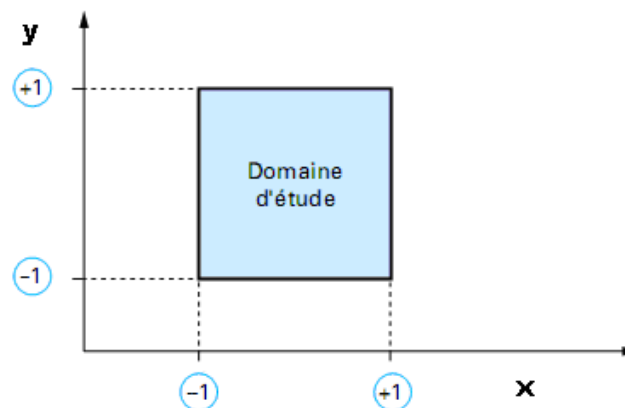


Figure 1: Définition du domaine d'étude

## 4.4. Matrice d'expérience

La matrice d'expérience est un objet mathématique qui représente, sous forme codée ou non codée, l'ensemble des expériences à réaliser. C'est un tableau constitué de  $n$  lignes correspondant aux  $n$  expériences à réaliser et de  $k$  colonnes, correspondant aux  $k$  variables étudiées. L'élément  $X_{ij}$  de la matrice ainsi formée correspond à la valeur des niveaux que prend la  $j^{\text{ième}}$  variable à la  $i^{\text{ième}}$  expérience [23].

### 4.5. Effet d'un facteur

L'effet d'un facteur  $x$  correspond à la variation de la réponse  $y$  lorsque  $x$  passe d'une valeur au niveau  $-1$  à une autre valeur au niveau  $+1$ , comme indiqué sur la figure 2. Graphiquement, plus l'inclinaison est forte, plus l'effet est important, et cela donne déjà des indications

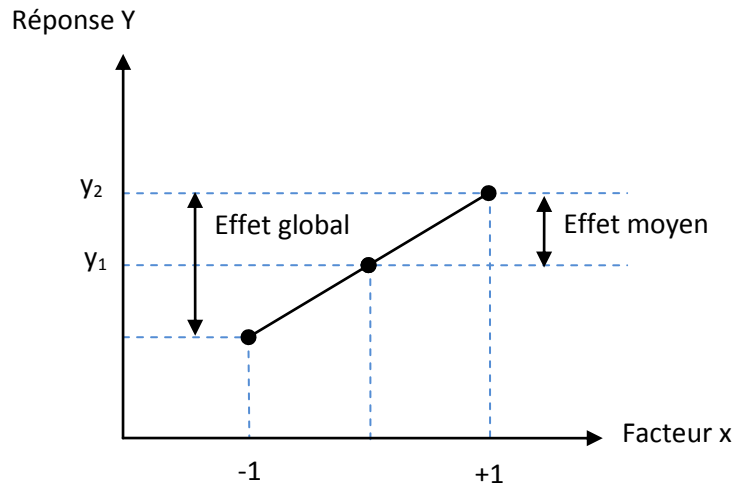


Figure 2: Illustration de l'effet d'un facteur

### 4.6. Interaction

L'effet d'un facteur dépendant de la valeur prise par un autre facteur est appelé interaction. Cette interaction se traduit sur un diagramme (figure 3) par le fait que les deux droites ne sont pas parallèles. Plus les droites s'écartent de la parallèle, plus le degré d'interaction est élevé.

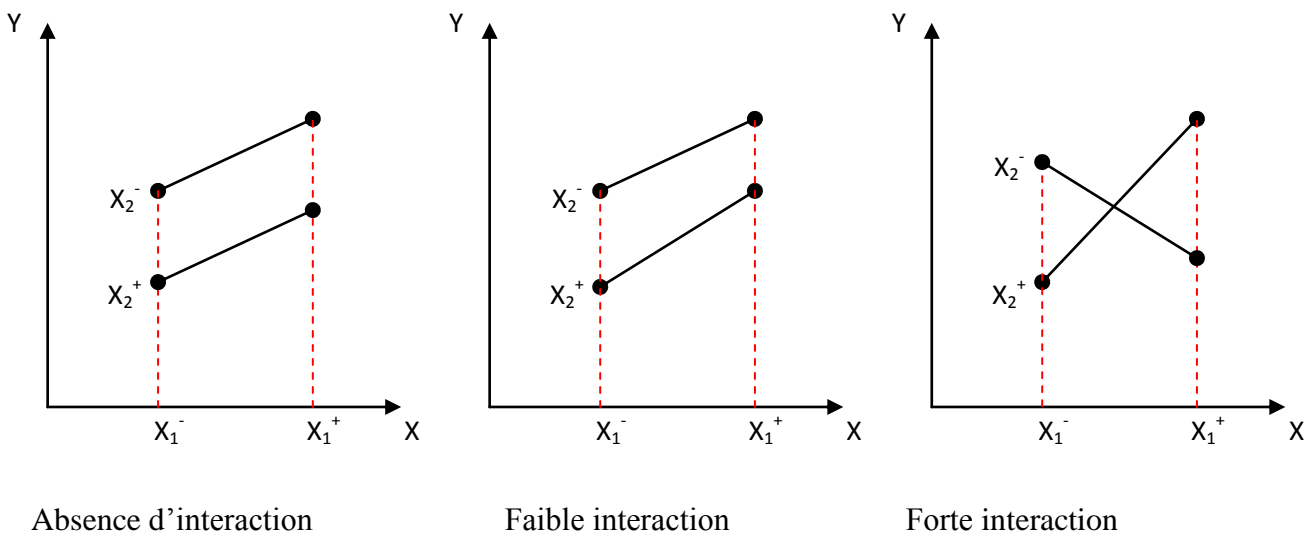


Figure 3 : Illustration d'une interaction

## 4.7. Modèle mathématique

C'est une relation mathématique qui montre le changement dans une réponse produit par le changement d'un ou plusieurs facteurs [24]. Le but de modéliser la réponse par un modèle mathématique est de pouvoir calculer ensuite toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligé de faire les expériences. Ce modèle est appelé *modèle postulé* ou *à priori* [25].

## 5. Différents types des plans d'expériences

Il existe trois grandes familles de plans d'expériences, plans de mélange, plans de criblage et plans de modélisation ou surfaces de réponses.

### 5.1. Plans de mélanges

Les plans de mélange sont des plans particuliers adaptés à l'étude des facteurs dépendants. Ils sont principalement utilisés pour l'étude de l'influence des proportions des constituants d'un produit sur une réponse donnée [26].

### 5.2. Plans de criblage

L'objectif de ces plans est de découvrir les facteurs les plus influents sur une réponse donnée. Aucune relation précise entre les variations des facteurs et celle de la réponse n'est établie. Parmi les plans proposés: plans factoriels complets à deux niveaux, plans factoriels fractionnaires et plans de Plackett-Burman [27].

#### 5.2.1. Plans factoriels complets à 2 niveaux

Les plans factoriels complets en tant que plans d'expériences sont issus des travaux de R.A.Fischer [10]. Chaque facteur a 2 niveaux. On aura donc  $2^k$  (k est le nombre de facteurs) essais au total. Un plan factoriel permet d'estimer, non seulement les effets des facteurs (A, B, C...), mais également toutes leurs interactions deux à deux, trois à trois,..., jusqu'à A.B.C.D.E..., qui fait intervenir les k facteurs de l'étude [28].

Les avantages des plans factoriels complets sont nombreux et nous n'en citerons que les principaux:

- Comme chaque facteur ne prend que deux niveaux les essais sont faciles à contrôler et les risques d'erreurs sont minimisés.
- Les plans factoriels complets sont des plans d'expériences optimaux qui étudient toutes les combinaisons possibles des niveaux des facteurs traités et qui nous garantissent les meilleurs résultats.
- La modélisation mathématique est immédiate.

-Les résultats obtenus avec un premier plan peuvent être utilisés en partie ou en totalité soit, pour explorer une zone du domaine expérimental soit, pour établir un modèle mathématique de degré plus élevé.

Le seul inconvénient de ces plans est qu'ils obligent rapidement à faire beaucoup d'essais. Par exemple, pour étudier simplement sept facteurs il faut réaliser 128 expériences. Cependant, de nombreuses interactions sont nulles et certains facteurs sont sans influence. C'est pourquoi les plans factoriels fractionnaires ont été développés.

### 5.2.2. Plans fractionnaires à deux niveaux

Les plans fractionnaires permettent de réduire la charge expérimentale en focalisant l'attention sur les effets les plus intéressants puisque en physico-chimie et comme dans d'autres domaines les interactions d'ordre 2 (A.B, A.C, B.C) et au-delà (A.B.C) sont bien souvent négligeables.

Lorsque le nombre de facteurs augmente, la solution proposée par les plans fractionnaires, consiste à utiliser pour l'étude de k facteurs les matrices des effets des plans complets  $2^{k-1}$ , ou  $2^{k-2}$ , ..., ou  $2^{k-p}$ . Les plans fractionnaires sont appelés pour cette raison plans  $2^{k-p}$ [28].

Les plans fractionnaires sont alors indispensables pour réduire le nombre d'essais.

Ils sont basés sur la théorie des aliasés que nous allons présenter ci-dessous à partir d'un exemple simple à 3 facteurs.

Le modèle mathématique de la réponse d'un plan factoriel complet à 3 facteurs comporte 8 coefficients :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + a_{123}x_1x_2x_3$$

Si on effectue 4 essais, on obtient un système de quatre équations à 8 inconnues. Pour réduire le nombre des inconnues, on introduit 4 contrastes ( $l_0, l_1, l_2, l_3$ ), les coefficients sont aliasés dans les contrastes. On adopte le modèle :

$$y = l_0 + l_1x_1 + l_2x_2 + l_3x_3$$

$$\text{Avec: } l_0 = a_0 + a_{123}, l_1 = a_1 + a_{23}, l_2 = a_2 + a_{13}, l_3 = a_3 + a_{12} \quad [29]$$

Dans un plan factoriel fractionnaire, les effets principaux sont toujours aliasés avec des interactions.

### 5.2.3. Les plans de Plackett-Burman

R.L. Plackett et J.P. Burman ont publié leur étude en 1946 dans Biometrika. Ils expliquent comment construire des plans permettant d'étudier un grand nombre de facteurs avec peu d'essais. Ils attribuent deux niveaux à chaque facteur et supposent que toutes les interactions

entre facteurs sont négligeables devant les effets principaux [28]. Le plan de Plackett-Burman est basé sur la matrice d'Hadamard qui présente les propriétés suivantes: [30]

- 1) les éléments sont +1, -1 ;
- 2) les matrices sont carrées et possèdent un nombre de ligne (ou de colonne) égale à 2000 multiple de 4 ;
- 3) ces matrices sont orthogonales, c'est-à-dire que le produit scalaire de deux lignes (ou colonne) est à égale à zéro.

L'inconvénient remarquable concernant les plans fractionnaires est la faiblesse dans l'hypothèse de linéarité des variables (la variation de la réponse est linéaire lorsque le facteur passe du niveau -1 au niveau +1). La modélisation mathématique n'est qu'une première approximation du modèle physique réel. Il faut passer à des plans contenant un plus grand nombre de niveaux par facteurs pour obtenir des modèles du second degré [28].

### 5.3. Plans de modélisation

L'objectif de ce plan est de trouver la relation mathématique du second degré qui lie les réponses mesurées aux facteurs elle est du type:

$$Y = b_0 + \sum b_i x_{ik} + \sum \sum b_{ij} x_{ik} x_{jk} + \sum b_{ik} x_{ik}^2 + \xi_k$$

Les plans factoriels complets sont également utilisables pour la modélisation mais, étant donné qu'il n'y a que deux niveaux par facteur, seuls des modèles du premier degré peuvent être utilisés. L'intérêt de ces plans est de faciliter le développement séquentiel d'une étude. On peut commencer par un plan factoriel et poursuivre l'expérimentation par un plan étoile. On aboutit alors à un plan composite interprétable à l'aide d'un modèle du deuxième degré [27].

Il existe plusieurs types de plans du second degré, les plus employés sont :

- les plans composites centrés
- Les plans de Box-Behnken

#### 5.3.1. Les plans composites centrés

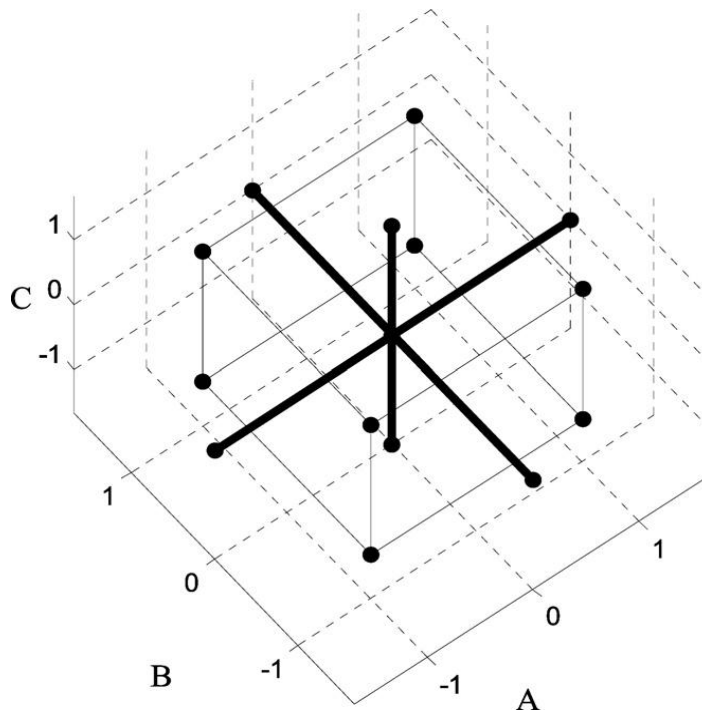
Les plans composites présentent trois parties:

- Les deux niveaux (-1, +1) du plan factoriel complet,  $2^f$  expériences ( $f$ , nombre de facteurs).
- Les deux niveaux  $(-\alpha, +\alpha)$  du plan étoile,  $2f$  expériences.
- Le point au centre du domaine d'étude.

Le nombre total de N essais à réaliser pour  $f$  facteur est donné par la relation suivante :

$$N = 2^f + 2f + 1. [2,5-7,31].$$

La valeur de  $\alpha$  doit être égale à :  $\alpha = (2^f)^{\frac{1}{4}}$ . Ces plans présentent l'avantage de se prêter au déroulement séquentiel d'une étude et d'exiger un nombre d'expériences relativement peu élevé [30]. Le plan composite pour 3 facteurs possède 15 expériences. Le lieu géométrique des points expérimentaux est représenté sur la figure4 [1].



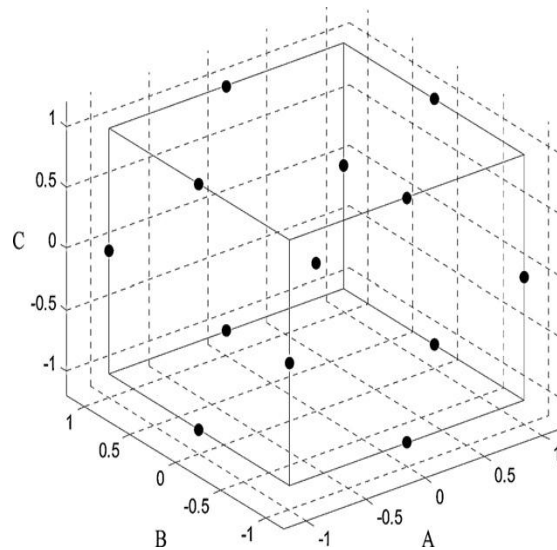
**Figure 4 :** Lieu géométrique des points expérimentaux d'un plan composite centré à 3 Facteurs.

### 5.3.2. Les plans de Box-Behnken

Les plans de Box-Behnken sont de mise en œuvre aisée car tous les facteurs ne prennent que trois niveaux : - 1, 0 et + 1, en variables codées, [32].

Les points expérimentaux sont au milieu des arêtes de chacun des côtés du cube (Figure5). Ce plan comporte douze essais auxquels on peut ajouter un (ou plusieurs) point central. La matrice du tableau 1 indique ces douze essais accompagnés d'un seul point central. Dans la pratique on réalise souvent 3 ou 4 points au centre [25].





**Figure5:** Lieu géométrique des points expérimentaux d'un plan de Box-Behnken à trois facteurs.

**Tableau 1:** Plan de Box-Behnken pour 3 facteurs

N° essai	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3
1	1	1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	-1	-1	0
5	1	0	1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	-1	0	-1
9	0	1	1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	-1	-1
13-15.	0	0	0

## 6. Logiciels des plans d'expériences

Les logiciels des plans d'expériences possèdent des bibliothèques de plans classiques et ils permettent aussi de construire les plans particuliers. On peut réaliser le calcul des coefficients

avec un tableur, mais cela nécessite de la programmation et du temps. Il est donc préférable d'utiliser un logiciel adapté qui effectue non seulement le calcul des coefficients mais aussi les calculs statistiques permettant d'évaluer la qualité du modèle mathématique. Les logiciels des plans d'expériences sont aussi programmés pour calculer des réponses dans tous les domaines d'étude, pour effectuer les analyses de variance, pour tracer des courbes d'isoreponses, pour construire les surfaces de réponses et pour déterminer les zones d'intérêt. Cet ensemble de possibilités permet d'effectuer de multiples analyses et de regarder ces données sous tous les angles. On arrive ainsi à extraire, en peu de temps, toute l'information présente dans les résultats d'un plan d'expériences [30].

Nous indiquons ci-dessous les principaux logiciels des plans d'expériences et les sites internet correspondants. Quelques-uns d'entre eux mettent à disposition des personnes intéressées des versions de démonstration et certains des versions complètes simplement limitées dans le temps [25].

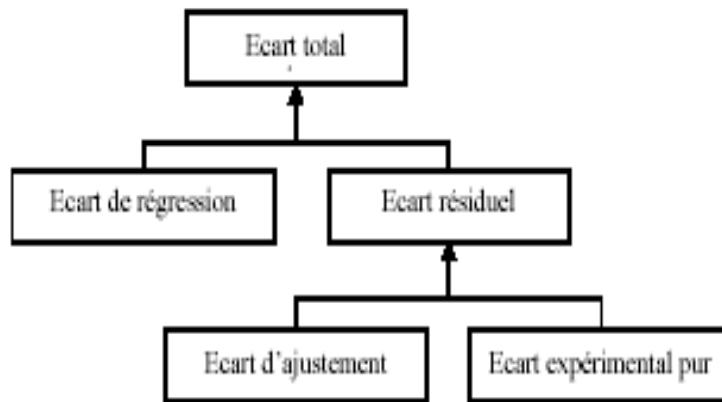
**Tableau 2 :** Principaux logiciels de plans d'expériences.

Logiciels	Sites internet
JMP	<a href="http://www.jmpdiscovery.com">http://www.jmpdiscovery.com</a>
Minitab	<a href="http://www.minitab.fr">http://www.minitab.fr</a>
Statistica	<a href="http://www.intesoft.com/produits/tech/statistica">http://www.intesoft.com/produits/tech/statistica</a>
Statgraphics	<a href="http://www.sigmaplus.fr">http://www.sigmaplus.fr</a>
Unscrambler	<a href="http://www.camo.no">http://www.camo.no</a>
Pirouette	<a href="http://www.infometrix.com">http://www.infometrix.com</a>
Modde	<a href="http://www.umetrics.com">http://www.umetrics.com</a>

## 7. Technique d'analyse

### 7.1. Analyse de la variance

L'analyse de la variance (ANOVA) est un outil essentiel dans la détermination de la signification d'un effet ou d'un modèle mathématique. Le principe de l'analyse de la variance est basé sur le calcul de l'écart total entre les différentes mesures  $y_i$  du plan d'expériences et la moyenne de ces mesures. Cet écart se décompose en différentes composantes comme l'illustre la figure 6 [27].



**Figure 6:** Différents écarts.

Une partie de l'écart total est modélisable par le modèle mathématique, c'est l'écart de régression. Une autre partie de l'écart total n'est pas modélisable, c'est l'écart résiduel. Celui-ci correspond à la différence entre la réponse mesurée expérimentalement et la même réponse modélisée. Cet écart, considéré comme une erreur, est donc la somme de deux composantes : l'erreur expérimentale pure  $\sigma_i$  et l'erreur d'ajustement  $\Delta_i$ . L'écart expérimental pur correspond à l'erreur aléatoire de l'expérimentation. Cet écart est dû au fait que si l'on répète un certain nombre de fois la même expérience, on obtiendra à chaque fois une mesure  $y_i$  de valeur différente. L'écart dû au manque d'ajustement correspond à un choix inadapté du type de modèle postulé.

L'ensemble de l'analyse de la variance et les différentes relations utilisées sont donnés dans le tableau 3 où  $y_i$  est la valeur de la  $i^{\text{ème}}$  réponse,  $\bar{Y}$  la moyenne des réponses du plan,  $\eta_i$  la réponse prédite d'après le modèle mathématique pour la  $i^{\text{ème}}$  expérience,  $y_i^0$  une mesure au centre du domaine,  $\bar{Y}^0$  la moyenne de l'ensemble des expériences au centre du domaine et  $n_0$  le nombre d'expériences répétées au centre du domaine d'étude.

**Tableau 3 :** Analyse ANOVA sur l'ajustement du modèle.

	Somme des carrés (notée $SS$ )	Degré de liberté (noté $\nu$ )	Variance (%) notée ( $V$ )	F	P
Ecart total	$SS_{tot} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{Y})^2$	$\nu_{tot} = n-1$	$V_{tot} = \frac{SS_{tot}}{\nu_{tot}}$	•	•
Ecart résiduel	$SS_{res} = \sum_{i=1}^n (\eta_i - y_i)^2 = \sum_{i=1}^n e_i^2$	$\nu_{res} = n - \nu_{modèle}$	$V_{res} = \frac{SS_{res}}{\nu_{res}}$	F <sub>1</sub>	P <sub>1</sub>
Ecart de régression	$SS_{reg} = SS_{tot} - SS_{res}$	$\nu_{reg} = p-1$	$V_{reg} = \frac{SS_{reg}}{\nu_{reg}}$		
Ecart expérimental pur	$SS_{exp} = \sum_{i=1}^{n_i} (y_i^0 - \bar{Y}^0)^2$	$\nu_{exp} = n_0-1$	$V_{exp} = \frac{SS_{exp}}{\nu_{exp}}$	F <sub>2</sub>	P <sub>2</sub>
Ecart d'ajustement	$SS_{aju} = SS_{res} - SS_{exp}$	$\nu_{aju} = \nu_{res} - \nu_{exp}$	$V_{aju} = \frac{SS_{aju}}{\nu_{aju}}$		

### 7.2. Probabilité P

La statistique la plus importante dans le tableau de l'analyse de la variance est la valeur de P. Cette valeur peut prendre des valeurs comprises seulement entre 0 et 1. Si elle est inférieure à 0.05, on conclut que l'effet est significatif et si elle est inférieure à 0.01, il est possible de conclure que le facteur est hautement significatif.

### 7.3 Coefficients de détermination ( $R^2$ , $R^2_{ajusté}$ )

- On définit le coefficient de détermination  $R^2$  comme étant la fraction des variations de la réponse expliquée par le modèle seul. Ce coefficient est donné par la relation ci-dessous :

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\eta_i - \bar{Y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{Y})^2}$$

Le  $R^2$  est donc une mesure de la qualité du modèle qui prend des valeurs comprises entre 0 et 1. S'il est proche de 1, le modèle permet de retrouver les valeurs des réponses mesurées. S'il est égal à 0, le modèle n'explique rien.

- On définit de la même façon le coefficient de détermination ajusté  $R^2_{aju}$  comme étant la fraction des variations de la réponse expliquée par le modèle seul, relativement aux degrés de liberté correspondants. L'expression de  $R^2_{aju}$  est donnée par :

$$R^2_{aju} = 1 - \frac{\frac{\sum_{i=1}^n (n_i - \bar{y}_i)^2}{n - v_{modèle}}}{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{Y})^2}{n - 1}}$$

Du fait de la prise en compte des degrés de liberté, on a toujours  $R^2_{aju} \leq R^2$ .

## 7.4 Validation du modèle

Dans la pratique, trois méthodes de validation sont utilisées :

- Test de signification globale de la régression (Teste de validation 1).
- l'analyse du manque d'ajustement (Teste de validation 2).
- l'utilisation de points tests.

### Test de validation 1

La qualité globale du modèle mathématique ajusté permet de savoir si ce modèle résume correctement les résultats des essais du plan d'expériences et si cela aide la comparaison de la variance attribuable à la régression de la variance résiduelle, au moyen du test de Fisher, pour ce faire, on calcule ainsi [32] :

$$F_1 = \frac{SS_{reg}/v_{reg}}{SS_{res}/v_{res}}$$

Avec

$\bar{Y}$  valeur moyenne des réponses mesurées,

$v_{reg}$ : nombre de degrés de liberté (ddl) associé à la somme des carrés des écarts à la moyenne de la régression,

$v_{res}$ : nombre de degrés de liberté associé à la somme des carrés des résidus.

La valeur de ce rapport doit être supérieure à la valeur critique de Fisher à un niveau de confiance supérieur à 95% ( $F_{0,05}(v_{reg}, v_{res})$ ) pour que la régression soit significative.

**Test de validation 2**

Il nécessite une analyse de la variance qui consiste à évaluer et comparer entre elles les variances du manque d'ajustement, expérimentales et résiduelles. Ces variances ont, en désignant par  $\nu$  le nombre de degrés de liberté associé à une somme de carrés (SS), les expressions suivantes [32]:

- variance résiduel  
 $SS_{res}/\nu_{res}$
- variance expérimentale  
 $SS_{exp}/\nu_{exp}$
- variance du manque d'ajustement  
 $SS_{aju}/\nu_{aju}$

La somme des carrés de la variance due au manque d'ajustement ( $SS_{aju}$ ) et le nombre de degrés de liberté ( $\nu_{aju}$ ), qui lui est associé, sont calculés par :

$$SS_{aju} = SS_{res} - SS_{exp}$$

$$\nu_{aju} = \nu_{res} - \nu_{exp}$$

Le modèle est validé si la variance due au manque d'ajustement, est non significative, c'est-à-dire si la valeur du rapport F défini par :

$$F_2 = \frac{SS_{aju}/\nu_{aju}}{SS_{exp}/\nu_{exp}}$$

est inférieure à la valeur critique de Fisher :  $F_{0,05}(\nu_{aju}, \nu_{exp})$ .

**Validation par les points tests**

Elle consiste à réaliser des expériences supplémentaires en des points situés à l'intérieur du domaine d'étude, et à comparer les valeurs mesurées à celles calculées à partir du modèle. Ce dernier est validé si les différences ( $y_i - \eta_i$ ) entre les valeurs mesurées  $y_i$  et calculées  $\eta_i$  ne sont pas statistiquement significatives [32].

**7.5. Courbes d'isorréponses et surfaces de réponses**

L'exploitation du modèle validé est aussi réalisée graphiquement en traçant en 2D [1] les courbes d'isorréponses (Figure 7a). Pour ce faire, on choisit, à chaque fois, deux variables à étudier. Les niveaux des autres variables étant fixés (par exemple, à leur valeur moyenne). En ajoutant une troisième dimension au graphe des courbes d'isorréponses, pour indiquer les

valeurs de la réponse, on obtient une surface de réponses (Figure 7b) illustrant l'évolution de la réponse en fonction des niveaux des deux facteurs choisis [32].

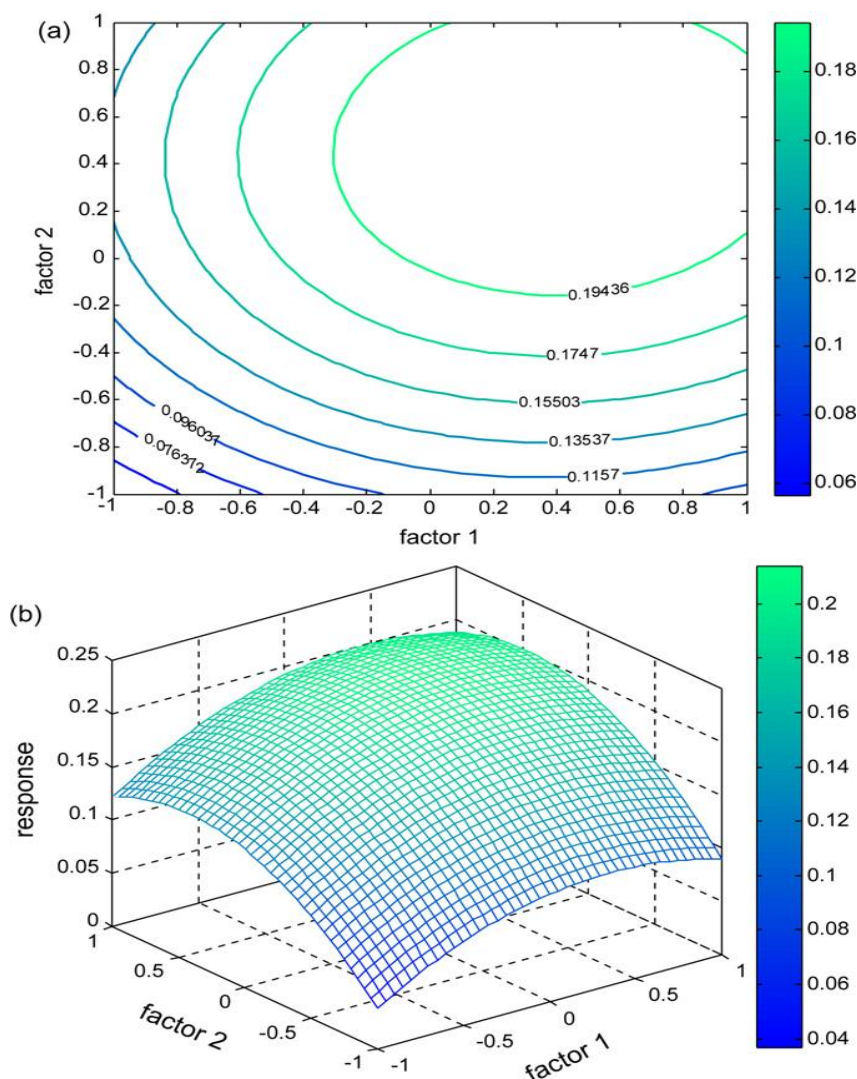


Figure 7 : Courbe d'iso- réponse et surfaces de réponses.

## 8. Conclusion

L'approche des plans d'expériences, consiste à organiser la démarche expérimentale et l'analyse décisionnelle en appliquant plusieurs outils et tests statistiques. L'utilisation et l'intérêt des plans d'expériences conduit à établir un plan comportant le maximum de précision dans les résultats avec un minimum d'expériences.

Dans ce travail, nous avons utilisé les plans d'expériences afin d'étudier l'influence des différents paramètres réactionnels sur l'avancement de la réaction d'acylation enzymatique de D-xylose.

*Chapitre 3*  
*Résultats et discussion*



## 1. Introduction

Les esters de sucres sont des tensioactifs non ioniques présentant de nombreux avantages dont notamment la diversité des structures disponibles, la biodégradabilité, la non toxicité et le caractère inoffensif, tant pour la santé que pour l'environnement.

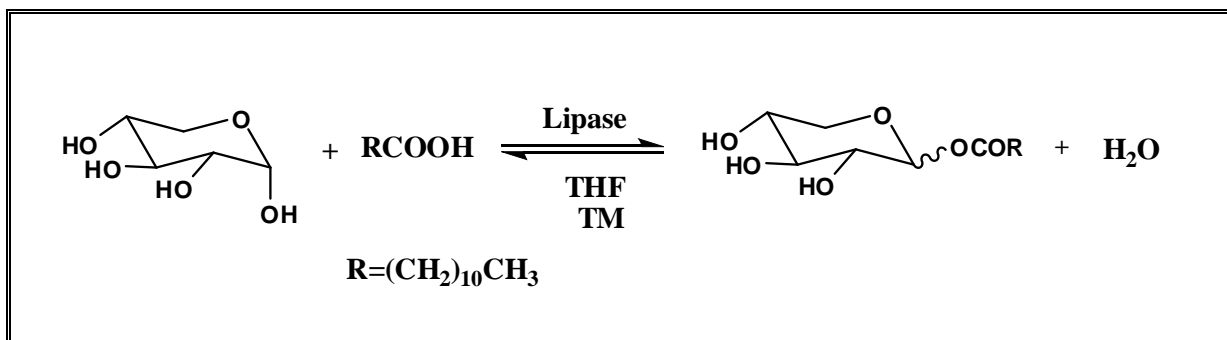
Les travaux présentés dans ce mémoire concerne l'application de la méthodologie des plans d'expériences à la réaction d'estérification enzymatique du D-xylose par l'acide laurique, en présence de la lipase du *Candida cylindracea* (CCL) immobilisée afin d'optimiser la synthèse du 1-O-dodécanoyle-D-xylopyranose, un tensioactif non ionique.

## 2. Préparation du plan d'expériences

### 2.1. Objectifs

L'influence des différents paramètres réactionnels sur l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du D-xylose (schéma 1) est étudiée.

#### Réaction



**Schéma 1:** Estérification enzymatique de l' $\alpha$ -(+)-D-xylose.

L'enzyme utilisée est la lipase du *Candida cylindracea* (CCL) immobilisée sur la célite à l'échelle du laboratoire. La détermination des conditions opératoires optimales permettant d'atteindre une conversion maximale du sucre de départ est réalisée à l'aide la méthodologie des plans d'expériences. Ce qui revient à réaliser une série de N expériences et à déterminer la valeur de la fonction réponse pour ces N configurations. Une relation de modélisation en est alors déduite.

### 2.2. Réponse

La réponse choisie est le taux d'avancement de la réaction d'estérification, c'est la conversion (C%). Elle est mesurée par titrage de la quantité de l'acide laurique présente dans le milieu réactionnel [1].

### 2.3. Détermination des facteurs et du domaine d'étude

Les facteurs examinés lors de cette étude sont:

- La température de la réaction ( $T^\circ$ ): la solubilité du sucre et la stabilité des enzymes dépendent fortement de la température du milieu réactionnel. La température est donc un facteur important. Pour confirmer la signification de l'effet de ce facteur sur la conversion du sucre, nous avons réalisé les réactions à  $40^\circ\text{C}$  et à  $60^\circ\text{C}$ .

- Le temps de la réaction (t): dans la littérature, les temps longs sont généralement favorables à la synthèse des esters de sucres et donne des taux de conversions élevées [2]. Nous avons choisi comme valeur inférieure 24h, et comme valeur supérieure 72h.

- La quantité du tamis moléculaire (TM): l'estérification enzymatique est une réaction réversible qui se produit entre un acide gras et un alcool en présence d'une lipase pour donner un ester et de l'eau. Pour favoriser la formation de l'ester il faut éliminer l'eau produite au cours de la réaction. Le tamis moléculaire est à absorber cette eau. Afin d'étudier l'influence de la quantité du tamis moléculaire sur la conversion, nous avons choisi 10 mg comme valeur minimale et 30 mg comme valeur maximale.

-La quantité d'enzyme ( $Q_e$ ): pour confirmer la signification de l'effet de la quantité d'enzyme sur la conversion, nous avons choisi 10 mg comme valeur inférieure et 30 mg comme valeur supérieure.

-L'équivalent de l'acide laurique ( $E_q$ ): est un des paramètres importants dans les réactions d'estérification enzymatique. Nous avons choisi deux valeurs de l'équivalent de l'acide laurique : 0,5eq et 1eq.

Nous avons regroupé les cinq facteurs étudiés et leur domaine d'étude dans le tableau 1.

**Tableau 1.** Facteurs et domaine d'étude du plan de Plackett-Burman

Facteurs	Symbole	Unités	Niveaux	
			-1	+1
La température	T	$^\circ\text{C}$	40	60
Le temps	t	h	24	72
La quantité du tamis moléculaire	TM	mg	10	30
La quantité de l'enzyme	$Q_e$	mg	10	30
L'équivalent de l'acide laurique	$E_q$	eq	0,5	1

## 2.4. Choix du Plan d'expérience

Nous avons décidé de faire appel dans un premier temps à un plan de criblage. C'est un plan du premier degré permettant de trier les facteurs en faisant ressortir les plus influents.

Nous avons choisi le plan de Plackett-Burman car c'est généralement le plus employé dans des études similaires en raison de son économie en termes de nombre d'essais.

## 3. Plan de criblage (Plackett-Burman)

### 3.1 Réalisation des essais

Les essais sont menés conformément au plan de Plackett-Burman pour les 5 facteurs. Les expériences se sont déroulées selon la matrice de ce plan. Elle représente la fixation des facteurs à différents niveaux, comme il est montré dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Plan de Plackett-Burman d'après la matrice d'expérimentation.

Ordre d'essai	Facteurs					Réponse
	Eq	Qe	TM	T°	t	C(%)
1	0,5	30	30	60	24	35
2	0,5	10	10	40	24	20
3	1,0	30	10	60	24	40
4	0,5	30	10	40	24	20
5	0,5	10	30	60	72	50
6	1,0	10	30	40	24	10
7	1,0	30	30	40	72	20
8	1,0	10	30	60	24	45
9	1,0	10	10	40	72	30
10	0,5	30	30	40	72	32
11	1,0	30	10	60	72	70
12	0,5	10	10	60	72	60

### 3.2. Analyse statistique des résultats

Le traitement des données expérimentales a été effectué par régression linéaire multiple à l'aide du logiciel Minitab14.

### 3.2.1. Représentation graphique des effets

#### a. Diagramme de Pareto

Il permet d'extraire les paramètres les plus importants (figure 1). Parmi tous les facteurs étudiés, et au niveau de confiance choisi ( $\alpha = 0,05$ ), la température ( $T^\circ$ ) et le temps ( $t$ ) apparaissent comme des facteurs très influents, la quantité de tamis moléculaire (TM) peut d'après ce même diagramme avoir un effet sur la réponse. L'équivalent de l'acide laurique (Eq) et la quantité d'enzyme (Qe) n'ont pas d'effets significatifs sur la réponse.

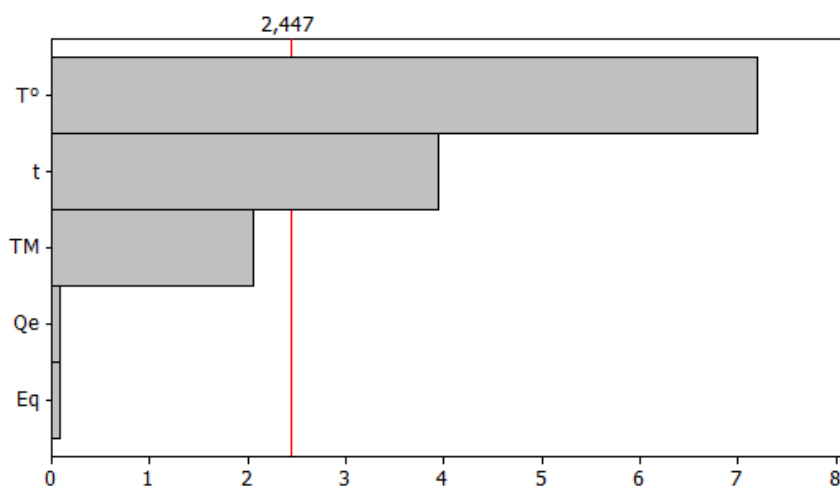


Figure 1 : Diagramme de Pareto des effets normalisés.

#### b. Diagramme des effets principaux

Le diagramme des effets principaux nous renseigne sur l'influence simultanée de tous les facteurs sur la conversion. Nous pouvons d'après ce diagramme (Figure 2) conclure que la température, le temps et la quantité du tamis moléculaire, sont les facteurs les plus influents sur le taux d'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du D-xylose. Pour les deux facteurs ( $T^\circ$ ,  $t$ ) le sens de la variation est le même par la réponse, c'est-à-dire, lorsque la température et le temps augmentent la conversion augmente. Le facteur tamis moléculaire (TM), agit de manière opposée sur la réponse. Pour les deux facteurs, équivalent de l'acide laurique (Eq) et quantité d'enzyme (Qe), on n'observe pas d'influence importante sur la conversion.

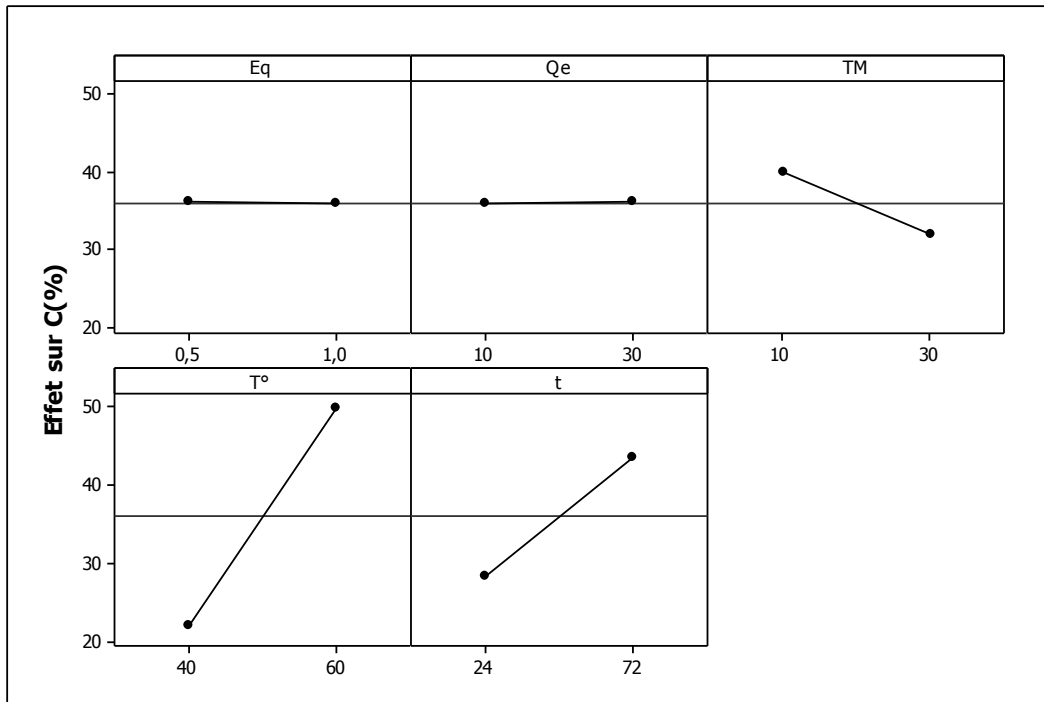


Figure 2: Diagramme des effets principaux sur la conversion

### 3.2.2. Détermination des effets significatifs et des coefficients du modèle

Les valeurs des effets et des coefficients de régression du modèle sont donnés dans les tableaux 3 et 4.

Tableau 3. Effets et coefficients estimés pour la conversion (unités codées)

Terme	Effet	Coefficient	P( $\alpha < 0,05$ )
Constante	-	36,000	0,000
Eq	-0,333	-0,167	0,934
Qe	0,333	0,167	0,934
TM	-8,00	-4,0	0,085
T°	28,000	14,000	0,000
t	15,333	7,667	0,008

$$R^2 = 92,28\%.$$

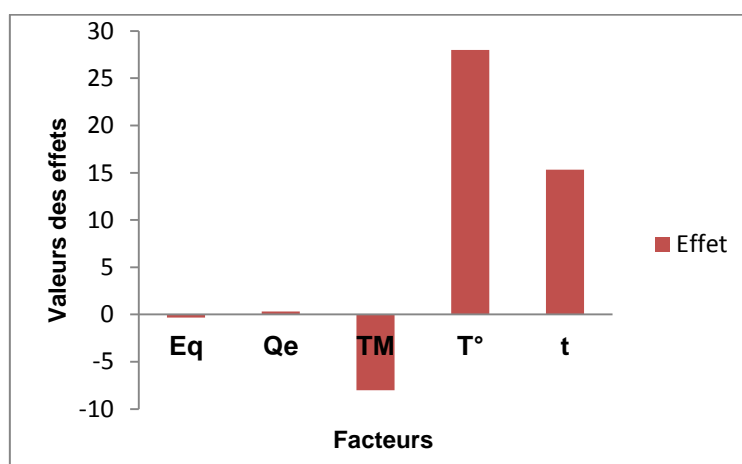
**Tableau 4:** Effets et coefficients estimés pour la conversion (unités non codées)

Terme	Coefficient
Constante	-41,1667
Eq	-0,66667
Qe	0,016667
TM	-0,400000
T°	1,40000
t	0,319444

La signification des facteurs est déterminée suivant la valeur obtenue de P (Probabilité).

D'après le tableau 3, l'effet de la température sur la conversion est très fortement significatif, ( $P=0,000$ ). Il est suivi de l'effet du temps de la réaction qui lui aussi est très significatif ( $P=0,008$ ). Pour la quantité du tamis moléculaire la valeur de P est de 0,085. L'équivalent de l'acide laurique et la quantité d'enzyme sont non significatifs, et n'ont pas d'influence sur la réponse au niveau de confiance choisi ( $\alpha = 0,05$ ).

Le signe positif de chacun des facteurs (T°, t, Qe) indique que la valeur maximale de ces facteurs entraîne une réponse plus élevée qu'avec la valeur minimale. Les facteurs (Eq, TM) possèdent des signes négatifs ce qui indique que la valeur minimale de ce facteur se traduit par une réponse plus élevée. On peut visualiser (figure 3) les différents niveaux qui augmentent ou diminuent la réponse.

**Figure 3:** Effets des facteurs sur la conversion

D'autres parts les coefficients du modèle permettent d'évaluer l'influence des facteurs sur la réponse. On constate que les coefficients avec des valeurs élevées sont les facteurs les plus importants.

### 3.2.3. Equation du modèle mathématique

Pour construire l'équation du modèle représentant la relation entre la conversion et les cinq facteurs étudiés, on utilise les coefficients de régression représentés dans les tableaux 3 et 4. Ce modèle a été simplifié, et le classement des facteurs se fait selon le diagramme de Pareto (Figure 1).

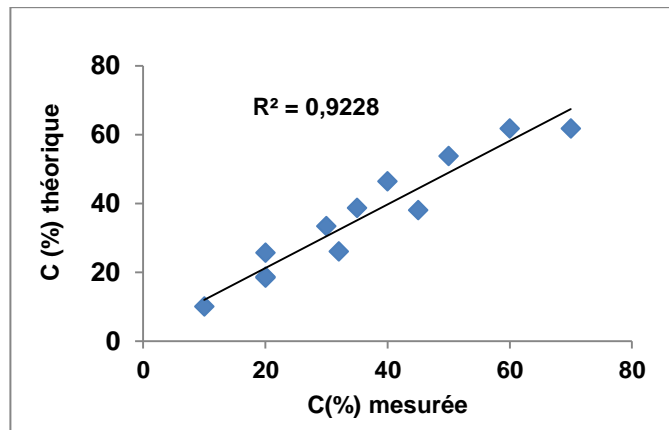
Unité codée :

$$C(\%) = 36 + 14 \cdot T^\circ + 7,667 \cdot t - 4 \cdot TM + 0,167 \cdot Qe - 0,167 \cdot Eq \quad (1)$$

Unité non codée :

$$C(\%) = -41,166 + 1,400 \cdot T^\circ + 0,319 \cdot t - 0,400 \cdot TM + 0,016 \cdot Qe - 0,666 Eq \quad (2)$$

Par ailleurs, l'examen du diagramme des réponses estimées en fonction des réponses mesurées (figure 4) montre un bon coefficient de détermination,  $R^2 = 92,3\%$ . Cela veut dire qu'il y a une bonne corrélation entre les réponses théoriques et mesurées. Cette corrélation est confirmée par la valeur de R carré ajusté ( $R^2_{aju} = 91,5\%$ ).



**Figure 4:** Représentation graphique des réponses théorique fonction en des réponses mesurées.

### 3.2.4. Analyse de la variance (ANOVA)

L'analyse de la variance (tableau 5), montre une valeur de P des effets principaux de 0,003 ( $<0,05$ ). Cette valeur indique que le modèle est significatif. C'est-à-dire au moins un facteur a un effet significatif sur la réponse.

Tableau 5. Analyse de la variance pour la réponse C(%)

Source	DL	SC	CM	F	P
Effets principaux	5	3250,0	650,00	14,34	0,003
Erreur résiduelle	6	272,0	45,33		
Total	11	3522,0			

En conclusion, nous avons trouvé un bon modèle ( $R^2 = 92,3 \%$ ). Ceci nous permet d'avoir une idée préliminaire sur l'influence des différents facteurs sur l'avancement de la réaction mise en jeu.

Le plan de Plackett-Burman, nous a permis d'établir une relation linéaire entre les facteurs étudiés et la réponse sans faire intervenir les interactions entre ces facteurs. Ce plan ne peut donc pas décrire correctement le phénomène malgré le bon R carré obtenu, puisque il existe d'autres termes importants, tels que les termes aux carrés et les interactions. Pour cela il faut passer à des plans contenant un nombre de niveaux supérieur à deux par facteur. Un tel plan peut être celui de Box-Behnken.

#### 4. Plan de Box-Behnken

La méthodologie des surfaces de réponses (RSM) permet d'établir un modèle de régression polynomiale d'ordre 2. Dans ce travail nous avons choisi le plan de Box-Behnken. Ce choix est notamment motivé par le faible coût demandé: 15 expériences doivent être calculées. Ce nombre est faible par rapport à un plan factoriel complet, à 3 niveaux par facteur, qui nécessite 27 expériences.

Concernant le choix des facteurs, nous nous sommes basés sur les résultats du plan de criblage mais également sur des critères expérimentaux [3].

Les trois facteurs retenus pour le plan de Box-Behnken (tableau 6) sont le temps (t), la température ( $T^\circ$ ) et la quantité du tamis moléculaire (TM). Concernant ce dernier facteur, bien qu'il soit donné statistiquement comme peu influent, il a quand même été conservé dans l'étude. Sachant que l'estérification enzymatique est réversible, l'eau formée durant la réaction perturbe l'équilibre thermodynamique et l'ester de sucre formé peut s'hydrolyser. Pour cela l'introduction d'une certaine quantité de tamis moléculaire dans le milieu réactionnel est nécessaire pour absorber l'eau formée durant la réaction. Nous avons par conséquent conservé la quantité du tamis moléculaire dans l'étude qui suit.



Nous avons fixé les deux autres facteurs, l'équivalent de l'acide laurique à 0,5 éq (niveau bas) et la quantité d'enzyme à 30 mg (niveau haut).

Le plan de Box-Behnken nous permet d'examiner les trois facteurs ( $T^\circ$ ,  $t$  et  $TM$ ) avec plus de détails afin de déterminer les conditions optimales pour une conversion maximale. Les résultats de ce plan subiront un traitement statistique nécessaire.

**Tableau 6.** Facteurs et domaine d'étude du plan de Box-Behnken.

Facteur	Niveau		
	bas	moyen	Haut
$T^\circ$	40	50	60
$t$	24	48	72
$TM$	10	20	30

Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs, composé de quinze essais dont trois au centre du domaine (essais 13, 14 et 15) et des réponses expérimentales (C%) est représenté ci-après (tableau 7).

**Tableau 7:** Plan de Box-Behnken avec les réponses expérimentales.

Ordre d'essai	$T^\circ$	$t$	$TM$	$C(\%)_{\text{mesurée}}$
1	60	48	10	10
2	40	48	30	22
3	50	72	30	48
4	50	48	20	25
5	40	72	20	41
6	50	72	10	29
7	50	48	20	35
8	60	48	30	80
9	40	24	20	25
10	50	48	20	35
11	50	24	30	55
12	60	72	20	61
13	40	48	10	12
14	60	24	20	30
15	50	24	10	12

Les données de ce tableau subiront un traitement statistique pour estimer les coefficients du modèle mathématique.

### 4.1. Résultats statistiques et interprétation

Le calcul des coefficients de régression avec les données codées est fourni par le logiciel Minitab version 14 (Tableau 8).

**Tableau 8:** Coefficients de régression estimés pour la conversion C(%)

Terme	Coefficient	T	P
Constant	31,667	6,144	0,002
T°	10,125	3,208	0,024
t	7,125	2,258	0,074
TM	17,750	5,624	0,002
T°•T°	1,292	0,278	0,792
t•t	6,292	1,354	0,234
TM•TM	-1,958	-0,422	0,691
T•t	3,750	0,840	0,439
T°•TM	15,000	3,361	0,020
T•TM	-6,000	-1,344	0,237

$$R\text{-Sq} = 92,65\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 79,41\%$$

Le logiciel, Minitab 14, nous fournit également l'analyse de la variance (Tableau 9).

**Tableau 9:** Analyse de la variance pour la conversion C(%)

Source	DL	SC	CM	F	P
Régression	9	5018,92	557,66	7,00	0,023
Linéaire	3	3746,75	1248,92	15,67	0,006
Carré	3	171,92	57,31	0,72	0,582
Interaction	3	1100,25	366,75	4,60	0,067
Erreur résiduelle	5	398,42	79,68	-	-
Inadéq.de l'ajus	3	331,75	110,58	3,32	0,240
Erreur pure	2	66,67	33,33	-	-
Totale	14	5417,33	-	-	-

**Interprétations**

Nous avons utilisé comme indicateur statistique les valeurs de P pour évaluer quels sont les termes du modèle qui sont importants. D’après l’ANOVA (tableau 9), la valeur P=0,023 indique que le modèle est significatif. D’autre part, l’ensemble des effets linéaires avec la valeur de P = 0,006 (<0,05) indique qu’il existe un effet linéaire significatif pour les facteurs principaux (T°, t et TM). La conversion varie donc selon les termes linéaires. Pour les effets quadratiques, on obtient des valeurs de P>0,05:

- T°•T°=0,792
- t•t=0,234
- TM•TM=0,691

Pour ces termes, les valeurs de P sont supérieures à 0,05 il s’ensuit qu’il n’y a pas d’effet significatif pour le carré de la température, du temps et de la quantité de tamis moléculaire. C’est-à-dire qu’on ne prévoit pas de courbure dans les surfaces de réponses.

D’après l’analyse de la variance, les valeurs de P obtenues pour les interactions du type T°•t et t•TM sont respectivement de 0,439 et 0,237 (> 0,05). Il n’y a donc pas d’effet significatif, sauf pour l’interaction T°•TM ou P= 0,020 (< 0,05). La conversion varie donc selon cette interaction, chacun des deux facteurs T°etTM dépend donc du niveau l’un de l’autre.

Par ailleurs la valeur du coefficient de détermination R<sup>2</sup>=92,65% est bonne et R<sup>2</sup>ajusté=79,41%, ce qui indique que le modèle est relativement bien ajusté. Donc il existe une bonne corrélation entre les valeurs mesurées et les valeurs calculées.

**4.2.Détermination du modèle mathématique**

L’équation de régression polynomiale pour le modèle primaire (avant d’exclure les termes non significatifs), s’écrit comme suit:

Unité codée :

$$C(\%) = 31,667 + 10,125T^\circ + 7,125t + 17,750TM + 1,292T^{\circ 2} + 6,292t^2 - 1,958TM^2 + 3,750T^\circ \cdot t + 15T^\circ \cdot TM - 6t \cdot TM \tag{1}$$

Unité non codée :

$$C(\%) = 144,416 - 4,029T^\circ - 1,033t - 3,741TM + 0,012T^{\circ 2} + 0,010t^2 - 0,019TM^2 + 0,015T^\circ \cdot t + 0,150T^\circ \cdot TM - 0,025t \cdot TM \tag{2}$$

Par conséquent, le but est de trouver l’équation polynômiale optimale. D’après l’analyse statistique précédente, en éliminant les termes quadratiques et les deux interactions T°•t,

TM•t, on obtient un nouveau modèle avec un ajustement de bonne qualité. Ces résultats sont résumés dans les tableaux 10 et 11.

**Tableau 10:** Coefficients de régression estimés pour la C(%) après exclusion des termes non significatifs (unité codée).

Terme	Coefficient	T	p
Constant	34,667	15,295	0,000
T°	10,125	3,262	0,009
t	7,125	2,296	0,045
TM	17,750	5,719	0,000
T°•TM	15,000	3,418	0,007

$$R\text{-carré} = 85,78\% \quad R\text{-carré (adj)} = 80,09\%$$

Nous remarquons d’après le tableau 10, que tous les paramètres estimés pour ce modèle sont significatifs. L’équation de régression polynômiale optimale pour le nouveau modèle s’écrit comme suit :

$$\text{Unité codée : } C(\%) = 34,667 + 10,125T^\circ + 7,125t + 17,750TM + 15T^\circ \cdot TM \quad (3)$$

$$\text{Unité non codée : } C(\%) = 84,291 - 1,987T^\circ + 0,296t - 5,725TM + 0,150T^\circ \cdot TM \quad (4)$$

L’analyse de la variance (ANOVA) après exclusion des termes non significatifs (tableau 11), montre que tous les termes sont hautement significatifs. On conclut donc que le modèle amélioré est meilleur du point de vue statistique.

**Tableau 11:** Analyse de la variance pour la C(%) après exclusion des termes non significatifs.

Source	DL	SC	CM	F	p
Régression	4	4646,75	1161,69	15,08	0,000
Linéaire	3	3746,75	1248,92	16,21	0,000
Interaction	1	900,00	900,00	11,68	0,007
Erreur résiduelle	10	770,58	77,06	-	-
Inadéq. de l’ajus	8	703,92	87,99	2,64	0,304
Erreur pure	2	66,67	33,33	-	-
Totale	14	5417,33	-	-	-

D'autre part, la probabilité d'inadéquation systématique de l'ajustement augmente de 0,240 à 0,304, ce qui signifie un meilleur ajustement du modèle. L'analyse de la variance indique que la variance due au manque d'ajustement est non significative.

### 4.3. Validation du modèle

La validation du modèle est une des étapes fondamentales des plans d'expériences. Elle consiste à comparer le résultat théorique d'une expérience calculée par le modèle, avec le résultat réel d'un essai.

- Si la réponse réelle est très proche de la réponse prédite, Le modèle est valide.
- Si la réponse réelle est éloignée de la réponse prédite, Le modèle est non valide.

#### 4.3.1. Validation primaire du modèle

La validation primaire du modèle consiste à s'assurer que les réponses calculées et mesurées sont corrélées (tableau 12).

**Tableau 12:** comparaison entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées

Ordre d'essai	C(%) <sub>mesuré</sub>	C(%) <sub>théorique</sub>
1	10	8,37
2	22	23,62
3	48	54,87
4	25	31,66
5	41	32,50
6	29	31,37
7	35	31,66
8	80	73,87
9	25	25,75
10	35	31,66
11	55	52,62
12	61	60,25
13	12	18,12
14	30	38,50
15	12	5,12

Ce tableau permet de juger de manière plus précise de la qualité de l'ajustement réalisé. La comparaison entre les colonnes  $Y_{exp}$  (réponses mesurées) et  $Y_{cal}$  (réponses prédites par le modèle) confirme que l'ajustement est de bonne qualité.

### 4.3.2. Représentation graphique des réponses théoriques en fonction des réponses mesurées

Cette corrélation peut aussi être illustrée en traçant les réponses mesurées, en fonction des réponses estimées. Ceci est donné par la figure 5, qui montre une forte corrélation entre celles-ci.

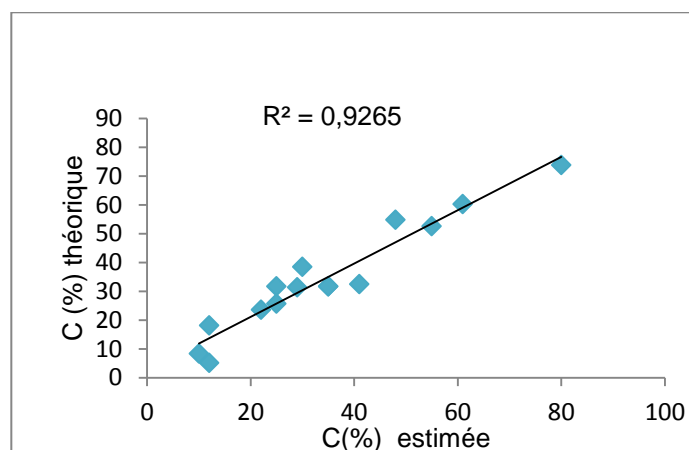


Figure 5: Réponses théoriques en fonction des réponses estimées.

D'après la figure 5, les points sont répartis autour de la droite de régression. Le modèle peut donc être jugé de qualité suffisante, puisqu'il y a 92,65% de chance qu'il explique effectivement les variations mesurées de la réponse. Le modèle rend bien compte du phénomène étudié.

### 4.4. Optimisation de la conversion

L'étape finale consiste à trouver les valeurs des facteurs qui donnent la réponse optimale [4]. A partir du modèle mathématique validé et à l'aide du logiciel, on réalise graphiquement les contours 2D. Ces graphiques permettent de rechercher des solutions optimales plus désirables avec une meilleure précision possible. Cela nous permet d'examiner les résultats plus nettement. Les courbes de contour sont générées à l'aide de logiciel MINITAB 14 par la combinaison des trois facteurs induits. Nous avons choisi à chaque fois un des facteurs fixé aux 3 niveaux, haut, moyen et bas. Les deux autres facteurs étudiés sont représentés sur les axes X et Y. La valeur de la réponse est représentée par une région ombragée dans la

Courbe de contour 2D. Les figures 6, 7, et 8 représentent les graphiques 2D qui illustrent l'évolution de la réponse en fonction des niveaux des deux facteurs.

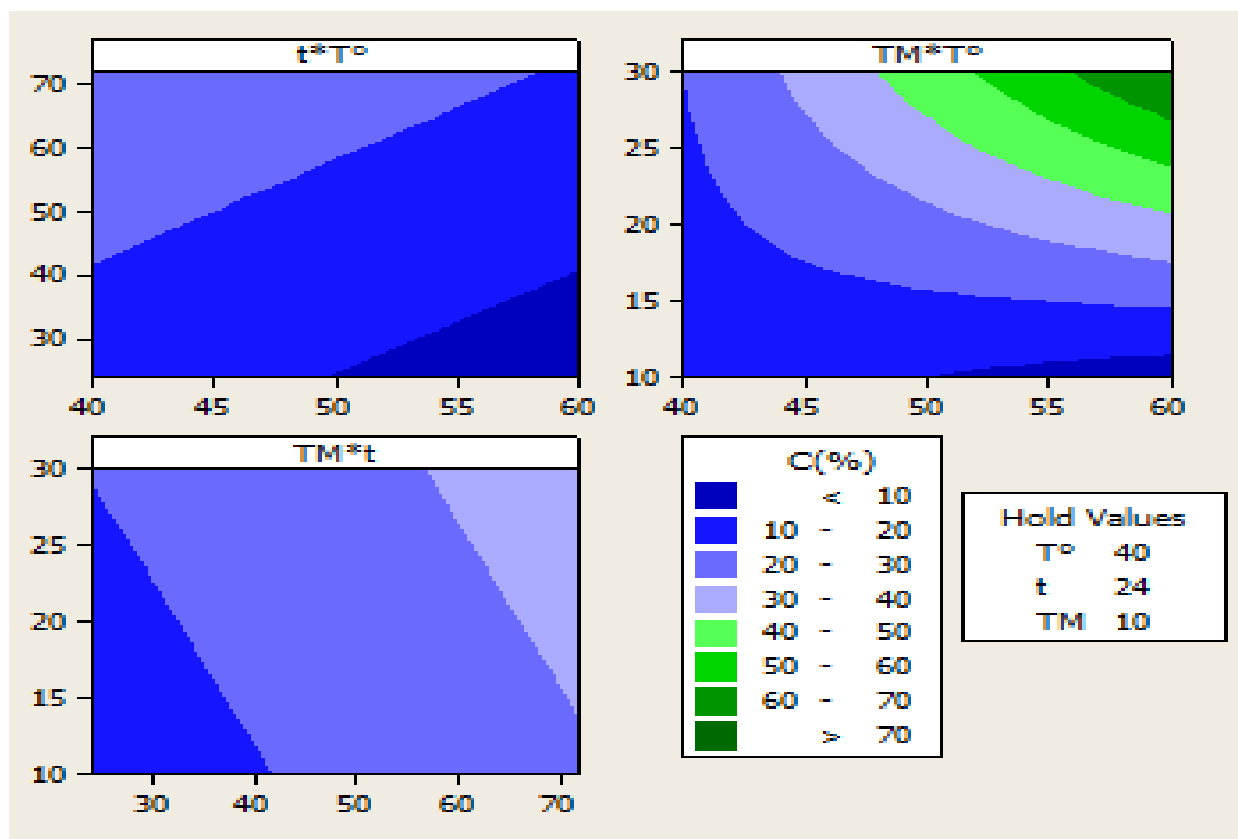


Figure 6: Diagrammes de contour au niveau bas des facteurs.

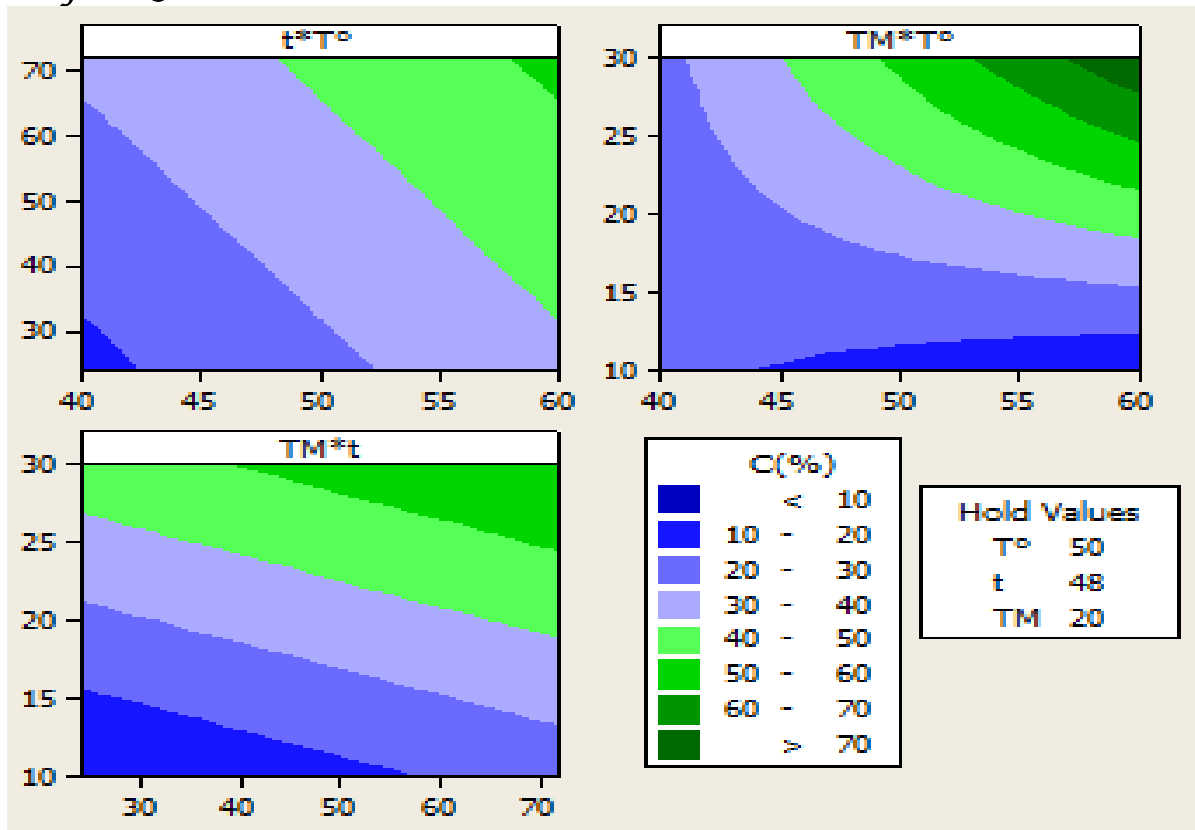


Figure 7: Diagrammes de contour au niveau moyen des facteurs.

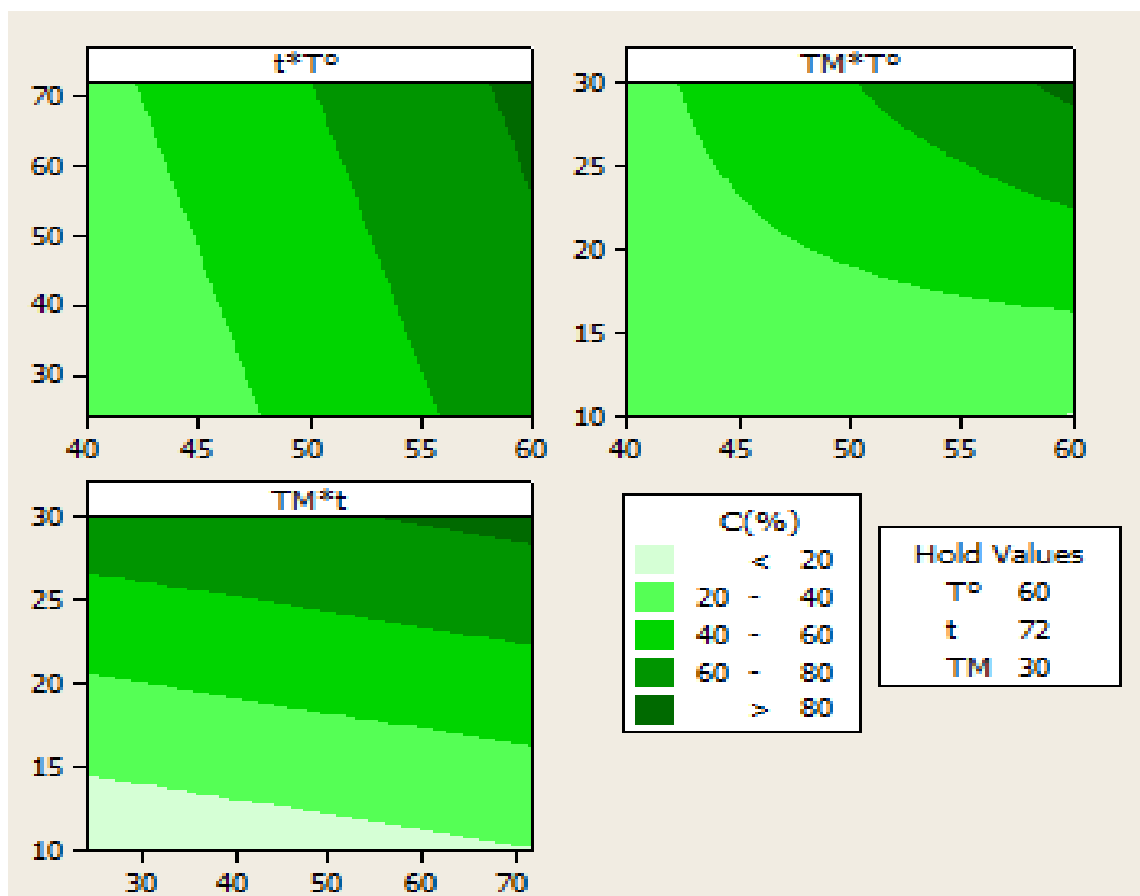


Figure 8: Diagrammes de contour au niveau haut des facteurs.



D'après l'interprétation des diagrammes de contour, les plus fortes valeurs de la conversion ( $C > 80\%$ ) sont obtenues lorsque les trois facteurs sont fixés au niveau haut. L'examen de l'ensemble des graphes a permis la sélection des coordonnées du point optimal, soit :  $T^{\circ}=60^{\circ}\text{C}$ ,  $t=72\text{h}$ ,  $TM=30\text{mg}$  et la valeur de la conversion en ce point est égale à  $C=85,041\%$ . Cela a été déterminé à l'aide de la fonction désirabilité du logiciel Minitab version 14.

#### 4.5. Vérification

On effectue une vérification des coordonnées du point optimal :

- Ce point ( $T^{\circ}=60^{\circ}\text{C}$ ,  $t=72\text{h}$ ,  $TM=30\text{mg}$ ) est situé dans le domaine expérimental donc il constitue bien la solution recherchée au problème.
- On vérifie ce point critique par un simple calcul de la réponse moyenne prédite par le modèle. Ce point est donné par l'équation (3)
 
$$C(\%)=34,667+10,125\cdot(+1)+7,125\cdot(+1)+17,750\cdot(+1)+15\cdot(+1)\cdot(+1)$$

$$C(\%)=84,667\%.$$
- Une telle valeur pour la conversion n'a jamais été obtenue lors des 15 expériences réalisées. Ce résultat est a priori très intéressant.

#### 4.6. Conclusion

Dans ce travail, nous avons d'abord utilisé comme étape préliminaire le plan de criblage de Plackett-Burman, réalisé afin de sélectionner les facteurs les plus influents sur la réponse. Parmi les différents facteurs étudiés, la température, le temps et la quantité du tamis moléculaire apparaissent comme les paramètres les plus influents sur l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du D-xylose. Ces facteurs sont ensuite examinés par la méthodologie des surfaces de réponses en utilisant le plan de Box-Behnken.

Pour étudier l'effet des variables indépendantes: la température, le temps et le tamis moléculaire sur la conversion du sucre, nous avons modélisé la réponse sous forme d'un polynôme en fonction de ces paramètres.

D'après l'étude statistique on peut conclure que:

- ✓ le modèle obtenu est significatif  $P = 0,023 (< 0,05)$ .
- ✓ Il existe une corrélation satisfaisante entre les valeurs mesurées et les valeurs ajustées,  $R^2=92,65\%$  et  $R^2_{\text{ajus}}=79,41\%$ .
- ✓ La région du point optimal pour une valeur élevée de la conversion est obtenue lorsque les trois facteurs sont fixés au niveau haut.

- ✓ la valeur optimale de la conversion est  $C = 85,041\%$ . Celle-ci correspond aux valeurs suivantes des facteurs : température à  $60^{\circ}\text{C}$ , temps à 72 heures, et tamis moléculaire à 30 mg.

## *Conclusion générale*

## *Conclusion générale*

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'influence des paramètres réactionnels tels que : le temps, la température, le tamis moléculaire, la quantité d'enzyme et l'équivalent de l'acide laurique sur l'avancement de la réaction d'acylation enzymatique du D-xylose en présence de la CCL immobilisée sur célite, par la méthode des plans d'expériences.

Les deux premiers chapitres de ce mémoire ont été consacrés à une étude bibliographique sur la synthèse enzymatique des esters de sucres et à la présentation de la méthodologie des plans d'expérience.

Nous avons ainsi développé une étude en deux volets : une approche qualitative correspondant à l'analyse de screening permettant d'extraire les facteurs les plus influents à laquelle succède une analyse quantitative (RSM) fondée sur la construction et l'analyse des surfaces de réponses.

Nous avons dans un premier temps mis en œuvre un plan de criblage dit de Plakett-Burman, afin de dégager les facteurs les plus influents sur la réponse. L'application de ce plan a ressorti trois facteurs importants : la température, le temps et le tamis moléculaire. Dans un deuxième temps, ces trois facteurs sont été étudiés par la méthodologie des surfaces de réponses (RSM). Nous avons appliqué un plan de Box-Behnken, basé sur un modèle du second degré. La conversion a été ainsi modélisée en fonction de ces trois facteurs. D'après les analyses statistiques, le modèle obtenu est significatif,  $P = 0,023 (< 0,05)$  et il y'a une corrélation satisfaisante entre les valeurs mesurées et les valeurs ajustées,  $R^2 = 92,65\%$  et  $R^2_{\text{ajus}} = 79,41\%$ .

La recherche des conditions optimales, effectuée par l'analyse des diagrammes des surfaces de réponses et de contours, a permis de localiser la valeur optimale de la conversion,  $C=85,041\%$ . Celle-ci correspond aux valeurs suivantes des facteurs : température à  $60^\circ\text{C}$ , temps à 72heures, et quantité de tamis moléculaire à 30 mg.

La modélisation et l'optimisation par cette méthodologie ont été effectuées à l'aide du logiciel MINITAB 14.

En perspectives, nous envisageons de compléter ce travail en faisant varier d'autres facteurs. Ces facteurs pourraient également être introduits dans la recherche des conditions optimales de la réaction d'acylation enzymatique d'autres substrats osidiques. Ceci afin de trouver toujours la bonne voie de synthèse de ce type de tensioactif.

## *Protocoles expérimentaux*

***Appareillage et conditions générales***

**La chromatographie sur couche mince (CCM)** a été réalisée sur plaque de gel de silice (Merck 60F-254), les plaques ont été révélées au moyen d'une solution d'acide sulfurique, puis chauffage à 150°C. Le «  $R_f$  », qui représente le rapport de la distance parcourue par le produit (h) à la distance parcourue par le solvant (H), est spécifique à chaque substance.

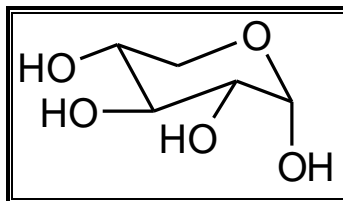
**Les spectres RMN<sup>1</sup> H** ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker de type AM200 ou AC250, les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en partie par million (ppm). Les abréviations suivantes ont été utilisées: s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, et les constantes de couplage sont exprimés en Hertz (Hz).

**Les spectres de masse (SM)** ont été enregistrés au moyen d'un appareil GCMS (QP2010s, Shimadzu) après silylation des produits.

**Les spectres infrarouges (IR)** ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin-Elmer FT-1600. Les échantillons liquides sont déposés en film entre deux pastilles de NaCl, et en présence de KBr dans le cas des échantillons solides. Le nombre d'onde est exprimé en  $\text{cm}^{-1}$ .

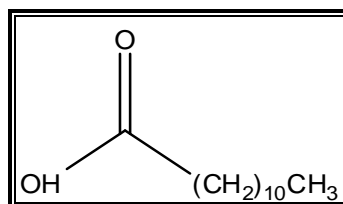
## 1. Produits chimiques

**1.1. Le sucre:** le sucre utilisé est le  $\alpha$ -(+)-D-xylose de source sigma.



$M = 150\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  [ $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ ]; poudre blanche.

**1.2. L'agent acylant:** Acide laurique de source Fluka



$M = 200\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  [ $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$ ]. Poudre blanche.

Nous avons utilisé dans l'acylation enzymatique du D-xylose d'autres produits que nous réunissons dans le tableau suivant:

**Tableau 1:** Produits chimiques utilisés dans l'acylation enzymatique du D-xylose.

Produit	Provenance
EtOH	Fluka
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sigma
$\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	Fluka
$\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	Sigma
Phénolphtaléine	Sigma
Tamis moléculaire 4A°	Sigma
Célite 545	Fluka

## **2. Enzymes utilisée**

L'enzyme utilisée est la lipase du *Candida cylindracea*, de source Fluka.

## **3. Immobilisation de la lipase du *Candida cylindracea* (CCL)**

### **3.1. Préparation de la solution tampon (pH= 8, 0.1M)**

Dans 1000ml d'eau distillée on dissout 9.42g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  et 249.702g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

### **3.2. Protocol opératoire de l'immobilisation**

Dans un ballon, on dissout 60 mg de CCL dans 10 ml de la solution tampon préalablement préparée. On agite pendant 30 minutes à 4°C, puis on ajoute goutte à goutte 20 ml d'acétone froide (-15°C). Après 2 heures de temps, la réaction est arrêtée, l'enzyme est filtrée sous vide et lavée trois fois avec l'acétone. La lipase est ensuite séchée dans un dessiccateur sous vide en présence de silica gel, puis conservée à -18°C.

Rendement d'immobilisation =58%.

$$\text{Rendement} = \frac{\text{masse de l'enzyme récupérée après immobilisation}}{\text{masse de l'enzyme utilisée pour l'immobilisation}} * 100$$

## **4. Synthèse du 1-O-dodécanoyle-D-xylopyranose**

### **4.1. Mode opératoire: Procédure générale de l'estérification**

Dans un ballon on dissout 0,1mmol (15 mg) d' $\alpha$ -(+)-D-xylose et (0,5-1) équivalents d'acide gras (AL) dans 5ml de solvant. Après 30 minutes d'agitation on ajoute l'enzyme. Une quantité adéquate de tamis moléculaire est ensuite additionnée dans le milieu réactionnel. Des échantillons sont prélevés afin d'évaluer l'avancement de la réaction. A la fin de la réaction, le mélange est filtré sur papier filtre et le solvant est évaporé. Les conversions sont mesurées par titrage colorimétrique.

### **4.2. Mesure de la conversion (C%)**

La conversion est évaluée par titrage colorimétrique par la mesure de la quantité d'acide gras non réagit dans le milieu réactionnel selon le mode opératoire suivant:



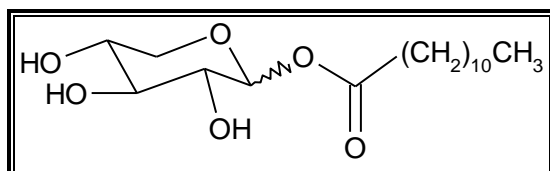
0.1g de mélange réactionnel est dilué dans 20 ml d'une solution de phénophtaléine dans l'éthanol à 0.1%. Une solution de NaOH 0.1M est ensuite ajoutée goutte à goutte jusqu'à obtention d'une coloration rose.

La conversion est donnée par l'expression suivante:

$$C\% = \frac{V_{NaOH} \text{ (avant l'ajout de l'enzyme)} - V_{NaOH} \text{ (après l'arrêt de la réaction)}}{V_{NaOH} \text{ (avant l'ajout de l'enzyme)}}$$

### 4.3. Caractérisation du 1-O-dodécanoyl-D-xylopyranose

R<sub>F</sub> = 0,30. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH : 90/10)



#### RMN<sup>1</sup> H (DMSO-d<sub>6</sub>)

**Anomère β:** 0.84 (t, 3H, **H**<sub>12'</sub>), 1.25 (m, 12H, **H**<sub>4'-11'</sub>), 1.50 (m, 2H, **H**<sub>3'</sub>), 2.2 (s, 2H, **H**<sub>2'</sub>), 3.25 (t, 1H, **H**<sub>2</sub>), 3.75 (dd, 1H, J<sub>5eq-5a</sub> = 5,14Hz, J<sub>5eq-4</sub> = 5,48Hz, **H**<sub>5a</sub>), 4.25 (t, 1H, **H**<sub>3</sub>), 4.75 (ddd, 1H, J<sub>4-3</sub> = 6Hz, J<sub>4-b5</sub> = 8Hz, J<sub>4-a5</sub> = 11Hz, **H**<sub>4</sub>), 5,25 (dd, 1H, J<sub>4b5</sub> = 6,9 Hz, J = 5,35 Hz, **H**<sub>5eq</sub>), 6.01 (d, 1H, J<sub>1-2</sub> = 7,6 Hz, **H**<sub>1β</sub>).

**Anomère α :** 0.83 (t, 3H, **H**<sub>12'</sub>), 1.24 (m, 12H, **H**<sub>4'-11'</sub>), 1.4 (m, 2H, **H**<sub>3'</sub>), 2.1 (1s, 2H, **H**<sub>2'</sub>), 3.20 (t, 1H, **H**<sub>2</sub>), 3.73 (dd, 1H, J<sub>5eq-5a</sub> = 3,434 Hz, J<sub>5eq-4</sub> = 4,25 Hz, **H**<sub>5a</sub>), 4.0 (t, 1H, **H**<sub>3</sub>), 4.50 (ddd, 1H, J<sub>4-3</sub> = 6Hz, J<sub>4-b5</sub> = 8Hz, J<sub>4-a5</sub> = 11Hz, **H**<sub>4</sub>), 5,15 (dd, 1H, J<sub>4b5</sub> = 12,95 Hz, J<sub>5eq-5a</sub> = 5,25 Hz, **H**<sub>5eq</sub>), 5.3 (d, 1H, J<sub>1-2</sub> = 4,6 Hz, **H**<sub>1α</sub>).

#### RMN<sup>13</sup> C (DMSO-d<sub>6</sub>)

**170** (2C<sub>Oα,β</sub>), **100** (C<sub>1β</sub>), **95** (C<sub>1α</sub>), **82,5** (C<sub>4β</sub>), **81**(C<sub>4α</sub>), **75**(C<sub>3β</sub>), **74**(C<sub>3α</sub>), **73** (2C<sub>2α,β</sub>), **64** (C<sub>5β</sub>), **63** (C<sub>5α</sub>), **33,38** (C<sub>2'α,β</sub>, CH<sub>2</sub>), **31,21** (C<sub>3'α,β</sub>, CH<sub>2</sub>), **28,92** (C<sub>4'α,β</sub>, CH<sub>2</sub>), **28,83**(C<sub>5'α,β</sub>, C<sub>6'α,β</sub>, CH<sub>2</sub>), **28,63** (C<sub>7'α,β</sub>, CH<sub>2</sub>), **28,35** (C<sub>8'α,β</sub>, C<sub>9'α,β</sub>, CH<sub>2</sub>), **24,38** (C<sub>10'α,β</sub>, CH<sub>2</sub>), **22,01** (C<sub>11'α,β</sub>, CH<sub>2</sub>), **13,87**(C<sub>12'α,β</sub>, CH<sub>3</sub>).

**IR**

- O-H  $3340\text{cm}^{-1}$
- C=O (ester)  $1735\text{cm}^{-1}$
- C-O  $1149\text{ cm}^{-1}$
- CH<sub>2</sub>  $1468\text{ cm}^{-1}$

**GC/MS**

m/z = 458[M-HOTS], 368 [M-2HOTS].

## *Références bibliographiques*

## Introduction générale

- [1] Piccicuto S.; Blecker C.; Brohée J. C.; Mbampara A.; Lognay G.; Deranne C.; Paquot M.; Marlier M., *Biotechnol Agronom. Soc. Environ*, **2001**, 5(4), 209.
- [2] Ferrer M.; Oliver J.; Plou F. J.; Lopez-Cortes N.; Reyes-Duarte D.; Christensen M., *Enzyme and Microbial Technology*, **2005**, 36, 391-398.
- [3] Abdulmalek E.; Salami Mohd Saupi H.; Tejo B.A.; Basri M.; Salleh A.B.; Zaliha R.N.; Abdul Rahman M.B., *J. Mol. Catalysis B : Enzymatic*. **2012**, 76, 37-43.
- [4] Habulin M.; Sabeder S.; Knez Z. *Journal of Supercritical Fluids*, **2008**, 45, 338-345.
- [5] Garti N.; Aserin A.; Fanun M., *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*. **2000**, 164, 27-38.

## Chapitre 1

- [1] Sin. Y. M.; Cho. K. W.; Lee. T. H., *Biotechnol*, **1998**, 20, 91–94.
- [2] Sarney. D. B.; Vulfson. E. N., *Trends Biotechnol*, **1995**, 13, 164–172.
- [3] Fregapane G.; Sarney D. B.; Greenberg S. G.; Knight D. J.; Vulfson E. N., *J. Am. Oil Chem. Soc*, **1994**, 71, 87–91
- [4] Damez C. Thèse de doctorat. " Transformation d'agro-ressources régionales et étude de leurs propriétés amphiphiles ". Université de Reims. Champagne-Ardenne, **2006**.
- [5] Cao L.; Bornscheuer T.; Schmid D., *Biocatal. Biotransform*, **1998**, 16, 249–257.
- [6] (a) Klibanov A.M., *Nature*, **2001**, 409, 241-246. (b) Leblanc. D.; Morin. A.; Gu. D.; Zhang X. M.; Bisailon J. G.; Paquet M.; Dubeau. H., *Biotechnol*, **1998**, 20, 1127–1131.
- [7] Ferrer M.; Angeles C. M.; Bernabé M.; Ballesteros A., *Biotechnol. Bioeng*, **1999**, 65 (1), 10–16.
- [8] Favel, A.; Boyère C.; Laurent P.; Broze G.; Blecker C.; Paquot M.; Jérôme C.; Debuigue A., *Carbohydrate Research*, **2011**, 346, 1161-1164.
- [9] Coulon D.; Ghoul M., *Agro. Food Ind. Hi Tech*, **1998**, 9, 22–26.
- [10] Liaquat M.; Apenten R. K., *J. Food. Sci*, **2000**, 65, 295–299.
- [11] Wehtje E.; Adlercreutz P., *Biotechnol. Bioeng*, **1997**, 55, 798–806.
- [12] Chamouleau F.; Coulon D.; Girardin M.; Ghoul M., *Molecular catalysis B: Enzymatic*, **2001**, 11, 949-954.
- [13] Abdulmalek E.; Salami Mohd Saupi H.; Tejo B.A.; Basri M.; Salleh A.B.; Zaliha R.N.; Abdul Rahman M.B. *J. Mol. Catalysis B : Enzymatic*. **2012**, 76, 37-43.

- [14] Dixon M.; Webb E. C., *Enzymes*. Academic Press, New-York, (1979).
- [15] Uswatun H. Z.; Abdulmalek E.; Siti S. O.; Basri M.; Salleh A. B.; Zaliha R.N.; Abdul Rahman M.B. *Food Chemistry*, **2012**, 131,199-205.
- [16] Neto V. Thèse de doctorat. Nouvelle méthode d'élaboration des tensioactifs glycosylés par métathèse croisée et cycloaddition 1,3-dipolaire. Université de Limoges. **2007**.
- [17] Tran-Minh C., Les biocapteurs. Principes, construction et applications. Paris, Masson, **1991**
- [18] Schmid R. D.; Verger R. *Angew. Chem. Int. Ed*, **1998**, 37, 1608-1633.
- [19] Houde A.; Kademi A.; Leblanc D., *Appl. Biochem. Biotechnol*, **2004**, 118, 155-170.
- [20] Ghanem A., *Tetrahedron*, **2007**, 63, 1721-1754.
- [21] Pandey A.; Benjamin S.; Soccol C. R.; Nigam P.; Krieger N.; Soccol U.T., *Biotechnol. Appl. Biochem*, **1999**, 29, 119-131.
- [22] Gupta R.; Gupta N.; Rathi P., *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **2004**, 64, 763-781.
- [23] Ivanov A. E.; Shneider M. P., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **1997**, 3,303-309.
- [24] Gupta M. N., *Biotechnol Appl Biochem*, **1991**, 14, 1-11.
- [25] Khare S. K.; Nakajima M., *Food Chemistry*, **2000**, 68, 153-157.
- [26] Kaewthong W.; Sirisaneeyakul S.; Prasertsan P.; Kittikun H., *process Biochemistry*. **2005**, 40, 1525-1530
- [27] Gargouri Y.; Ghamgui H.; Miled N.; Karra-chaâbouni M., *Biochemical Engineering Journal*, **2007**, 37, 34-41.

## Chapitre 2

- [1] Dejaegher B.; Vander Heyden Y., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2011**, 56, 141– 158.
- [2] Massart D. L.; Vandeginste B. G. M.; Buydens L. M. C.; De Jong S.; Lewi P. J.; Smeyers-Verbeke J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Part A, Elsevier, Amsterdam, **1997**.
- [3] Vander Heyden Y.; Perrin C.; Massart D.L., *Handbook of Analytical Separations*, K. Edition Valkó, **2000**, 163–212.
- [4] Dejaegher B.; Vander Heyden Y., *Comprehensive Chemometrics*, **2009**, (Chapitre 17), 547–575
- [5] Dejaegher B.; Vander Heyden Y., *Acta Chromatogr*, **2009**, 21, 161–201.

- [6] Dejaegher B.; Durand A.; Vander Heyden Y., *Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis*, **2010**, (Chapitre 2), 11–74.
- [7] Montgomery D.C., *Design and Analysis of Experiments*, 4th edition, John Wiley, New York, **1997**.
- [8] Tinsson W., *Plans d'expériences. Constructions et analyses statistiques*, **2010**.
- [9] Fisher R. A., *Statistical methods for research workers*, Edinburgh, Edition Oliver and Boyd. **1925**, 239.
- [10] Fisher R. A., *J. Ministry. Agric*, **1926**, 33, 503-513.
- [11] Yates F., complex experiments (with discussion), *J. R. Statist.* **1935**, 181-247.
- [12] Cochran W.G., *J. Dairy. Sci*, **1941**, 24, 937-951.
- [13] Plackett R. L.; Burman J. P., *Biomertika*, **1946**, 33 (4), 305-325.
- [14] Box G. E. P., *Biomertika*, **1952**, 39 (1), 49-57.
- [15] Box G. E. P.; Wilson K. B., *Journal of Statistical Royal Society*, **1951**, 13 (1), 1-45.
- [16] Scheffé H., *J. R. Statist*, **1958**, 20 (2), 344-360.
- [17] Kiefer J., optimum experiment designs (with discussion), *J.R. Statist.Soc*, **1959**, 21 (2), 272-319.
- [18] Pierre C., Les plans d'expériences partie 1: Principes généraux, *Revue: Contrôles-Essais- Mesures*, **2005**, 69-72.
- [19] Pierre Dagnelie, Le plan d'expérience évolue, *Revue MODULAD*, N° 38, **2008**.
- [20] Rousselle J.J. Thèse de doctorat. Les contours actifs, une méthode de segmentation application à l'imagerie médicale. Université François Robelais, **2003**.
- [21] Dreesbeke J. J.; Fine J.; Saporta G., *Plans d'expériences: applications à l'entreprise*. Editions *TECHNIP*, **1997**.
- [22] Goupy J., *Plans d'expériences, Techniques de l'Ingénieur, Analyse et Caractérisation*. **1998**, 1-28.
- [23] Rousselle J.J. Thèse de doctorat. Les contours actifs, une méthode de segmentation application à l'imagerie médicale. Université François Robelais, **2003**.
- [24] *Engineering statistics handbook, Process Improvement*, (Chapitre 5), **2006**.  
<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/pri.htm>
- [25] Goupy J., Les plan d'expérience, *revue MODULAD*, **2006**, 34, 74-116.
- [26] Goupy J., *Pratiquer les plans d'expériences*. Editions DUNOD, **2005**.
- [27] Angellier, H. Thèse doctorat. Nanocristaux d'amidon de maïs cireux pour applications aux composites. Université Grenoble 1, **2005**.

- [28] Goupy J., Etude comparative de divers plans d'expériences, *Revue statistiques appliquées*. **1990**, tome 38, N°4, 5-44.  
[http://www.numdam.org/item?id=RSA\\_38\\_4\\_5\\_0](http://www.numdam.org/item?id=RSA_38_4_5_0)
- [29] Sad. G, Sado. M.C. Les plans d'expériences, de l'expérimentation à l'assurance qualité. Collection AFNOR, **1991**.
- [30] Goupy J., Modélisation par les plans d'expériences, *Techniques de l'ingénieur, mesures et contrôles*. R 275, 1-23.
- [31] Lewis G. A.; Mathieu D.; Phan-Tan-Luu R., *Pharmaceutical Experimental Design*, Edition Marcel Dekker, New York, **1999**.
- [32] Kamoun A.; Chaabouni M. M.; Ayedi H.F., Plans d'expériences et traitements de surface (MSR), *Techniques de l'ingénieur*, Doc. M 1429, 1-24.

### **Chapitre 3**

- [1] Leitgeb M.; Knez Z. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. **1990**, 67, 775-778.
- [2] Yan Y.; Bornscheuer U.T.; Stadler G. L.W. *Lipid Sci. Technol*, **2001**.
- [3] Goupy J. *Pratiquer les plans d'expériences, éditions DUNOD*, **2005**.
- [4] Goupy J. *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 554, 184-190.