

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ DE BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCÉDES

Spécialité : GENIE CHIMIQUE

Intitulé du mémoire

**Extraction des huiles essentielles des algues
rouges par hydrodistillation assistée par micro-
onde application à la formulation d'une crème
BIO anti taches de rousseur**

Présenté par :

- Toumi Selma
- Menacer Karima

Encadré par :

Dr.DJEDRI-.BANI Safia

Année universitaire 2019/2020

Remerciements

Nous remercions tout d'abord **ALLAH** le tout puissant et miséricordieux de nous avoir données la force, le courage, la volonté et l'amour du savoir durant notre formation ainsi que la patience d'accomplir ce modeste travail et surtout l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Nous adressons, notre profonde gratitude et tout notre amour à nos parents, nos sœurs et frères, qui ont su nous faire confiance et nous soutenir en toutes circonstances.

Nous tenons particulièrement à remercier Notre promotrice, Dr. DJEDRI.BANI safia, pour avoir accepté la charge d'être directrice de ce mémoire, nous la remercions pour sa disponibilité, ses pertinents conseils, sa gentillesse et sa patience et pour les efforts qu'elle a consentis durant la réalisation de ce mémoire. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

Nous devons remercier aussi les membres de jury d'avoir examiné notre travail et faire partie du jury de soutenance.

Nous voudrions remercier également l'ingénieur de laboratoire de chimie organique Madame ZAHIRA, pour son aide, sa disponibilité et sa sympathie, sans oublier de remercier Mme KORD, Mme LAMOUTI et Mrs MEKNACHI l'équipe de Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et l'Aquaculture CNRDPA ainsi que l'équipe de laboratoire d'hygiène «Blida » surtout Mrs TEFFAHI Djamel qui a consacré une part significative de son temps pour nous aider.

En bref nous remercions toutes personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail et tous nos proches amis qui nous ont toujours soutenus et encouragés ; un grand merci à tous.

Dédicace

Je dédie ce modeste mémoire :

À MES CHERS PARENTS

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse **ALLAH**, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À MES CHERS FRERES ET SŒURS

NEUAMENE, ISMAIL, FETHALLAH, SOUHIL et ma frangine **AMEL** ainsi que mes belles sœurs **AMINA, SAMIRA** et **EVIN**. En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que **ALLAH**, le tout puissant, vous protège et vous garde.

À MES PETITS NEVEUX ET NIÈCES ADORÉS

NARIMENE, AYMEN, IYED, IMENE, DINA, OUAFI, ZAHIA, HANANE.

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, Votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur. Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.

À mon fiancé **ZAKI** qui m'a soutenue moralement et encouragé tout au long de ce projet je te remercie infiniment ainsi que **MA BELLE FAMILLE** je tiens à vous remercier pour vos encouragements et vos douaa. Que dieu vous procure santé et joie pour le restant de la vie.

À tous mes enseignants, car j'ai eu le privilège de profiter de leurs vastes connaissances.

À ma chère binôme **SELMA** et mes chères amies : **RANIA, SELMA, SAMIRA, FERIEL, SIHEM, KHAOULA, HADIL** et ma cousine **CHERIFA** que dieu vous bénisse.

À toute la promotion de Génie-chimique 2019/2020.

KARIMA.

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers,

A ma chère mère DJAZIA

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Vous avez fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur
Merci maman pour ton soutien, ton amour et ta bénédiction que j'espère
M'accompagnera toujours.

A mon cher père DJILALI

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Tu m'as toujours motivé à poursuivre mes études, que Dieu te préserve et te procure santé et longue vie.

Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes chers sœurs ASMAA et AYA

Pour leur soutien infini et leur aide et à qui je souhaite un meilleur avenir.

A mes meilleures copines **SELMA, AMINA, MAROUA** et leurs familles.

A tous ceux que j'aime et que je respecte

Et enfin, à toute personne qui aura l'occasion de lire ce mémoire.

SELMA.

ملخص:

الطحالب الحمراء هي نباتات بحرية غنية بالأحماض الدهنية و المعادن مثل الزنك و الحديد و العديد من الفيتامينات مثل فيتامين س الذي يغذي و يرطب و يحسن من نوعية الجلد. يهدف هذا العمل الى صياغة كريم تجميلي يحتوي على الزيت الاساسي لهذه الطحالب الحمراء كعنصر نشط ,يساعد هذا الاخير مع الاضافات الطبيعية الاخرى في التقليل او القضاء على نمش الجلد , يهدف تحسين المعاملات التركيبية الى ايجاد كريم ثابت. اثبتت التحليلات الفيزيائية و الكيميائية جودة هذا الكريم المركب . اتاحت دراسة مقارنة باستخدام كريم تجاري مرجعي فينوس التأكد من ان الكريم المركب يمكن مقارنته بالكريمات التجارية التقليدية .بالإضافة الى اجراء دراسة تأثير هذا الكريم على البشرة.

الكلمات المفتاحية: طحالب حمراء, فرن كهربائي ,زيت اساسي, النمش, مستخلص مائي .

Résumé :

Les algues rouges sont des plantes marines riches en acides gras et minéraux tels que le zinc et le fer et de nombreuses vitamines telles que la vitamine C qui nourrissent, hydratent et améliorent la qualité de la peau.

Ce travail vise à formuler une crème cosmétique contenant l'huile essentielle de cette algue rouge comme le principe actif. Ce dernier associé à d'autres additifs naturels permet de réduire ou éliminer les taches de rousseur sur la peau. L'optimisation des paramètres de formulation vise à trouver une crème stable. Des analyses de stabilité, physico-chimiques et microbiologiques ont permis de démontrer la qualité de cette crème formulée.

Une étude comparative avec une crème de référence commerciale « VENUS » a permis de confirmer que la crème formulée est comparable aux crèmes conventionnelles commerciales, en plus de mener une étude de l'effet de cette crème sur la peau.

Mots clés : algue rouge, micro onde, huile essentielle, taches de rousseurs, hydrolat.

Abstract:

Red algae are marine plants rich in fatty acids and minerals such as zinc and iron and many vitamins such as vitamin C that nourish, hydrate and improve the quality of the skin.

This work aims to formulate a cosmetic cream containing the essential oil of this red algae as the active principle. The latter combined with other natural additives helps reduce or eliminate freckles on the skin. Optimization of formulation parameters aims to find a stable cream. Stability, physico-chemical and microbiological analyzes have demonstrated the quality of this formulated cream

A comparative study with a reference commercial cream "VENUS" made it possible to confirm that the formulated cream is comparable to conventional commercial creams, in addition to conducting a study of the effect of this cream on the skin.

Key words: Red Algae, Microwave, Essential Oil, Freckles, Hydrosol

TABLE DE MATIERES

CHAPITRE I : Généralités sur les Algues et sur l'extraction des huiles essentielles

| | |
|--|----|
| I.1.Définition et caractéristiques générales des algues..... | 03 |
| I.1.1.Définition..... | 03 |
| I.1.2.Caractéristiques générales des algues..... | 03 |
| I.1.3.Classification des algues..... | 03 |
| a).Les algues vertes (Chlorophycées)..... | 03 |
| b).Les algues brunes (Phéophycées)..... | 04 |
| c).Les algues rouges (Rhodophycées)..... | 04 |
| d).Les Cyanobactéries..... | 06 |
| I.1.4.Facteurs de répartition des algues | 07 |
| I.1.5.Domaines d'application..... | 07 |
| a).Les algues en cosmétologie..... | 07 |
| b).Dans le domaine pharmaceutique et médical..... | 08 |
| c).Utilisation alimentaire..... | 08 |
| d).Utilisation agricole..... | 08 |
| e).Dans le traitement des eaux usées..... | 08 |
| I.1.6.Les substances naturelles des algues..... | 09 |
| I.2.Propriétés des huiles essentielles..... | 11 |
| I.2.1.Propriétés et activités biologiques..... | 11 |
| a).Antibactérienne..... | 11 |
| b).Antivirale..... | 12 |
| c).Antifongique..... | 12 |
| d).Antiparasitaire..... | 12 |
| e).Antiseptique..... | 12 |
| I.2.2.Propriétés physique des huiles essentielles..... | 12 |
| I.2.3.Toxicité des huiles essentielles..... | 13 |
| I.2.4.Caractérisation des huiles essentielles..... | 13 |
| a).Caractérisation organoleptique..... | 13 |
| b).Caractérisation physique..... | 13 |
| c).Caractérisation chimique..... | 14 |
| d).Caractérisation chromatographique..... | 14 |

| | |
|--|----|
| I.3.Procédés d'extraction des huiles essentielles..... | 14 |
| I.3.1.Méthodes conventionnelles d'extraction..... | 14 |
| I.3.2.Méthodes innovantes d'extraction..... | 16 |

CHAPITRE II: La peau et le Cosmétique

| | |
|---|----|
| II.1.La peau..... | 17 |
| II.1.1.physiologie de la peau..... | 17 |
| a).L'épiderme..... | 17 |
| b).Le derme..... | 17 |
| c).L'hypoderme..... | 17 |
| II.1.2.Les fonctions la peau..... | 18 |
| II.1.3.Les taches de rousseur..... | 18 |
| II.1.4.Crème anti tache de rousseur..... | 19 |
| II.2.La cosmétologie..... | 20 |
| II.2.1.Définition d'un produit cosmétique..... | 20 |
| a).Cosmétiques biologiques..... | 20 |
| b).Cosmétiques naturels..... | 20 |
| II.2.2.La comparaison entre la composition de produit cosmétique bio et classique.... | 20 |
| II.2.3.Composition générale des produits cosmétiques..... | 21 |
| II.2.4.Différentes formes de produits cosmétique..... | 21 |
| II.3.Les émulsions..... | 22 |
| II.3.1 Définition..... | 22 |
| II.3.2.Différents types d'émulsions..... | 23 |
| II.3.3.Caractères des émulsions..... | 24 |
| II.3.4.Instabilité des émulsions..... | 25 |
| II.3.5.Les émulsionnants..... | 27 |

CHAPITRE 3 : Matériels et Méthodes

| | |
|--|----|
| III.1.Matériels..... | 29 |
| III.1.1 Matière végétale..... | 29 |
| a).Site d'échantillonnage..... | 29 |
| b).Identification des espèces..... | 29 |
| c).Préparation de la matière végétale..... | 30 |
| III.1.2.Matières premières..... | 30 |

| | |
|--|----|
| III.2.Méthodes..... | 33 |
| III.2.1.Extraction de l'huile essentielle des algues rouges..... | 33 |
| III.2.2.Formulation de la crème anti taches de rousseur..... | 34 |
| III.2.3.Caractérisation de la crème..... | 36 |
| a).Analyse physico-chimique..... | 36 |
| b). Analyse microbiologique..... | 37 |
| 1).Dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux (GAMT)..... | 38 |
| 2).Dénombrement des coliformes totaux et coliformes fécaux..... | 49 |
| 3).Recherche et dénombrement des levures et moisissures..... | 40 |
| III.2.4.Caractérisation de l'hydrolat..... | 41 |
| 1).Recherche et dénombrement des Coliformes en milieux liquides..... | 41 |
| a).Test de présomption..... | 41 |
| b).Test de confirmation ou test de Mac Kenzie..... | 42 |
| 2).Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux en milieux liquides..... | 43 |
| a).Test de présomption..... | 44 |
| b).Test de confirmation..... | 44 |
| III.3 Etude comparative de la crème BIO formulée et celle commercialisée (SOIN DEPEGMENTANT VENUS)..... | 45 |
| III.4 Effet de la crème sur la peau | 45 |

CHAPITRE IV : Résultats et Discussions

| | |
|---|-----------|
| IV.1.Résultats des huiles essentielles des algues rouges..... | 46 |
| IV.1.1.Extraction d'huile essentielle des algues rouges..... | 46 |
| IV.2.Formulation et Caractérisation de la crème BIO anti taches..... | 46 |
| IV.2.1.formulation de la crème..... | 46 |
| a).Analyse physico-chimique..... | 47 |
| b). Analyse microbiologique..... | 50 |
| IV.3.Etude comparative de la crème BIO formulée et celle commercialisée (Soin Dépigmentant VENUS)..... | 54 |
| IV.4 Effet de la crème sur la peau | 55 |
| CONCLUSION..... | 57 |

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

LISTE DES FIGURES

| N° de Figure | Titre | Page |
|---------------|--|-----------|
| I.1 | Algue rouge avec Ramifications irrégulières | 04 |
| I.2 | Morphologie d'un thalle de Sphaerococcus Coronopifolius | 06 |
| I.3 | Distribution des algues selon l'intensité lumineuse | 07 |
| I.4 | L'hydrodistillation simple | 15 |
| I.5 | Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau | 15 |
| II.1 | Coupe latérale de la peau | 17 |
| II.2 | Les éphélides du visage | 18 |
| II.3 | Schéma d'une émulsion simple (en bleu l'eau, en jaune l'huile) | 23 |
| II.4 | Schémas d'une émulsion multiple | 24 |
| II.5 | Mécanisme de l'inversion de phase | 27 |
| III.1 | Site d'échantillonnage | 29 |
| III.2 | Algue marine récoltée sur site de la plage des ruines romain | 30 |
| III.3 | Aspect des algues rouges avant et après séchage | 30 |
| III.4 | Montage d'hydrodistillation assisté par micro-onde | 34 |
| III.5 | Procédé de formulation de la crème | 35 |
| III.6 | Image d'une centrifugeuse | 36 |
| III.7 | Image représentative des coliformes | 39 |
| III.8 | image représentative des coliformes fécaux (Escherichia coli) | 39 |
| III.9 | Image représentative des levures et moisissures. | 40 |
| III.10 | Protocole de colimétrie (test de présomption) | 42 |
| III.11 | Protocole de colimétrie (test de confirmation) | 43 |
| IV.1 | Observation microscopique | 49 |
| IV.2 | Observation microscopique de la moisissure trouvée | 52 |
| IV.3 | Observation microscopique : (a) crème de référence, (b) crème élaborée | 55 |
| IV.4 | Effet de la crème | 56 |

LISTE DES TABLEAUX

| N° | Titre | Page |
|--------------|--|-----------|
| II.1 | Comparaison entre la composition de produit cosmétique bio et classique | 21 |
| II.2 | Les différents types d'émulsion simple | 23 |
| III.1 | Tableau récapitulatif des matières utilisées dans la formulation de la crème | 32 |
| IV.1 | Proportions et résultats de formulation de la crème 55/45 | 47 |
| IV.2 | Proportions et résultats de formulation de la crème 60/40 | 48 |
| IV.3 | Les formulations représentent les crèmes stables | 48 |
| IV.4 | Les résultats de pH pour les crèmes stables | 49 |
| IV.5 | Analyse microbiologique de la crème formulée | 51 |
| IV.6 | Dénombrement des coliformes | 52 |
| IV.7 | Dénombrement des Streptocoques fécaux | 53 |
| IV.8 | Composition d'une crème conventionnelle Bio, et celle formulée | 54 |
| IV.9 | Comparaison des paramètres étudiés pour les deux crèmes | 54 |

LISTE DES ABREVIATIONS, SYMBOLES ET CONVENTIONS

| | |
|--------------------------|---|
| AFNOR | Association française de normalisation. |
| AGPI | Acide gras polyinsaturé. |
| BCPL | Bouillon Lactosé au Pourpre de Bromcrésol. |
| BGN | Bacille Gram Négatif. |
| BIO | Biologique. |
| BK | Beurre de karité. |
| CA | Cire d'abeille. |
| CCM | Chromatographie sur couche mince. |
| CPG | Chromatographie en phase gazeuse. |
| D/C | Double concentration. |
| E/H | Emulsion eau dans l'huile. |
| EPSP | Etablissement public de la sante de proximité. |
| GMAT | Germe Mésophile Aérobie Totale. |
| H/E | Emulsion huile dans l'eau. |
| HAD | Huile d'amande douce. |
| HE | Huile essentielle. |
| IA | Indice d'acide. |
| IE | Indice d'ester. |
| INCI | International Nomenclature of Cosmetic Ingredients. |
| IS | Indice de saponification. |
| ISO | Organisation internationale de normalisation. |
| LDL | Low density lipoprotein. |
| η | Viscosité [Pa.s]. |
| NA | Norme algérienne. |

| | |
|-------------|---|
| NF | Norme française. |
| NPP | Nombre le Plus Probable. |
| OGA | Oxytétracycline-Glucose-Agar. |
| PH | Potentiel hydrogène. |
| PIT | Température d'inversion de phase. |
| S/C | Simple concentration. |
| SM | Spectrométrie de masse. |
| TA | Tension actif. |
| TGEA | Tryptone Glucose Yeast Extract Agar. |
| TSE | Tryptone Sel Eau. |
| UE | Union européenne. |
| UFC | Unité Formant une Colonie. |
| UV | Ultraviolet. |
| VRBL | Lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre. |
| ΦA | Phase aqueuse. |
| ΦH | Phase huileuse. |

INTRODUCTION

Aujourd'hui une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne avec des remèdes traditionnels à base de plantes, sont toujours une source essentielle de médicaments.

Les algues sont parmi ces végétaux qui sont les plus anciens et furent les premiers êtres vivants à créer de l'oxygène, elles sont le point de départ de l'histoire des plantes et par conséquent des règnes animal et humain, elles produisent des substances antibiotiques, antimycosiques et antivirales qui les protègent des pollutions bactériologiques et nettoient le milieu.[1]

Elles sont couramment utilisés à travers le monde dans les domaines diététique, thérapeutique et cosmétologique, la valeur nutritive des algues et leurs bienfaits pour la santé suscitent depuis peu un certain intérêt, sont très utilisées dans la médecine chinoise, pourraient avoir une activité anticancéreuse, anti-inflammatoire, et antioxydant.

En Algérie, l'intérêt porté à la valorisation des algues marines est très récent, comparé à celui dans plusieurs pays. Ceci est probablement lié au manque de données d'éco-biologie et de biochimie sur les algues des côtes algériennes potentiellement exploitables, notamment les algues rouges du genre *Sphaerococcus*.

La demande de cosmétique et de dermocosmétique ne cesse de croître dans nos sociétés où le paraître et le bien-être ont une place prépondérante. Le cosmétique est développé de façon exponentielle depuis quelques années grâce, notamment, à la recherche scientifique et à la demande des consommateurs. Désormais, tout le monde peut et doit avoir accès aux produits cosmétiques, à la dermatologie ou à la chirurgie esthétique.

De nos jours, les émulsions constituent 60% des formes utilisées comme des produits de dermopharmacie et cosmétique. L'intérêt des émulsions provient de l'importance de l'aire interfaciale créée, permettant de contrôler les transferts de matière entre phases, mais aussi d'apporter des propriétés de texture recherchées.

Le but de cette pratique est de préparer une crème cosmétique bio qui est une forme d'émulsion aqueuse simple ayant une certaine consistance qui lui confère une bonne acceptabilité et une conformabilité d'utilisation, rendues ainsi cette forme très utilisable en cosmétique, cette crème est à base d'huile essentielle de l'hydrolat des algues rouges et des additifs qui ont un effet antitaches de rousseur et hydratant à la peau.

Le manuscrit est composé d'une partie bibliographique exposée en deux chapitres : le premier chapitre est un rappel sur les algues et sur l'extraction des huiles essentielles. Dans le deuxième, c'est des généralités sur la peau et le cosmétique.

La partie expérimentale comporte le procédé de l'extraction de l'huile essentielle à partir des algues rouges puis une optimisation des paramètres de formulation de la crème bio ainsi que les différents tests effectués sur la crème et sur l'hydrolat afin de prouver les activités de la crème formulée. A la fin nous avons comparé les crèmes formulées avec une crème de référence (le choix s'est porté sur une crème commerciale très utilisé VENUS), aussi nous avons étudié l'effet de la crème sur la peau.

CHAPITRE I

Généralités sur les Algues

et sur l'extraction des huiles essentielles

I.1 Définition et caractéristiques générales des algues :

I.1.1 Définition :

Les algues sont des organismes aquatiques primitifs qui vivent naturellement dans les plans d'eau, elles sont capables de produire leurs propres matières organiques par photosynthèse [2]. La plupart des algues se développent en milieu aquatique d'eau douce, saline ou saumâtre, sur des roches humides, ou sur un sol mouillé mais certaines sont terrestres et sont capables de se développer sur le sol ou sur le tronc des arbres [3]. On dénombre 25 000 espèces d'algues à travers le monde, avec des tailles très variables de 3 microns jusqu'à 25 m de long, classées en algues bleues (Cyanophycées), algues brunes (Phéophycées), algues rouges (Rhodophycées) et algues vertes (Chlorophycées) [4].

I.1.2 Caractéristiques générales des algues : la caractérisation des algues est basée sur 3 critères spécifiques sont :

- **Le critère morphologique ;** Leur morphologie est assez diversifiée, elles peuvent être unicellulaires, mobiles, ou bien formées par association de cellules, des filaments ou des lames de formes variées [5]
- **Le critère physiologique ;** certaines sont hétérotrophes mais la plus part sont autotrophes vis-à-vis du carbone grâce à l'utilisation des pigments photosynthétiques (chlorophylle et caroténoïde) [6] [7].
- **Le critère de reproduction ;** qui se fait par des sporophytes ou des gamétophytes, se déroule ainsi selon une alternance de phases de reproduction asexuée assurée par les thalles (sporophytes), et de phases de reproduction sexuée assurée par des thalles producteurs de gamètes (gamétophytes) [8].

I.1.3 Classification des algues :

En général, le terme algue fusionne quatre grands groupes qui sont différenciées par rapport à la couleur, Chaque groupe contient des classes, qui elle-même contient des centaines d'espèces [9].

a) Les algues vertes (Chlorophycées) :

Elles sont de formes très variées, uni-ou pluricellulaires. Leurs plastes sont colorés en vert par les chlorophylles a et b, auxquelles sont associés des carotènes et des xanthophylles. La photosynthèse permet la formation d'amidon, comme pour les plantes supérieures, la plupart des algues vertes vivent en eau douce ou en milieux

marins, mais certaines espèces peuvent également se développer sur terre. Elles jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux, favorisant ainsi la vie animale [9].

b) Les algues brunes (Phéophycées) :

La couleur brune de ces algues résulte de la dominance du pigment xanthophylle, la fucoxanthine, qui masque les autres pigments (chlorophylle a et c, ainsi que le bêta-carotène). Toutes possèdent une structure pluricellulaire, mais leurs dimensions varient depuis les éléments microscopiques jusqu'aux très grands spécimens. La grande majorité des algues brunes sont marines [9].

c) Les algues rouges (Rhodophycées)

Les rhodophycées ou algues rouges doivent leur couleur à la présence de plastides roses dans lesquels un pigment rouge, la phycoérythrine, est associé à plusieurs autres pigments dont les chlorophylles. La plupart de ces algues rouges sont pluricellulaires et marines, mais il existe quelques formes unicellulaires et quelques-unes vivent également en eau douce. Les algues rouges sont divisées en deux groupes: celui des Bangiophycées (qualifiées de primitives) et celui des Floridéophycées (plus complexes). Elles se distinguent généralement par leur cycle de reproduction particulièrement complexe [9].



Figure I.1: algue rouge avec Ramifications irrégulières

➤ Présentation de Sphaerococcus Coronopifolius :

Sphaerococcus Coronopifolius est une algue rouge appartenant à l'ordre des Gigartinales et la famille des Sphaerococcaceae, C'est une algue autotrophe et pérenne par sa base (qui peut vivre plusieurs années). En automne et en hiver, il ne persiste que la partie basale et ses premières ramifications. Elle conserve une couleur rouge sombre. Au printemps, de nouvelles ramifications rouge vif apparaissent aux extrémités Malgré ces propriétés, coronopifolius n'a pas encore été exploité commercialement ni cultivé à grande échelle, probablement parce que les informations sur la façon dont cette espèce se développe dans ses divers habitats sont encore rares. Au cours du cycle de développement 3 générations se succèdent (cycle trigénétique), On la rencontre fréquemment en épave.

[10]

❖ Taxonomie :

Règne : végétal

Embranchement : Rhodobionta / Rhodophyta

Sous-embranchement : Eurhodophytina

Classe : Florideophyceae

Sous-classe : Rhodymeniophycidae

Ordre : Gigartinales

Famille : Sphaerococcaceae

Genre : Sphaerococcus

Espèce : coronopifolius

❖ Description :

L'algue est de consistance cartilagineuse, allant d'un rouge sombre à la base vers un carmin vif aux extrémités. Le thalle est fixé au substrat par un large disque basal à partir duquel s'élèvent un ou plusieurs axes cylindriques. La ramification est irrégulière, les rameaux s'aplatissent vers les parties supérieures. Les ramifications augmentent et s'affinent aux extrémités, laissant apparaître une organisation partiellement alterne. Ces extrémités se différencient en ramules épineux. Le thalle subsisterait en automne, réduit à ses axes et rameaux principaux. La taille des axes peut atteindre 5 mm de largeur, le thalle pouvant dépasser les 25 cm de hauteur. [10]

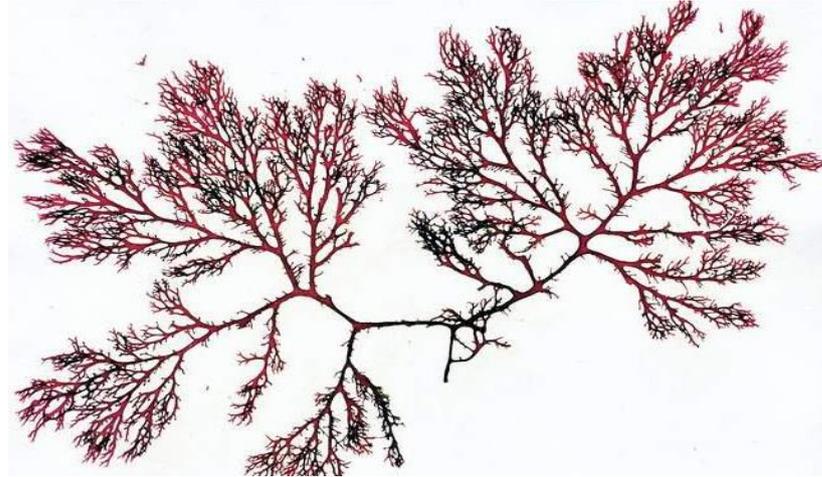


Figure I.2: Morphologie d'un thalle de *Sphaerococcus coronopifolius*

❖ **Écologie :**

Vit dans l'étage infralittoral, dans des milieux ombragés des premiers mètres jusqu'à 70m de profondeur. Espèce sciaphile, vivant indifféremment en mode calme ou battu. Elle est aussi visible dans les biotopes photophiles et l'herbier, été comme hiver. De plus, on peut la récolter comme épave sur la grève. [10]

❖ **Distribution géographique :**

Cette espèce est observée le long des côtes atlantiques Est (des côtes des îles Britanniques aux Canaries), Manche (de la Scandinavie aux côtes françaises), la méditerranée et la mer Noire. [10]

d) Les Cyanobactéries :

Les cyanobactéries ou les algues bleues sont constituées des colonies de taille, de forme et de couleur très variables. Comme les algues rouges, elles possèdent des pigments surnuméraires bleus (Phycocyanines) et rouges (Phycoérythrine) qui masquent la chlorophylle a. En dépit de leur nom ancien d'algues bleues, elles sont rarement bleues mais plus souvent rouges, vertes avec des reflets bleutés, violets, bruns, jaunes ou orangés. La plupart d'entre elles ont une consistance gélatineuse voire gluante en raison des mucilages qu'elles sécrètent [10].

I.1.4 Facteurs de répartition des algues :

Les algues sont liées à l'eau et peuvent dès lors s'installer dans tous les types d'habitat suffisamment humides et éclairés. On peut les retrouver en eau douce, en mer, sur sol humide et même sur la neige. Les algues étant photosynthétiques, elles sont dépendantes de la présence de la lumière. Aussi, les algues nécessitent d'être fixées à un substrat, par conséquent, la texture, le degré de cohésion et la nature chimique du substrat ont une importance sur la répartition spatiale des espèces [11].

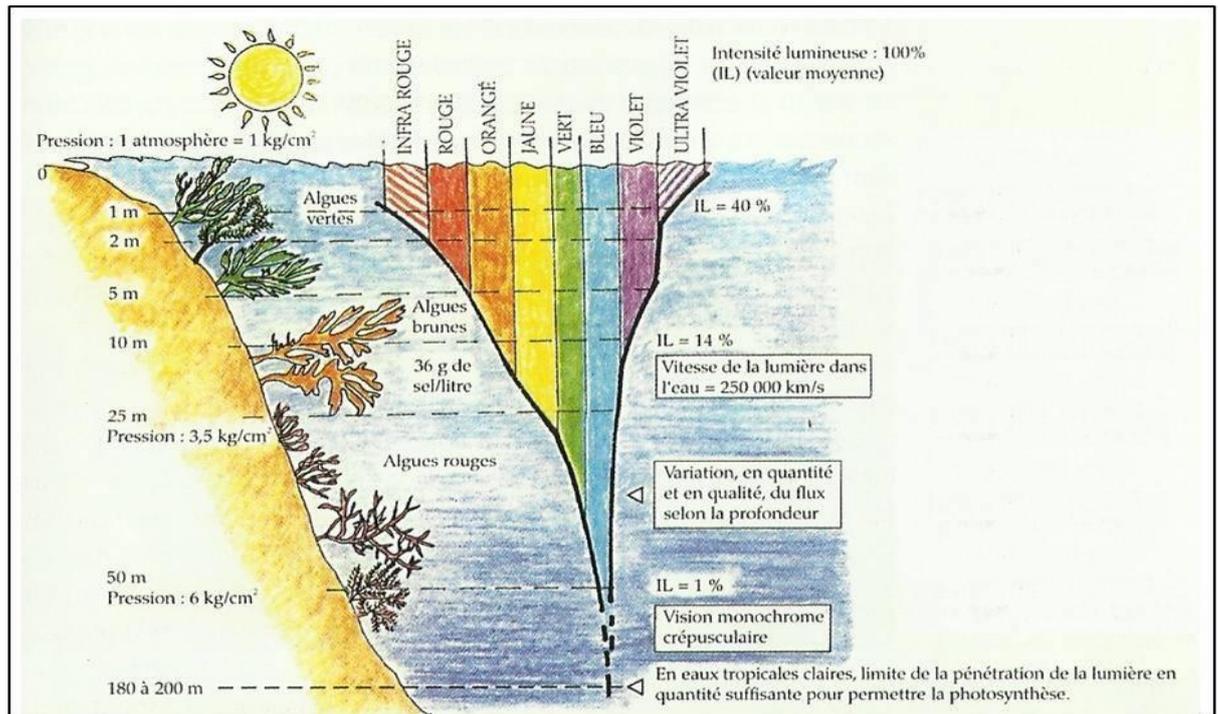


Figure I.3 : Distribution des algues selon l'intensité lumineuse [12].

I.1.5 Domaines d'application :

Il existe plusieurs domaines économiques qui font appel à des algues ou à des phycocolloïdes. Elles présentent actuellement une source nutritionnelle et un produit à valeur montante, surtout en Asie où elles sont utilisées directement comme aliments, ou indirectement surtout par l'industrie de phycocolloïdes (agars et alginates). Elles sont utilisées en agriculture comme engrais et fourrage, dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique, dans le textile, et dans bien d'autres domaines [13].

a) Les algues en cosmétologie :

- **Stimulante**, les algues interviennent dans l'amélioration notable de la circulation sanguine locale à l'origine de vraisemblablement de certains effets positifs constatés dans les surcharges graisseuses localisées et dans la cellulite.

- **Tonifiante**, avec raffermissement des tissus cutanés en générale et par voie de conséquence d'excellent résultats dans la prévention ou le traitement des rides.
- **Rééquilibrante**, hybride, protéinique, vitaminique, et minérale, avec régulation rapide des problèmes de peaux grasses ou sèches et sensibles.

b) Dans le domaine pharmaceutique et médical :

Plusieurs composés chimiques isolés des macro-algues sont biologiquement actifs dont certains possèdent une activité pharmacologique efficace [14]. Une étude sur l'isolement et la détermination de la structure chimique de nouveaux métabolites secondaires pouvant présenter des activités biologiques à potentialités pharmacologiques a été réalisée à partir de deux algues méditerranéennes *Cystoseira crinita* (Phéophycée) et *Lyngbya majuscula* (Cyanophycée) [15].

Aujourd'hui, environ 4000 nouveaux métabolites ont été isolés à partir de divers organismes marins et jusque dans les années 1990, ce sont les algues qui ont le plus intéressé les chercheurs [15].

c) Utilisation alimentaire :

L'algue en alimentation fait cependant partie du quotidien de l'homme, mais de façon discrète, utilisée pour ses propriétés technologiques et ceci depuis le début des années soixante. Agar et Alginate sont devenus des ingrédients incontournables de l'industrie agroalimentaire [16].

d) Utilisation agricole :

Sauvageau (1920) [17], note que les algues marines ont été employées comme amendement et engrais depuis le 12^{ème} siècle aussi bien en Europe qu'en Amérique [18]. Certaines algues bleues sont capables de fixer l'azote de l'air pour les bactéries des légumineuses. Ce pouvoir permettrait d'augmenter le rendement du riz en culture mixte dans les rizières [19].

e) Dans le traitement des eaux usées :

La technique dite de lagunage représente une alternative économique et efficace à des systèmes de traitement (les rejets des villes, de l'industrie, des fermes aquacoles, des entreprises agricoles). La capacité des algues à absorber les nutriments issus d'élevages piscicoles a été démontrée à partir de cultures d'algues en bassin [20]. L'intérêt de l'utilisation des macro-algues pour le traitement des eaux usées en eau

salée a été démontré dès la fin des années 70 dans des mélanges d'eau usée et d'eau de mer [21].

I.1.6 Les substances naturelles des algues :

• Les substances de stress :

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicinales est envahi par un nouveau concept, celui du stress oxydant. Les algues, comme la plupart des végétaux, produisent des substances dites de stress.

Ce sont principalement les osmolytes, les composés phénoliques et les composés à activité antimicrobienne [22]

➤ Les osmolytes :

Les algues synthétisent ou accumulent des solutés organiques pour rétablir une pression intracellulaire cytoplasmique favorable à la croissance en réponse à un stress osmotique. Ces solutés sont essentiellement des polyols, sucres solubles, acides aminés non essentiels, des composés à groupement ammonium quaternaire appelés bêtènes et des composés à groupement sulfonium diméthylés comme le β -diméthylsulfonio-propionate, les trois caractérisés de composés majeures ; le floridoside l'acide iséthionique et la N-méthyl-méthionine sulfoxyde [23].

➤ Les composés phénoliques :

Ce sont des métabolites secondaires présent chez toutes les plantes vasculaires et chez les algues .les composés phénoliques algaux sont pour l'essentiel des polymères du phloroglucinol ,dont les teneurs sont significativement plus importantes chez les algues brunes que chez les algues rouges ou vertes ,les fonctions principales attribuées à ces composés chez les végétaux sont la protection contre les photogènes et les herbivores ainsi que la limitation des dommages dues aux radiations UV dans se dernier cas , ils agiraient par effets d'écran et par effets antioxydants [24].

➤ Les composés à activités antimicrobiennes

Le milieu marin et les organismes qui l'habitent sont une source infinie de molécules actives à structures chimiques originales. Ces composées sont synthétisées par des voies métaboliques différentes de celle observées en milieu terrestre. Parmi les organismes marins, les algues qui sont le plus souvent fixées sur un substrat, ont élaboré des défenses chimiques pour empêcher leur colonisation par d'autres espèces y compris les micros organismes [25].

- **Phytostérols :**

Ce sont des composés qui ressemblent au cholestérol sur le plan chimique, et empêchent l'absorption de ce dernier dans l'organisme et réduisent son taux dans le sang, particulièrement le LDL (mauvais cholestérols). Les algues, dont le wakamé et la nori contiennent des phytostérols. Le wakamé séchée contiendrait environ 1 mg de phytostérols par gramme et la nori séchée contiendrait près de 0,4 mg par gramme [26].

- **Les Polysaccharides :**

Ce sont des macromolécules glucidiques formées par enchaînement d'un grand nombre de sucres élémentaires. La cellulose, l'hémicellulose et les pectines sont des polysaccharides constitutifs de la paroi des cellules végétales [27].

- **Les lipides et acides gras polyinsaturés(AGPI) :**

Les microalgues marines renferment une grande variété d'acides gras. La proportion de lipides dans les algues est très faible (1 à 3% de la matière sèche); elles contiennent en effet une proportion en acides oméga 3 supérieures à celle des plantes terrestres, car contrairement à ces dernières, elles possèdent une élongase-désaturase qui lui permet d'obtenir des longues chaînes d'AGPI [28].

- **les protéines et acides aminés essentiels :**

Certaines algues pourraient être améliorées pour leur teneur protéinique qui est parfois supérieure à celle de certaines plantes terrestres, comme le soja la difficulté de l'exploitation de cette ressource reste surtout due à l'extraction de ces protéines car elles sont liées dans la paroi cellulaire, aux polysaccharides, tel que les alginates, les carraghénanes, l'agar ou encore la cellulose, ce qui limite la solubilité des protéines et leurs disponibilités [29].

Les taux protéiques varient selon les espèces, par exemple les algues vertes (chlorophycées) du genre *Ulva* peuvent contenir jusqu'à 26% de protéines par rapport au poids sec, et les algues rouges (Rhodophycées), comme *Palmaria palmata* (la dulce), ou *Porphyra tenera*, sont les plus riches avec 35 à 47% du poids sec. La teneur en protéine peut aussi varier pendant les saisons [29].

- **Les vitamines :**

La composition vitaminique des algues est intéressante, mais elle varie selon la saison, l'ensemble des vitamines est bien représenté : vitamine A, B₁, B₂ et C. Certaines algues unicellulaires sont cultivées pour leur richesse en vitamines [30]

- **Les minéraux :**

Ces plantes marines sont aussi une source intéressante en minéraux : calcium, magnésium, potassium, iode, fer, cuivre et sélénium [30]. Les algues brunes et rouges en contiennent davantage que les algues vertes, avec 36% de la masse sèche pour les premières contre 30% pour les vertes. Cette richesse minérale est surtout exploitée pour ce qui concerne l'iode et le calcium [31].

- **Les Agar-Agar :**

Ce sont des polymères d'un disaccharide, insoluble dans l'eau froide mais soluble dans l'eau chaude ; en solution aqueuse à 1%, ils forment une gelée ferme entre 32-39°C et qui ne devient fluide qu'à partir de 85°C. L'agar est composé de deux types de molécules : L'agarose et l'agaropectine [27].

- **Huiles essentielles et produits volatils :**

Selon la définition de la norme française NF T 75-006 (AFNOR, 1987), l'huile essentielle est «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation à sec. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » [32], [33]. Ces essences sont chimiquement un mélange complexe de plusieurs composés où parfois une classe de produit est prédominante. Ils sont principalement des produits terpéniques ; des monoterpènes (C-10), des sesquiterpènes (C-15) et des diterpènes (C-20). Il existe aussi une variété d'hydrocarbures aliphatiques (linéaire, ramifiés saturés et insaturés), acides, alcools, aldéhydes, esters acycliques ou lactones et exceptionnellement des composés azotés ou soufrés, coumarins et homologues de phényle propanoïdes [34].

I.2 Propriétés des huiles essentielles :

I.2.1 Propriétés et activités biologiques :

Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie:

- a) Antibactérienne :**

Selon **Benayad (2008)** [35], les phénols (carvacrol, thymol) possèdent le coefficient antibactérien le plus élevé, suivi des monoterpénols (géraniol, menthol, terpinéol), aldéhydes (néral, géranial), etc.

b) Antivirale :

Les virus donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent des problèmes non résolubles aujourd'hui, les HE constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux, les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques [35].

c) Antifongique :

Les mycoses sont d'une actualité criante, car les antibiotiques prescrits de manière abusive favorisent leur extension, avec les HE on utilisera les mêmes groupes que ceux cités plus haut, on ajoutera les sesquiterpéniques et les lactones sesquiterpéniques. Par ailleurs, les mycoses ne se développent pas sur un terrain acide. Ainsi il faut chercher à alcaliniser le terrain [35]

d) Antiparasitaire : Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites [35]

e) Antiseptique : Les aldéhydes et les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes [35]

I.2.2 Propriétés physique des huiles essentielles :

Leurs teintes est généralement comprise dans une gamme allant de l'incolore, à jaune pâle. Il existe toutefois quelques exceptions, comme l'huile essentielle de camomille romaine (*Anthemis nobilis*) qui possède une coloration bleu clair due à la présence du chama.zulène [36].

Leurs densité est le plus souvent inférieure à l'unité. Seules 3 huiles essentielles officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau: il s'agit des huiles essentielles de cannelle, de girofle et de saffras. Elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et sont douées de pouvoir rotatoire puisque constituées, pour l'essentiel, de molécules asymétriques. Peu solubles dans l'eau, elles lui communiquent cependant leurs odeurs (eaux distillées aromatiques). Elles sont solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Elles sont très facilement altérables et sensibles à l'oxydation, mais ne rancissent pas. Le caractère odorant des huiles essentielles est lié à la volatilité des molécules qui les composent ce qui permet de les obtenir par entraînement à la vapeur d'eau [36].

I.2.3 Toxicité des huiles essentielles :

Les HE sont des molécules actives. Elles peuvent avoir de graves effets secondaires. Il est important de respecter la posologie et la durée de la prise. Parmi ces effets, citons : des allergisants ou hypersensibilisants, photosensibilisants dus aux furocoumarines, neurotoxiques dus aux cétones, néphrotoxiques dus aux terpènes majoritaires dans l'huile essentielle de Térébenthine et des rameaux de Genévrier, hépatotoxiques dus aux phénols pris pendant des laps de temps trop importants ou à doses massives L'eugénol, qui est l'un des constituants du Thym, est hépatotoxique. Chez l'enfant, 10 ml eugénol peut conduire à une insuffisance rénale. Il a été démontré que le linalol, l'un des constituants d'une autre espèce de thym, est cytotoxique pour les cellules de la peau humaine [37], [38].

I.2.4 Caractérisation des huiles essentielles :

a) Caractérisation organoleptique :

Les liquides à température ambiante, rarement visqueuse (myrrhe), certaines cristallisent partiellement ou totalement à plus faible température (anis: anéthol; menthe des champs : menthol ; thym saturéioïde: bornéol). Les huiles essentielles sont volatiles et n'ont pas le toucher gras et onctueux, ce qui les différencie des huiles fixes [39], [40].

b) Caractérisation physique :

- **Pouvoir rotatoire** : c'est une propriété des molécules chirales, celles-ci ont la propriété de dévier le vecteur d'un faisceau lumineux les traversant .Il est mesuré à l'aide d'un polarimètre.

Les huiles essentielles sont le plus souvent optiquement actives.

- **Densité relative**: La densité des HE est en général inférieure à celle de l'eau à l'exception des HEs de sassafras, de cannelle et de girofle [41]. La densité relative est mesurée par deux appareils : le densimètre et le pycnomètre.

- **Indice de réfraction** : c'est une grandeur sans dimension, caractéristique d'un milieu, décrivant le comportement de la lumière dans celui-ci ; Il est mesuré couramment par le réfractomètre d'Abbe [39]. La détermination de l'indice de réfraction pour une huile essentielle permet seulement de vérifier si elle est conforme aux normes établies [39]. Les HE ont souvent un indice de réfraction élevé (1,45-1,56) [42].

• Solubilité des huiles essentielles

Elles ne sont naturellement pas, ou très peu, solubles dans l'eau ; certains composants sont néanmoins plus solubles que d'autres (verbénone du romarin officinal, lavandulol de la lavande vraie).

Dans les huiles fixes elles sont totalement solubles dans les huiles grasses [43].

c) Caractérisation chimique :

• **Indice d'acide** : IA est le nombre de milligramme (mg) de potasse nécessaire pour neutraliser les acides libres contenus dans 1 gramme (g) d'HE [44].

• **Indice de saponification** : IS est le nombre de milligramme (mg) d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides libres et saponifier les acides estérifiés contenus dans un gramme d'HE.

• **Indice d'ester** : IE est le nombre de milligramme de potasse nécessaire pour saponifier les esters présents dans 1 gramme d'HE [44].

d) Caractérisation chromatographique :

Différentes méthodes analytiques peuvent être utilisées, telles que la spectroscopie infrarouge, chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) qui est la méthode la mieux adaptée à l'analyse des huiles essentielles [45].

I.3 Procédés d'extraction des huiles essentielles :

I.3.1 Méthodes conventionnelles d'extraction :

➤ **Hydrodistillation :**

La méthode par hydrodistillation est traditionnellement la plus couramment utilisée (environ 80% des cas) car elle est la plus économique [39]. Elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité [46].

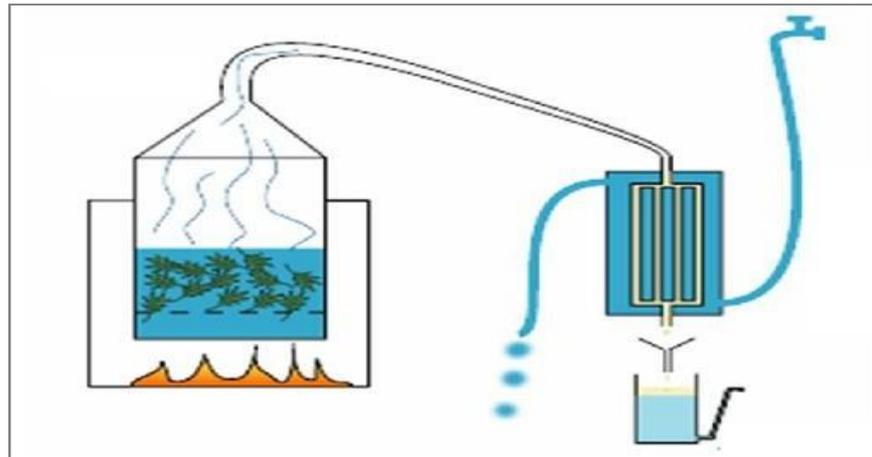


Figure I.4 : l'hydrodistillation simple

➤ **Entraînement à la vapeur d'eau :**

L'entraînement à la vapeur d'eau pure est le procédé qui donne les meilleures garanties de qualité [47]. Dans ce procédé, le végétal n'est pas en contact avec l'eau : la vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées [48].

La vapeur fait éclater les cellules à essence. A la sortie du serpentin, un essencier recueille la vapeur refroidie et revenue à l'état d'eau et l'HE. La différence de densité entre les deux liquides facilite la séparation de cette dernière qui, à quelque exception près, est plus légère que l'eau [47].

L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile [49].

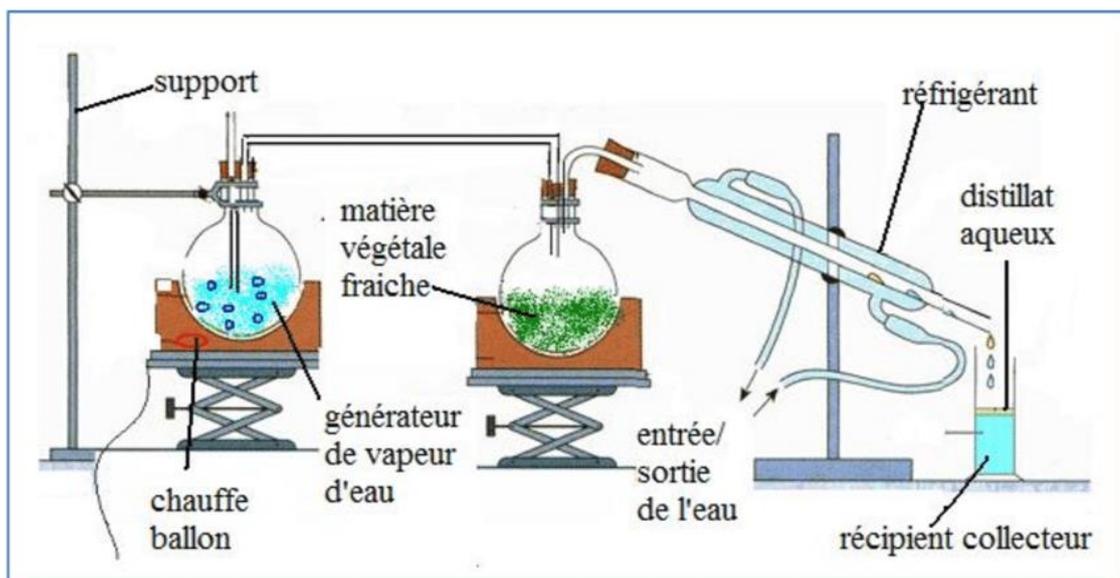


Figure I. 5 : Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau

➤ **Enfleurage :**

Cette technique consiste à mettre les fleurs en contact avec un corps gras inodore. Le mélange est ensuite épuisé par un solvant organique, puis ce dernier est évaporé [50].

Lorsque les fleurs sont peu fragiles à la chaleur (par exemple, les fleurs d'oranger, d'acacia, de mimosa), un enfleurage à chaud est réalisé vers 60-70°C, par leur infusion dans des graisses fondues ou des huiles. Cette méthode est plus rapide que celle à température ambiante [51].

➤ **Extraction par solvants :**

Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui sera ensuite éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne la concrète: mélange odorant de consistance pâteuse. L'extraction de la concrète avec l'alcool conduit à l'absolue [52].

I.3.2 Méthodes innovantes d'extraction :

➤ **Extraction par les gaz supercritiques :**

Les propriétés du dioxyde de carbone en font le fluide le plus utilisé car remplissent toutes les conditions nécessaires à une utilisation en extraction en phase supercritique [53].

Le dioxyde de carbone est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Il est ensuite injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, puis le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant.

➤ **Extraction assistée par micro-onde :**

Les micro-ondes sont une source de chaleur sans contact qui permet d'obtenir un chauffage plus efficace et plus sélective. Avec l'aide de micro-ondes, la distillation peut maintenant être achevée en quelques minutes au lieu des heures avec divers avantages qui sont en conformité avec la chimie verte et les principes d'extraction.

Dans ce procédé, les matières végétales sont extraites dans un réacteur micro-onde avec ou sans solvants organiques ou dans l'eau, dans des conditions différentes selon le protocole expérimentale.

CHAPITRE II: La peau et le Cosmétique

II.1 La peau :

II.1.1 Physiologie de la peau :

La peau est une barrière entre notre milieu intérieur et le milieu extérieur. Elle se compose de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure II.1). Chez un être humain adulte, elle pèse environ 3 kg, représente une surface de 2 m² et son épaisseur varie de 1 à 5 mm selon les endroits de corps [54]

a) L'épiderme :

L'épiderme est la couche la plus superficielle, L'épiderme est non vascularisé (pas de vaisseaux sanguins) donc il reçoit ses éléments nutritifs par le derme. L'épiderme est fait de cellules appelées kératinocytes et mélanocytes. Les kératinocytes (80%) s'empilent les uns sur les autres pour offrir l'épaisseur, résistance aux étirements et protection [54]

b) Le derme :

Plus épais, joue un rôle dans la nutrition, le soutien, l'élasticité, la solidité et l'hydratation cutanée. Nous y retrouvons les fibres de collagène et élastiques et l'acide hyaluronique. Il contient de nombreux vaisseaux sanguins [53].

c) L'hypoderme :

C'est la couche la plus profonde. Principalement formé de graisses et de vaisseaux sanguins, il sert, entre autres, à amortir les chocs [54].

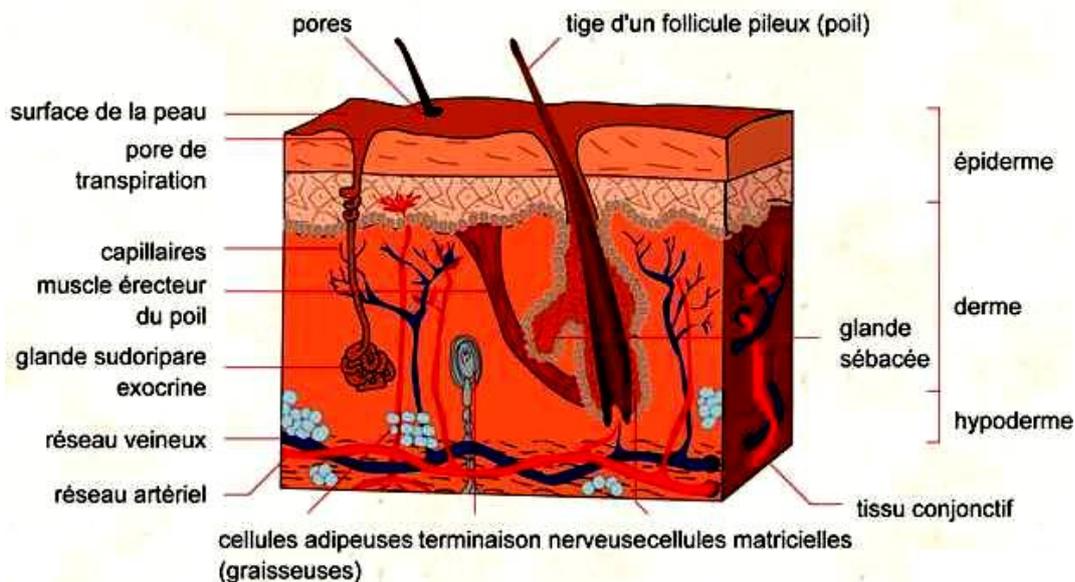


Figure II.1: Coupe latérale de la peau.

II.1.2 Les fonctions la peau : La peau est un organe qui remplit trois rôles principaux [53]

➤ **Protection :**

La peau protège notre organisme contre les agressions mécaniques, physiques, chimiques ou microbiennes du milieu extérieur, principalement grâce à des mécanismes immunologiques et cellulaires ainsi que des propriétés d'imperméabilité, de résistance et de souplesse.

➤ **Transmission d'informations avec l'environnement :**

Ce rôle de la peau se fait grâce à ses terminaisons nerveuses qui assurent la réception des stimuli tactiles, thermiques et douloureux.

➤ **Les échanges :**

La peau permet les échanges entre le corps et le milieu extérieur permettant :

- la régulation de la température du corps : élimination de la chaleur, évaporation de la sueur sécrétée par les glandes sudoripares ;
- l'élimination de substances nocives ;
- la synthèse de la vitamine D indispensable à la croissance osseuse.

II.1.3 Les taches de rousseur :

Les taches de rousseur, appelé aussi éphélides dans le langage scientifique, sont de petites macules de couleur brune foncée, localisées sur la peau exposée au soleil (visage, mains...). Elles apparaissent tôt dans l'enfance, et sont associées au type de peau claire et aux cheveux roux; ce qui suggère que leur formation chez les juvéniles est génétiquement déterminée. Bataille et al. (2000) ont montré que les effets génétiques additifs expliquaient 91% de la variance dans le nombre des éphélides.



Figure II.2: Les éphélides du visage.

❖ D'où proviennent ces taches ?

Les taches de rousseur sont le résultat d'une augmentation de la pigmentation de la peau. En d'autres termes, à l'endroit où les taches de rousseur apparaissent, la peau contient plus de mélanine. C'est d'ailleurs pour cette raison que les taches de rousseur sont plus apparentes durant l'été (lorsque la peau est plus exposée aux rayons UV du soleil) et s'estompent durant l'hiver.

II.1.4 Crème anti tache de rousseur :

Il existe de nombreuses façons d'éliminer ou de réduire les taches de rousseur, .Par rapport à la microdermabrasion, au laser et aux peelings chimiques, les crèmes d'enlèvement de taches de rousseur sont beaucoup plus accessibles et abordables

❖ Quel est le rôle d'une crème anti tache de rousseur ?

Ce type de crème agit sur les taches de rousseur en bloquant la production de mélanine de la peau. Avec moins de mélanine, il y aura moins de chance de créer des taches. Mis à part cette action, la crème anti tache de rousseur aide également avec l'exfoliation. Il aide à éliminer les cellules mortes accumulées. Selon le type de peau ainsi que les ingrédients actifs du produit,

Bien qu'il existe des crèmes pouvant afficher des résultats visibles dès première semaine d'utilisation, il existe également des crèmes pouvant prendre des semaines avant de faire effet.

❖ les ingrédients à rechercher dans une meilleur crème anti taches de rousseur :

- **Hydroquinone :**

La plupart des crèmes d'enlèvement de taches de rousseur contiennent au moins 2% d'hydroquinone. Ce pourcentage est effectivement assez puissant pour inhiber efficacement la formation de mélanine. Parce que c'est un agent de dépigmentation chimique.

- **L'acide kojique :**

L'acide kojique est un autre agent dépigmentant. Cependant, parce que c'est un métabolite fongique, il est considéré comme une approche plus sûre et plus naturelle des taches de rousseur que l'hydroquinone.

- **Vitamine C :**

Un autre ingrédient naturel considérable pour les taches de rousseur est la vitamine C. Il aide à diminuer les pigments des taches sombres pour les rendre moins visibles.

II.2 La cosmétologie:

La cosmétologie, longtemps considérée comme une science empirique et intuitive, est devenue aujourd'hui une science à part entière, bénéficiant des progrès constants des disciplines fondamentales que sont la biologie, la pharmacologie, la physique ou la chimie.

II.2.1 Définition d'un produit cosmétique :

Un produit cosmétique est une substance ou une préparation destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain, notamment l'épiderme, les systèmes pileux et capillaires, les ongles, les lèvres et les organes génitaux externes, ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles ».

a) Cosmétiques biologiques :

Un produit cosmétique biologique est un produit qui contient un maximum d'éléments d'origine naturelle et biologique et qui est respectueux de l'environnement. Ce pourcentage d'ingrédients est variable car il n'existe pas de réglementation spécifique aux cosmétiques bio. Cependant, les différentes certifications permettent de donner cette valeur en pourcentage. On peut encore lire sur le site d'Ecocert que pour obtenir le label « cosmétique biologique » il faut que au minimum 95% des ingrédients végétaux de la formule et que 10% du total des ingrédients de la formule soient issus de l'agriculture biologique .

b) Cosmétiques naturels :

La définition de « produit cosmétique naturel » selon le Comité d'Experts sur les produits cosmétiques du Conseil de l'Europe en septembre 2000 est la suivante : tout produit qui se compose de substances naturelles (toute substance d'origine végétale, animale ou minérale, ainsi que le mélange de ces substances), et qui est produit (obtenu est traité) dans des conditions bien définies (méthodes physiques, microbiologiques et enzymatiques). Un produit fini ne peut être qualifié « naturels » que s'il ne contient aucun produit de synthèse (à l'exception des conservateurs, parfums et propulseurs).

II.2.2 La comparaison entre la composition de produit cosmétique bio et classique :

La différence entre ces deux produits vient de la qualité et de la quantité d'ingrédients naturels ainsi que du processus de fabrication des matières premières. La comparaison entre ces deux produits est résumée dans le Tableau II.1 [56].

Tableau II.1 : Comparaison entre la composition de produit cosmétique bio et classique [56].

| Composants | Cosmétique classique | Cosmétique bio |
|-----------------------|--|---|
| Phase aqueuse | Eau | Eau , hydrolat, Eaux florales (fleurs d'orangers, lavande,...) |
| Phase huileuse | Esters de synthèse ; huiles végétales, huiles minérales issues du pétrole | huiles végétales (argan, sésame, olive, amande,...) triglycérides issus de l'huile végétale de coco. |

II.2.3 Composition générale des produits cosmétiques :

La forme finale d'un produit cosmétique résulte du mélange d'ingrédients judicieusement choisis et associés, appartenant à trois grandes familles de composés [57] :

- Le principe actif qui définit l'efficacité du produit cosmétique,
- L'excipient, qui définit la forme finale du produit et vectorisé les actifs,
- Les additifs, qui contribuent à l'amélioration des propriétés du produit fini.

II.2.4 Différentes formes de produits cosmétiques

➤ **Les solutions micellaires :**

Ce sont des solutions aqueuses qui comportent des micelles qui sont des molécules adoptent une conformation qui vise à diminuer les interactions défavorables entre la partie hydrophobe et l'eau.

➤ **Les lotions :**

C'est une préparation dermatologique liquide, simple, appliquée avec ou sans friction. L'excipient est généralement aqueux ou hydro-alcoolique, son évaporation à la surface de la peau apporte un effet rafraîchissant et calmant. Dans une base hydroalcoolique, les actifs seront surtout des extraits végétaux et/ou des huiles essentielles choisis en fonction de la revendication. Certaines lotions de ce type peuvent être épaissies par un gélifiant et se présenter sous forme de gels fluides.

➤ **Les laits :**

Ce sont des préparations dermatologiques multiphasiques, comprenant au moins deux phases liquides non miscibles: une phase hydrophile ou aqueuse et une phase lipophile ou huileuse. Ce sont donc des émulsions fluides, c'est-à-dire des systèmes dispersés dans lesquels une des deux phases liquides, appelée phase dispersée ou interne ou discontinue, est fragmentée en fines gouttelettes (1 à 100 micromètres) qui sont distribuées de façon homogène dans l'autre liquide (phase externe, continue ou dispersante). Selon la consistance de l'émulsion, les laits sont des préparations solides, semi-solides fluides. Lorsque les laits ne contiennent pas de principes actifs, ils répondent aux termes «produit cosmétique».

➤ **Les crèmes :**

Les crèmes, du fait de leurs propriétés rhéologiques, sont souvent considérées comme "semi-solides". Les micelles présentes à haute concentration sont immobilisées dans une très faible quantité de liquide ; ainsi le fluide visqueux obtenu ne peut que difficilement s'écouler sous l'action de la pesanteur.

En revanche, les crèmes se déforment de façon réversible sous l'action de forces suffisantes, ce qui permet leur étalement sous forme de films adhérents à la surface de la peau. Les crèmes sont fabriquées en agitant plus ou moins fortement les phases aqueuse et huileuse et les molécules amphiphiles, puis en laissant le système revenir au repos. Dans l'industrie, ce mélange est réalisé par homogénéisation. [59]

II.3 Les émulsions :

II.3.1 Définition :

Une émulsion est un système biphasique préparé en combinant deux liquides non miscibles, dans lesquels de petits globules d'un liquide sont dispersés uniformément dans l'autre liquide. Le liquide dispersé en petites gouttelettes est appelé la phase dispersée, interne ou discontinue.

L'autre liquide est le milieu de dispersion, la phase externe ou la phase continue. Lorsque l'huile est la phase dispersée et une solution aqueuse est la phase continue, Les émulsions peuvent être utilisées par voie orale, topique ou parentérale, en fonction des ingrédients de la formulation et de l'application prévue. [60]

II.3.2 Différents types d'émulsion :

- **Les émulsions simples :**

Une émulsion simple est une émulsion composée d'une phase hydrophile, d'une phase lipophile et d'un émulsifiant [61].

Les émulsions simples sont appelées eau-dans-huile (E/H) quand des gouttelettes d'eau sont dispersées dans la phase huileuse, et huile-dans-eau (H/E) pour l'inverse [62].

Tableau II.2 : Les différents types d'émulsion simple.

| Sens de l'émulsion | Phase disperse | Phase dispersante | Symbole |
|---|----------------|-------------------|----------------|
| <i>Emulsion Huile dans Eau</i> = émulsion de type aqueuse | Lipophile | Hydrophile | H/E, L/H, O/W, |
| <i>Emulsion Eau dans huile</i> = émulsion de type huileuse | Hydrophile | Lipophile | E/H, H/L, W/O |

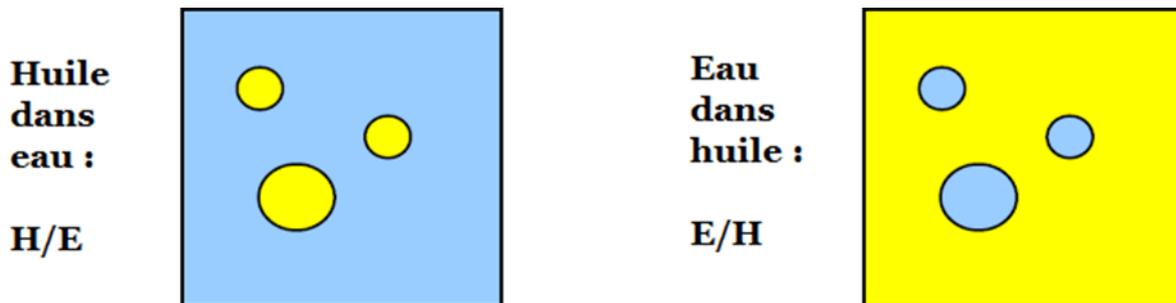


Figure II.3 : Schéma d'une émulsion simple (en bleu l'eau, en jaune l'huile)

- **Les émulsions multiples :**

Les émulsions multiples sont des systèmes multiphasiques comprenant au moins deux liquides non miscibles, à savoir, deux émulsions H/L et L/H siègent des tensio-actifs hydrophiles et lipophiles qui sont utilisés pour stabiliser ces deux émulsions, Le diamètre des gouttelettes dans les émulsions multiples peut varier de 0,1 à 100 μm [63].

Ce sont des systèmes thermodynamiquement instables, leur formulation constitue un paramètre critique à leur préparation [64].

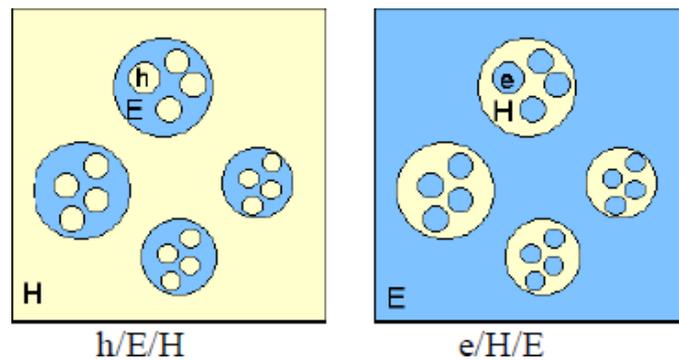


Figure II.4: Schéma d'une émulsion multiple.

II.3.3 Caractères des émulsions :

Les caractères des émulsions varient avec différents facteurs, notamment avec la nature et la proportion des deux phases, des émulsifiants ou des autres constituants, et avec la taille des globules dispersées [62].

- Ces préparations sont généralement liquides, cependant il existe des émulsions formées de globules dispersées dans un milieu plus ou moins consistant (certaines pommades par exemple).
- Elles ont le plus souvent un aspect laiteux. Elles peuvent présenter un reflet bleuté (effet Tyndall). Elles sont translucides lorsque la taille des globules est très faible.
- Les globules d'une émulsion, sont d'une taille sensiblement identique, celle-ci variant, selon l'émulsion de 0.5 à 50 μm en général.
- La stabilité des émulsions est telle que leur aspect macroscopique reste inchangé au cours de la conservation.

II.3.4 Instabilité des émulsions :

Les émulsions étant thermodynamiquement instables, leurs propriétés vont se modifier dans le temps [65].

La stabilité d'une formulation revêt plusieurs aspects : physiques, chimiques et microbiologiques [66]. La stabilité chimique repose sur le fait qu'aucun des composants de l'émulsion ne doit participer à une réaction chimique pouvant soit modifier de manière grave la stabilité physique, soit perturber les propriétés applicatives (aspect, couleur, odeur, efficacité).

➤ . Coalescence :

Ce phénomène dépend de la tension interfaciale entre les deux phases liquides. La tension interfaciale entre deux liquides tend à rendre la surface de séparation aussi petite que possible. En faisant une émulsion, on augmente la surface de séparation de façon considérable et ceci d'autant plus que les gouttelettes dispersées sont très fines. On accroît ainsi l'énergie libre du système donc son instabilité [69].

La vitesse de coalescence dépend de deux facteurs essentiels, d'une part, de la vitesse de floculation puisque celle-ci est une étape préalable à la coalescence, d'autre part, du film interfacial qui, suivant sa structure, s'oppose plus ou moins à la coalescence [69].

Au total, la vitesse de coalescence suit la loi de Smoluchowski lorsque la floculation est lente par rapport à la coalescence mais suit la loi de VAN DER TEMPEL lorsque c'est la coalescence qui est lente par rapport à la floculation. Dans ce dernier cas, la décroissance du nombre de particules en fonction du temps est donnée par la relation [68]:

$$n = n_0 e^{-kt}$$

Il est important de noter que, contrairement au crémage et à la floculation, la coalescence est une forme d'instabilité toujours irréversible. A la limite, le phénomène de coalescence se traduit par la séparation complète des deux phases (l'émulsion se sépare en deux couches).

➤ Crémage et sédimentation :

Ce processus résulte de forces externes, habituellement gravitationnelle ou centrifuge. Lorsque ces forces sont supérieures au mouvement thermique des gouttelettes (mouvement brownien), un gradient de concentration crée dans le système de telle sorte que les grosses

gouttelettes se déplacent plus rapidement, soit vers le haut (si leur densité est inférieure à celle du milieu) ou au fond (si leur densité est supérieure à celle de la Moyen) du récipient [68].

La vitesse de crémage ou de sédimentation est donnée par la loi de Stokes [69] :

$$V = \frac{2r^2g(D_1 - D_2)}{9\eta}$$

V : en **cm.S-1**

r : rayon des gouttelettes ou des globules d'émulsion en **cm**

D1, D2 : densité des phases dispersée et dispersante en **g.cm3** à 20°C

g : accélération de la gravite **981cm.S-1**

η : viscosité de la phase dispersante ou continue en **Pa.S**

Pour limiter ce phénomène, on a plusieurs possibilités [69] :

- réduire la taille des gouttes de phase dispersée,
- ajouter un agent qui augmente la viscosité,
- diminuer la différence de densité entre les deux phases,
- éviter l'agrégation des gouttes.

➤ **Inversion de phase :**

L'inversion de phase est un phénomène de déstabilisation où la phase dispersante devient la phase dispersée, et inversement. Dans le cas des émulsions concentrées, une forte agitation ou homogénéisation peut créer une rupture d'émulsion et aboutir à une inversion de phase.

A partir d'une certaine température, le tensioactif n'est plus soluble dans l'eau et migre dans la phase grasse. Cette température est appelée température d'inversion de phase (PIT). Cette température est fonction de la longueur de la chaîne carbonée de l'huile utilisée et de celle du tensioactif [70].

L'émulsion doit généralement être réalisée quelques degrés en dessous de cette température critique [71].

Le mécanisme de l'inversion de phase est schématisé ci-dessous en prenant comme exemple l'inversion d'une émulsion H/E. Dans un premier temps, les globules d'huile flocculent et emprisonnent une certaine quantité d'eau à l'intérieur d'un film interfacial. Dans un second temps les globules d'huile subissent le phénomène de la coalescence et l'huile devient la phase continue [67].

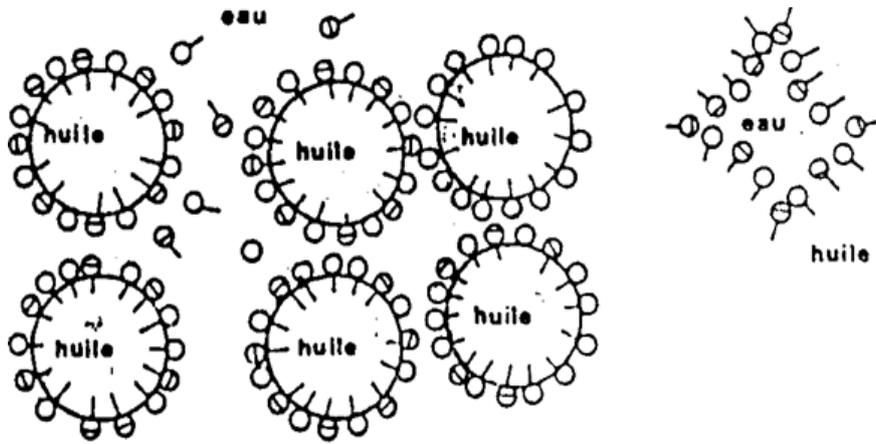


Figure II.5: Mécanisme de l'inversion de phase.

➤ **Mûrissement d'Ostwald :**

Ce phénomène irréversible est essentiellement dû aux différences de pression de Laplace existant à l'intérieur des gouttelettes de différentes tailles. Le contenu des petites gouttelettes va donc naturellement diffuser vers les gouttelettes de plus grande taille, dont la pression interne est plus faible. [72]

Ce phénomène se traduit par la modification de la granulométrie au cours du temps où les populations de gouttelettes de petites tailles disparaissent au profit des plus grosses.

La vitesse de ce phénomène décroît avec le temps, car elle favorise une dispersion homogène de grosses gouttelettes.

II.3.5 Les émulsionnants :

Les émulsions conventionnelles sont des systèmes thermodynamiquement instables qui se séparent, plus ou moins rapidement, en deux phases. On parle de systèmes hors équilibre. En raison de cette instabilité les émulsions industrielles comportent toujours des émulsifiants, ou émulsionnants, formant un film interfacial, ou film mince, ou membrane interfaciale, autour des globules de phase dispersée. [67]

Les émulsionnants utilisés pour préparer des émulsions sont divisés en trois groupes dont le plus important est celui des surfactifs.

❖ **Surfactifs :**

Les surfactifs, encore appelés agents tensioactifs, ou mieux, agents de surface sont des substances naturelles ou synthétiques, amphiphiles, ont la propriété de s'adsorber aux

différentes interfaces et selon leur hydrophilie ce sont des tensioactifs, mouillants, détergents, moussants, solubilisant, émulsionnants, bactériostatiques, etc... [67]

Ce sont des substances qui forment un « film interfacial » autour des gouttelettes se trouvant dans la phase dispersée. En règle générale, un émulsifiant est d'autant plus efficace à stabiliser une émulsion, qu'il diminue la tension interfaciale [73].

La tête hydrophile forme des liaisons hydrogènes et ioniques avec la phase hydrophile tandis que la queue hydrophobe forme des liaisons de Van der Waals et des interactions hydrophobes avec la phase lipophile. Ce phénomène a pour effet de diminuer la tension interfaciale.

La partie hydrophile, ou tête polaire, est constituée par un ou plusieurs groupements polaires (s), ionique (s) ou non ioniques (s). On distingue les tensioactifs ioniques (anioniques, cationiques, zwitterioniques ou amphotères) et les non ioniques [73].

❖ Polymères :

Les polymères les plus utilisés comme émulsionnants sont Les gommes, notamment la gomme arabique et, plus rarement, la gomme adragante, Les dérivés de la cellulose, notamment la méthylcellulose carboxyméthylcellulose, Les alginates, les carraghénates, etc
Tous ces produits assurent essentiellement la stabilité de l'émulsion par augmentation de la viscosité de la phase dispersante. [67]

❖ Solides insolubles finement divisés :

Ces produits sont beaucoup plus rarement utilisés comme émulsionnants. Le plus employé est la silice. Ces produits assurent essentiellement la stabilité des émulsions par formation d'un film solide à l'interface des deux liquides. [67]

CHAPITRE III : Matériels et Méthodes

Dans cette pratique nous avons essayé de formuler une crème de jour stable, en utilisant des ingrédients à 100% bio à base de l'huile essentielle d'algues rouges cherchant à minimiser ou éliminer les taches de rousseur.

III.1 Matériel :

III.1.1 Matière végétale : Pour notre étude, nous avons utilisé les algues rouges

a) Site d'échantillonnage :

Toutes les récoltes de *Sphaerococcus Coronopifolius* sont faites au niveau des ruines romaines de la wilaya de Tipaza de façon "aléatoire", c'est-à-dire sans choisir forcément des algues de même âge et de même taille. Le choix de ce site est basé sur sa richesse en ressources algales, Les récoltes ont lieu durant le mois de décembre 2019. Aucun échantillonnage n'est fait pendant l'été.



A



B

Figure III.1 : Site d'échantillonnage

A : plage des ruines romaines de Tipaza (le site de prélèvement)

B : Localisation géographique du site de l'échantillonnage des algues rouges

b) Identification des espèces :

Les espèces ont été identifiées grâce à la clé de détermination de (Fischer, Schneider et Bauchot., 1987) et au programme numérique Algaebase. Nous avons pris en considération la couleur, la longueur du thalle et des parties aériennes ainsi que le mode de fixation pour cette détermination.



Figure III.2 : Algue marine récoltée sur site de la plage des ruines romaines.

c) Préparation de la matière végétale :

Les algues sont sèches à l'air ambiante pendant dix jours, ensuite elles sont entreposées dans des boîtes de carton, à température ambiante au laboratoire, jusqu'à utilisation.



Figure III.3 : Aspect des algues rouges avant et après séchage.

III.1.2 Matières premières :

❖ **Huile d'amande douce :**

Nom scientifique: *Prunus amygdalus* var. *dulcis* ou *communis*.

Famille : Rosacées

L'huile d'amande douce est riche en différentes vitamines, mais surtout en vitamine A (améliore l'élasticité de la peau) et en vitamine E (accélère la réparation cellulaire).

Elle est aussi très riche en minéraux et contient du potassium, du phosphore, du calcium, du magnésium, du fer, du zinc et du cuivre. C'est surtout utile à savoir si vous mangez des amandes régulièrement (les minéraux sont plus utiles dans la digestion que... sur la peau).

L'huile d'amande en plus de désenflammer et calmer les irritations cutanées, hydrate et atténue tout type de peau.

❖ **Beurre de karité :**

Nom scientifique: Butyrospermum parkii

Famille: Sapotacées

Le beurre de karité est un produit efficace aux vertus exceptionnelles, il résout tous les problèmes de peau sans aucune contre-indication.

Il possède de puissantes vertus régénératrices et réparatrices de la peau grâce aux vitamines A, D, E et F qu'il contient naturellement.

Il apaise, protège, nourrit et assouplit la peau, ce qui contribue à la garder jeune et en bonne santé, il combat les rides, le dessèchement. Il est recommandé pour :

- L'hydratation de la peau (partie lipidique) la cicatrisation (esters cinnamiques) ;
- La protection solaire (calme les coups de soleil grâce au karitène) ;
- Retarder la formation des rides au visage ;
- Soulager les tendinites ou autres problèmes musculaires ;
- Protège les cheveux et les pieds secs ;
- Il est bénéfique pour les démangeaisons de la peau, éruption cutanée ; eczéma...etc. et pour les peaux intolérantes ne supportant pas les cosmétiques à base de produits chimiques.

❖ **Cire d'abeille**

Nom scientifique : Cera flava

Famille : Cire : Solide ou liquide.

La cire d'abeille forme la structure des essaims d'abeilles. Elle se présente sous la forme de petites alvéoles qui sont construites par les abeilles et qui leur servent à stocker le miel. Très appréciée dans les cosmétiques pour ses nombreuses vertus et ses qualités nourrissantes et émollientes pour la peau.

Les propriétés thérapeutiques de la cire d'abeille sont :

- Protéger la déshydratation et adoucir la peau ;
- Permet également de gagner et de fortifier les cils ;
- Permet de protéger, de lisser et d'assainir l'épiderme ;
- Protéger la peau contre le soleil, le froid et le vent qui peuvent l'irriter (car imperméabilisante) ;
- Utilisée comme excipient dans des préparations du type suppositoires, ovules, pommades, onguents...

- Conseillée en cas de cicatrices car elle possède des propriétés anti-inflammatoires qui apaisent la blessure et facilite la cicatrisation.

❖ **Lécithine de Soj :**

Nom scientifique : phosphatidylcholine

Famille : phospholipides

Cet ingrédient est extrait du grain de soja d'abord par pression à froid, pour obtenir l'huile, puis cette huile est chauffée. On ajoute alors de l'eau et la **lécithine** se sépare facilement de l'huile lorsqu'une émulsion gélatineuse se forme. Une fois séparée, l'**additif** est séché puis transformé en poudre.

Cette fine poudre de couleur jaune est quasiment inodore et avec un gout neutre. Elle possède des **vertus médicales et diététiques** reconnues.

La lécithine contient également une vitamine parente de groupe B, la choline, elle contient aussi de la vitamine E, antioxydant puissant et ennemi des graisses. Incorporée dans les émulsions, elle en augmentera la stabilité tout en conservant une texture plutôt fluide, au toucher très soyeux.

❖ **Hydrolat des algues rouges :**

L'eau d'évaporation condensée durant la distillation de l'huile essentielle constitue l'hydrolat. Cet hydrolat, contient les mêmes composés volatils présents dans l'huile essentielle mais en quantité moindre, en plus des composés hydrosolubles. Ces eaux florales constituent fréquemment la partie aqueuse des bases de produits Bio mais peuvent également s'appliquer directement sur le visage comme tonique.

Les matières premières et leurs rôles sont résumés sur le tableau III

Tableau III.1 : Tableau récapitulatif des matières utilisées dans la formulation de la crème.

| Composés | Nature chimique | Propriété physique | Rôle |
|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| L'hydrolat des algues rouges | Composé d'origine Végétale | Liquide trouble | Purifient et tonifient de la peau |
| Huile d'amande douce | Composé organique | Liquide jaune pale | Hydratation de la |

| | | | |
|--------------------------|--|--|--|
| | végétale (mélanges de terpènes, | | Peau |
| Cire d'abeille | Composé d'origine animal (mélange d'acide et d'esters) | Aspect peu solide de couleur miel | effet filmogène et nourri la peau |
| Beurre de karité | phosphatidyl-glicéride végétal | Poudre jaune avec une légère odeur d'œuf | Apaise Protège nourrit et assoupli la Peau |
| Lécithine de soja | phosphatidyl-Glicéride | Poudre jaune avec une légère odeur d'œuf | Emulsifiant |

III.2 Méthodes :

III.2.1 Extraction de l'huile essentielle des algues rouges :

L'extraction de l'huile essentielle s'est fait par la méthode d'hydrodistillation assistée par micro-onde au niveau de laboratoire de chimie organique du département de génie des procédés, situé à l'université de Blida-1.

❖ **Principe de l'hydrodistillation :**

L'hydrodistillation consiste à immerger la plante aromatique dans un volume d'eau. Le mélange obtenu est porté à ébullition. Les vapeurs qui se dégagent sont condensées. L'huile essentielle est récupérée à la surface de l'eau aromatique (phase aqueuse) ainsi obtenue.

❖ **Mode opératoire et Description de l'extraction :**

Dans un ballon de 500 ml, on met 20 g d'algue rouge sèche et 30 ml d'eau distillée, en agitant jusqu'au mouillage complet de la matière végétale. Cette préparation est portée à ébullition dans un four à micro-onde réglé à la puissance de 300 watts pendant 15min et ceci suite à plusieurs essais. Les vapeurs chargées d'huiles traversent un réfrigérant, se condensent et chutent dans un bécher. En fin d'opération, on obtient un trouble (eau et huile essentielle)

qui se séparent par leur différence de densité (Pharmacopée Européenne, 2002).

Le four à micro-onde permet de porter rapidement le mélange à ébullition, les vapeurs d'eau chargées d'huile essentielle et de composés odorants passent dans le système de refroidissement qui permet leur condensation dans le réfrigérant. L'hydrolat est récupéré dans un bécher et le stocké dans des flacons sombres fermés avec des bouchons étanches afin d'éviter la dégradation de l'huile (voir figure III.4).



Figure III.4 : Montage d'hydrodistillation assisté par micro-onde.

III.2.2 Formulation de la crème anti tâches de rousseur :

Les matières premières utilisées pour la fabrication de la crème sont disponible au niveau des herboristes, elle est constituée de :

- Cire d'abeille ;
- Beurre de karité ;
- Huile d'amande douce ;
- Lécithine de soja ;
- Hydrolat des algues rouge.

Préparation de la phase aqueuse :

La phase aqueuse n'est autre que l'hydrolat des algues rouges dans lequel on a dissout du tensioactif (TA) qui est la lécithine de soja.

Préparation de la phase huileuse :

La phase huileuse est un mélange (Cire d'abeille, Beurre de karité et l'huile d'amande douce), ces derniers ont été met dans un bain marie à 65°C, jusqu'à fusion complète des composants.

Préparation de l'émulsion (crème) :

La phase grasse a été versée dans la phase aqueuse par petites fractions en mélangeant d'une façon rigoureuse. Une agitation mécanique pendant 2 min puis une bonne homogénéisation a été assurée pendant 5min à l'aide d'un homogénéisateur.

➤ **Processus de fabrication :**

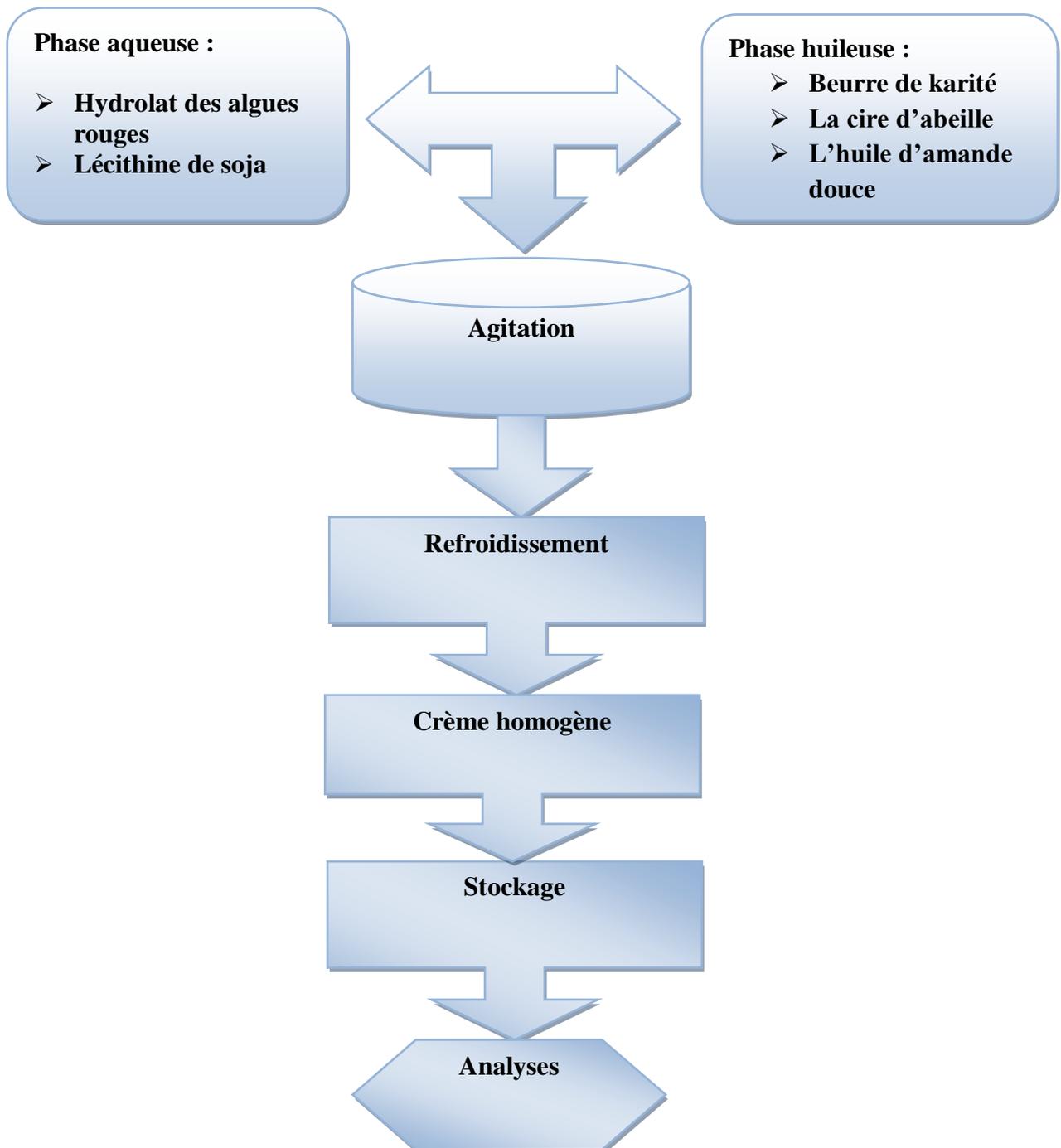


Figure III.5: le procédé de formulation de la crème.

❖ Stockage et conservation :

L'emballage utilisé pour le conditionnement doit être inerte vis-à-vis du produit fini et doit assurer une bonne conservation. Ceci est particulièrement important lorsqu'il y a une phase aqueuse qui risque soit de s'évaporer, soit d'être contaminée.

III.2.3 Caractérisation de la crème :

a) Analyse physico-chimique :

- **Évaluation de la stabilité**

Les principaux phénomènes d'instabilité sont appréciés dans une éprouvette graduée par l'observation à intervalles de temps réguliers et sous des conditions physiques rigoureuses.

En utilisant une centrifugeuse de type Hettich rotina 35 à vitesse constante (3000 tr/mn pendant 3 minutes).



Figure III.6 : Image d'une centrifugeuse.

- **Homogénéité par microscopie optique :**

Une certaine quantité de crème est étalée sur une lame puis recouverte d'une lamelle pour une observation microscopique.

Ce test permet d'apprécier l'homogénéité de l'émulsion ou la distribution des gouttelettes dans l'émulsion et pour cela nous avons utilisé un microscope optique de type MICROS AUSTRIA avec un grossissement de $40 \times 100 = 4000$.

- **Mesure du pH :**

Nous avons procédé à un test à l'aide d'un pH mètre, afin de mesurer la teneur en pH de notre crème. Tout d'abord, il est nécessaire de savoir que la valeur lue sur le pH mètre ne

peut être retenue comme mesure que lorsqu'elle est stabilisée. La durée de stabilisation est en général de quelques secondes et elle varie en fonction de la nature de la solution ou de l'encrassement de l'électrode. Ensuite, le pH mètre doit être étalonné avant chaque mesure ou série de mesures ce qui permet la graduation de l'appareil en étalon.

Nous avons mesuré directement, à l'aide d'un pH-mètre de type HANNA instruments.

- **Influence de l'air**

Le produit est exposé à l'air libre pendant une semaine afin d'évaluer l'effet de l'environnement directe sur le produit formulé.

- **Influence de la température :**

Pour le test de stabilité, nous avons déposé un échantillon de notre crème dans une étuve à 37° pendant 3jours afin de mesurer sa stabilité microbiologique au cours du temps. La stabilité des produits cosmétiques est un des paramètres clé pour la garantie de la qualité du produit formulé.

b) Analyse microbiologique :

L'objectif de cette partie du rapport sur la sécurité du produit cosmétique est de déterminer les spécifications microbiologiques des matières premières (substances ou mélanges) et du produit fini acceptables d'un point de vue microbiologique (la crème cosmétique) (2013/674/UE).

Les produits cosmétiques ne sont pas obligatoirement stériles mais il est important de contrôler leurs niveaux de contamination afin que les produits mis à disposition sur le marché puissent être considérés comme sûrs.

Nous avons effectué au laboratoire d'hygiène de l'établissement public de la sante de proximité de wilaya de Blida (EPSP) nos analyses.

Dans notre travail on a effectué seulement l'analyse microbiologique basée sur :

- Un dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux ;
- Un dénombrement des coliformes totaux et coliformes fécaux ;
- Un dénombrement des micro-organismes saprophytes (levures, moisissures).

✓ Préparation des dilutions en vue de l'analyse microbiologique :

❖ Principe :

La préparation de la dilution primaire (solution mère) ; est nécessaire pour les dilutions décimales suivantes en vue de réduire le nombre de microorganismes par unité de volume ; pour faciliter l'analyse microbiologique.

❖ Préparation de la solution mère

- Peser 5g de l'échantillon à analyser ;
- Ajouter 50 ml de diluant Tryptone Sel Eau (TSE);
- Homogénéiser la solution mère ;
- La concentration de la solution mère est toujours à 10^{-1} ;
- Préparation des dilutions décimales.

1) Dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux (GAMT) :

La Germes Mésophile Aérobie Totale (GMAT) est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'UFC (Unité Formant une Colonie) présentes dans un produit ou sur une surface. Ce dénombrement se fait à 37 °C. L'unité est l'UFC car une colonie observable sur la gélose peut venir d'un micro-organisme isolé, d'une spore ou encore d'une association de micro-organismes.

❖ Principe

Le dénombrement des GAMT se fait sur une gélose nutritive TGEA à une température de 37°C pendant 72 heures .Après incubation ; ils apparaissent sous forme de colonie lenticulaire en masse.

❖ Mode opératoire

- A partir des dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-3} portes aseptiquement 1ml dans une boîte de pétri vide préparé a cet usage ;
- Compléter ensuite avec environ 20 ml de gélose fondue puis refroidir à $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Faire des mouvements circulaires et de va et vient en forme de « 8 »pour augmente la surface de contact entre se mélange et la gélose utiliser ; après on laisse à solidifie ;
- Les boîtes seront incubées à 37°C pendant 72 heures.

❖ Lecture

Les colonies des GAMT se présentent sous forme lenticulaire en mase. Il s'agit de Compter toutes les colonies ayons poussé sur les boîtes intentent compter des facteurs suivant:

- Ne dénombre que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies ;
- Multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution ;
- Faire ensuit la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

2) **dénombrement des coliformes totaux et coliformes fécaux**

• **Coliformes totaux :**

Il s'agit de Bacilles Gram Négatifs (BGN), aérobies ou anaérobies facultatifs, non sporulés, ne possédant pas d'oxydase, capables de se multiplier en présence de sels biliaires et capables de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 24 à 48 heures à une température comprise entre 36 et 37°C, selon l'ISO.

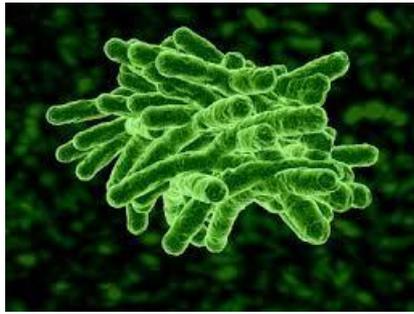


Figure III.7 : Image représentative des coliformes totaux.

Coliformes Thermo-tolérants :

Les coliformes thermotolérants possédant les mêmes caractéristiques que les coliformes mais à 44°C ; ils remplacent dans la majorité des cas l'appellation de «Coliformes fécaux ».

• **Escherichia coli :**

Escherichia coli est un bacille à Gram négatif anaérobie facultative, possédant des caractères biochimiques particuliers dont la production d'indole à partir du tryptophane, l'absence d'utilisation du citrate comme source de carbone et l'absence de production d'acétone. Les E. coli font partie de la flore microbienne du côlon chez l'homme et de l'appareil digestif des animaux à sang chaud. La présence d'E.Coli dans un produit représente des conditions hygiéniques faibles ou un traitement thermique insuffisant (Victor, 2010).

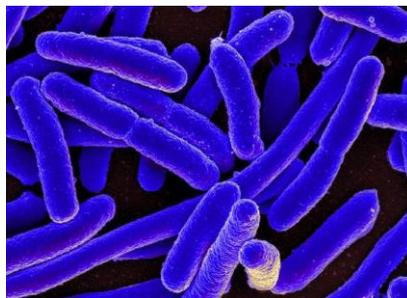


Figure III.8 : Image représentative des coliformes fécaux (Escherichia coli).

❖ **Mode opératoire**

Le dénombrement s'effectuer en gélose cristal violet, rouge neutre, bile, glucose (VRBL).

- A partir de la suspension mère et les dilutions décimales porter 1 ml dans des boîtes de pétri stériles vides préparer à cette usage et numéroter ;
- Couler 12 à 15 ml de la gélose sélective fondue et ramener 44 plus ou moins 1°C ;
- Faire ensuite des mouvements circulaires et de va et vient en forme de « 8 » pour permettre l'inoculum de se mélanger à la gélose utiliser ;
- Laisser solidifier sur la paillasse ;
- Placer les boîtes retournées dans une étuve à 44°C pendant 48 heures.

❖ **Lecture**

Dénombrer les colonies rouges foncées (avec un halo de précipité rouge foncé). Le dénombrement et le comptage de toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte des facteurs suivants :

- Ne dénombre que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies ;
- Multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution ;
- Faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

3) Recherche et dénombrement des levures et moisissures

❖ **Principe**

Les moisissures sont des hétérotrophes multicellulaires, aérobies, acidophiles (pH de développement comprise entre 3 et 7) et mésophiles (Température de croissance de 20 à 30°C). Les levures sont typiquement unicellulaires de forme ronde ou ovoïde et se multiplient par bourgeonnement. Le dénombrement est effectué en milieu sélectif doté de propriétés antibactériennes milieu OGA.



Figure III.9: Image représentative des levures et moisissures.

❖ Mode opératoire

- A partir des dilutions décimales 10^{-1} à 10^{-3} ;
- Porter aseptiquement 4 gouttes dans une boîte de pétri contenant de la gélose OGA ;
- Etaler les gouttes à l'aide d'un râteau stérile ;
- Puis incuber à 25°C pendant 5 jours.

❖ Lecture

Les colonies des levures sont brillantes, rondes et bondées, de couleurs différentes, de formes convexes ou plates et souvent opaques. Les colonies de moisissures sont épaisses, filamenteuses, pigmentés ou non, et sont plus grandes que celles des levures.

III.2.4 Caractérisation de l'hydrolat :

1) Recherche et dénombrement des Coliformes en milieux liquides :

La recherche et le dénombrement des coliformes peuvent se faire selon la méthode en milieu liquide sur BCPL par la technique du NPP (Nombre le Plus Probable). Cette technique fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

- ❖ **le test de présomption** : réservé à la recherche des Coliformes totaux.
- ❖ **le test de confirmation** : encore appelé test de Mac Kenzie et réservé à la recherche des Coliformes fécaux à partir des tubes positifs du test de présomption.

a) Test de présomption :

A partir de l'hydrolat à analyser:

- 50 ml dans un flacon contenant 50 ml de milieu BCPL D/C muni d'une cloche de Durham
- 5 fois 10 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu BCPL D/C muni d'une cloche de Durham
- 5 fois 1 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu BCPL S/C muni d'une cloche de Durham (voir figure III.10).

Chassez le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et bien mélangé le milieu et l'inoculum.

Incubation :

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture :

Sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :

- un dégagement gazeux (supérieur au 1/10 de la hauteur de la cloche),
- un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu).

Ces deux caractères étant témoins de la fermentation du lactose dans les conditions opératoires décrites.

La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table du NPP qui figure en annexe 01

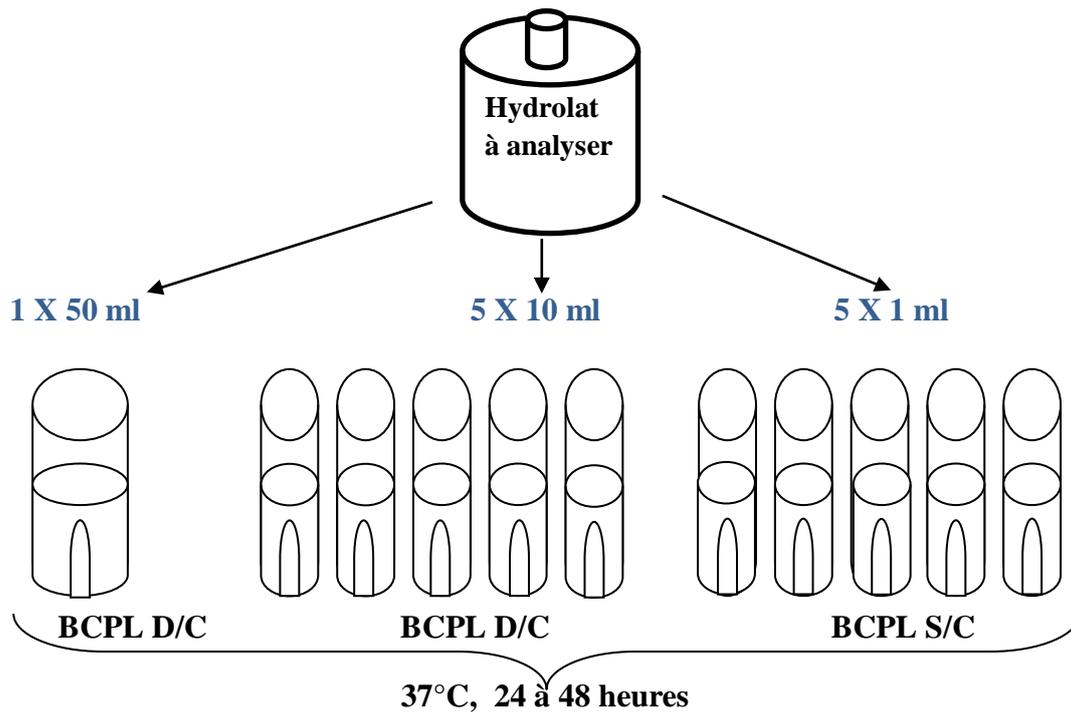


Figure III.10: Protocole de colimétrie (test de présomption)

b) Test de confirmation ou test de Mac Kenzie :

Le test de confirmation ou test de Mac Kenzie est basé sur la recherche de Coliformes thermotolérants parmi lesquels on redoute surtout la présence d'Escherichia coli.

Les coliformes thermotolérants ont les mêmes propriétés de fermentation que les coliformes mais à 44°C.

Escherichia coli est un coliforme thermotolérant qui entre autre :

- Produit de l'indole à partir du tryptophane à 44°C,
- Donne un résultat positif à l'essai au rouge de méthyl,
- Ne produit pas de l'acétyl méthyl carbinol,
- N'utilise pas le citrate comme source unique de carbone.

Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du dénombrement des Coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'une öse bouclée dans tube contenant le milieu Schubert muni d'une cloche de Durham (voir figure III.11).

Chasser le gaz présent éventuellement dans les Cloches de Durham et bien mélanger le milieu et l'inoculum.

Incubation :

L'incubation se fait cette fois-ci au bain marie à 44°C pendant 24 heures.

Lecture :

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- Un dégagement gazeux
- Un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par Escherichia Coli après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovaks.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP en tenant compte du fait qu'Escherichia Coli est à la fois producteur de gaz et d'indole à 44°C

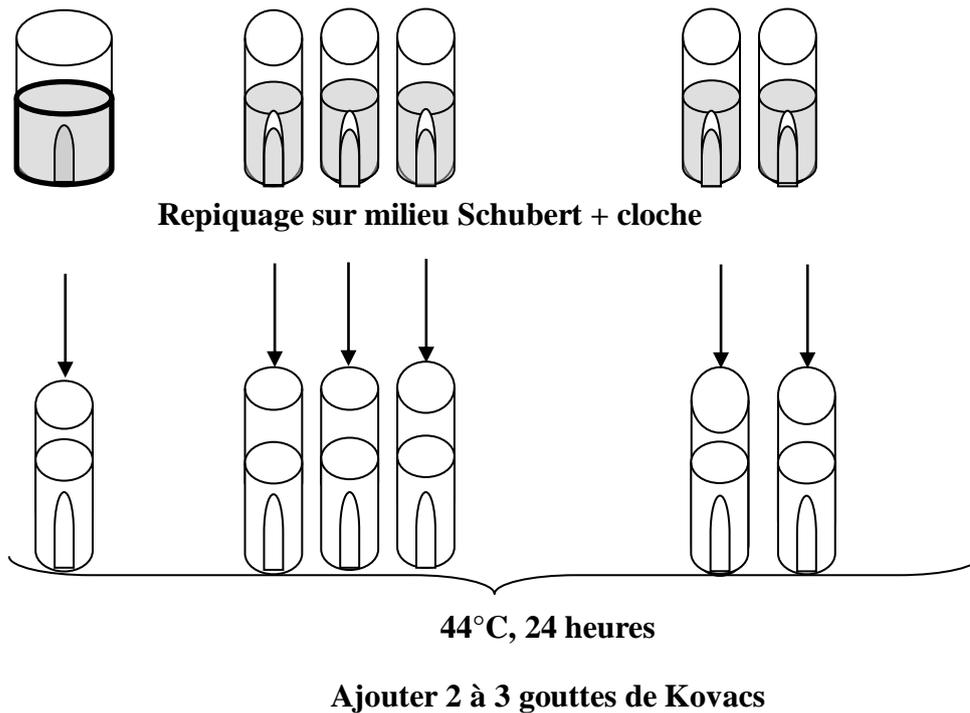


Figure III.11: Protocole de colimétrie (test de confirmation).

2) Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux en milieux liquides :

Les streptocoques (le genre Streptococcus) regroupent un vaste ensemble de bactéries ubiquitaires et qui comprend de nombreuses espèces. En raison de leur nombre, on distingue les espèces pathogènes des espèces commensales et saprophytes.

Tout comme la méthode de recherche des coliformes en milieu liquide, celle de la recherche et le dénombrement des Streptocoques fécaux fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

❖ **le test de présomption**

❖ **le test de confirmation** : réservé à la confirmation réelle des Streptocoques fécaux à partir des tubes positifs du test de présomption.

a) Test de présomption :

A partir de l'hydrolat :

- 50 ml dans un flacon contenant 50 ml de milieu ROTHE D/C,
- 5 fois 10 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu ROTHE D/C,
- 5 fois 1 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu ROTHE S/C.

Il faut bien mélanger le milieu.

Incubation :

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture :

Sont considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien, seulement ces derniers :

- Ne doivent en aucun cas faire l'objet de dénombrement
- Doivent par contre, absolument faire l'objet d'un repiquage sur milieu LITSKY EVA dans le but d'être confirmés.

b) Test de confirmation :

Le test de confirmation est basé sur la confirmation des Streptocoques fécaux éventuellement présents dans le test de présomption.

Les tubes de ROTHE trouvés positifs feront donc l'objet d'un repiquage à l'aide d'une öse bouclée dans tube contenant le milieu LITSKY EVA.

Il faut bien mélanger le milieu et l'inoculum.

Incubation :

L'incubation se fait cette fois-ci à 37°C, pendant 24 heures.

Lecture :

- Sont considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :
- Un trouble microbien

- Une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP qui figure en annexe 01.

III.3 Etude comparative de la crème BIO formulée et celle commercialisée (SOIN DEPIGMENTANT VENUS) :

La comparaison des deux types de cosmétiques (bio et conventionnelle) doit passer par la comparaison de leurs ingrédients, ainsi que certains paramètres.

III.4 Effet de la crème sur la peau :

Pour ce test nous avons appliqué la crème formulée sur un volontaire ayant une peau abimée de taches de rousseur.

CHAPITRE IV : Résultats et Discussions

IV.1 Résultats de l'huile essentielle des algues rouges :

IV.1.1 Extraction d'huile essentielle des algues rouges:

Plusieurs extractions par la méthode d'hydrodistillation ont été effectuées, mais vu que le rendement de l'huile essentielle a été très faible, il était nécessaire de recourir à une récupération de l'huile de l'hydrolat à l'aide d'un solvant organique, au début on a ajouté à notre hydrolat du chlorure de sodium (NaCl) on l'a laissé reposer puis on a rajouté notre solvant qui est l'éther d'éthylque, après on a éliminé le solvant à l'aide d'un rot à vapeur pour récupérer l'huile seule. C'était prévu que cette méthode va nous permettre d'augmenter la quantité extraite mais ce rendement était resté toujours assez faible. On aurait pu extraire plusieurs fois pour faire augmenter le rendement mais la pandémie du covid-19 nous a empêché de refaire l'extraction, donc il était plus convenable de formuler notre crème Bio à partir de l'hydrolat, sachant que ce dernier contient de l'huile essentielle des algues rouges.

Des études avaient montré, d'une part, l'influence de la technique d'extraction, et d'autre part, l'influence du cycle végétatif sur le rendement et la qualité de l'HE [74].

IV.2 Formulation et Caractérisation de la crème BIO anti taches :

IV.2.1 Formulation de la crème :

Le balayage de formulation va permettre de choisir parmi une vaste palette de variables de formulation celle sur laquelle on va jouer pour fabriquer une émulsion de type donné.

Nous pouvons le faire en changeant une seule variable ou n'importe quelle combinaison la mieux appropriée, de simplicité expérimentale ou de toute autre contrainte. Le balayage doit être unidimensionnelle, c'est-à-dire que toutes les variables doivent être maintenues constantes sauf une. Afin d'avoir une émulsion de type huile dans le rapport phase aqueuse (ϕ_A) / phase organique (ϕ_H) doit être égale ou supérieure à 1. Nous avons proposé trois rapports, $\phi_A / \phi_H = 50/50$, $\phi_A / \phi_H = 55/45$ et $\phi_A / \phi_H = 60/40$.

Le beurre de Karité et la cire d'abeille représentent une concentration $\leq 9\%$ du total de la phase huileuse (ϕ_H), et le reste de cette dernière est l'huile d'amande douce, cette dernière est maintenue constante pour des valeurs dépendant des résultats de balayage des autres variables, sur l'ensemble des formulations les quantités prises sont exprimées en masse.

Quant à la phase aqueuse, elle est composée essentiellement d'hydrolat avec lequel on mélange de la lécithine de Soja comme (TA) d'un pourcentage qui varie entre [1.2% -1.4%].

➤ **Formulation $\phi_H / \phi_A = 50/50$**

Nous avons réalisé un seul essai pour ce rapport, en raison de fabriquer 100g de crème, en prenant les proportions suivantes :

- **Phase organique**
 - ✓ Cire d'Abeille 4.5% ;
 - ✓ Beurre de Karité 4.5% ;
 - ✓ Huile d'amande douce 41% ;
- **Phase aqueuse**
 - ✓ Lécithine de Soja 1.2% ;
 - ✓ Hydrolat 48.8%.

L'essai a été réalisé avec un choc thermique, et la crème obtenue était stable.

Le but de notre travail dans un premier été alors d'obtenir une crème stable contenant le moins possible de la phase huileuse, pour cela, on s'est proposé d'étudier les rapports $\phi_A / \phi_H = 55/45$ et $\phi_A / \phi_H = 60/40$.

Pour chaque rapport alors que la quantité de la phase huileuse reste stable, les pourcentages de l'huile d'amande, du beurre de karité ainsi que cire d'abeille change. Pour la phase aqueuse dans le but d'avoir le minimum de tensioactif dans notre crème, une faible variation de la concentration en tensioactif a été effectuée (entre 1.2 % et 1.4%).

a) **Analyse physico-chimique :**

- **Évaluation de la stabilité :**

Les résultats de l'étude de la stabilité sont résumés sur les tableaux(IV.1) :

Tableau IV.1: Proportions et résultats de formulation de la crème 55/45.

| Essais | Phase Aqueuse (%) | Phase Organique (%) | HAD | C.A | B.K | T.A | Stabilité |
|--------|-------------------|---------------------|-----|------|------|------|-----------|
| 1 | 55 | 45 | 37% | 4% | 4% | 1.2% | Stable |
| 2 | 55 | 45 | 35% | 5% | 5% | 1.3% | Instable |
| 3 | 55 | 45 | 36% | 4% | 5% | 1.2% | Stable |
| 4 | 55 | 45 | 38% | 3% | 4% | 1.4% | Instable |
| 5 | 55 | 45 | 36% | 4.5% | 4.5% | 1.3% | Stable |

Tableau IV.2: Proportions et résultats de formulation de la crème 60/40.

| Essais | Phase Aqueuse (%) | Phase Organique (%) | HAD | C.A | B.K | T.A | Stabilité |
|--------|-------------------|---------------------|-----|-----|-----|------|-----------|
| 1' | 60 | 40 | 33% | 3% | 4% | 1.4% | Stable |
| 2' | 60 | 40 | 32% | 4% | 4% | 1.3% | Instable |
| 3' | 60 | 40 | 30% | 4% | 6% | 1.2% | Instable |
| 4' | 60 | 40 | 31% | 4% | 5% | 1.3% | Stable |
| 5' | 60 | 40 | 34% | 3% | 3% | 1.2% | Stable |

Les tests de stabilité ont été effectués avec une centrifugeuse afin d'accélérer la séparation des deux phases, les essais qui présentent une bonne stabilité sont repris sur le tableau (IV.3)

Tableau IV.3: Les formulations représentant les crèmes stables.

| Essais | Phase Aqueuse (%) | Phase Organique (%) | HAD | C.A | B.K | T.A |
|----------------------|-------------------|---------------------|-----|------|------|------|
| Rapport 55/45 | | | | | | |
| 1 | 55 | 45 | 37% | 4% | 4% | 1.2% |
| 3 | 55 | 45 | 36% | 4% | 5% | 1.2% |
| 5 | 55 | 45 | 36% | 4.5% | 4.5% | 1.3% |
| Rapport 60/40 | | | | | | |
| 1' | 60 | 40 | 33% | 3% | 4% | 1.4% |
| 4' | 60 | 40 | 31% | 4% | 5% | 1.3% |
| 5' | 60 | 40 | 34% | 3% | 3% | 1.2% |

On remarque que des crèmes stables ont été obtenue même à une concentration de 1.2 % en tensioactif , il a été noté que la formulation 5' a permis l'obtention d'une crème stable avec une diminution de la quantité de la phase huileuse et celle du tensioactif, si on tient compte de l'aspect économique (reconduction à l'échelle industrielle).

- **Homogénéité par microscopie optique :**

On remarque que les gouttelettes sont parfaitement dispersées.

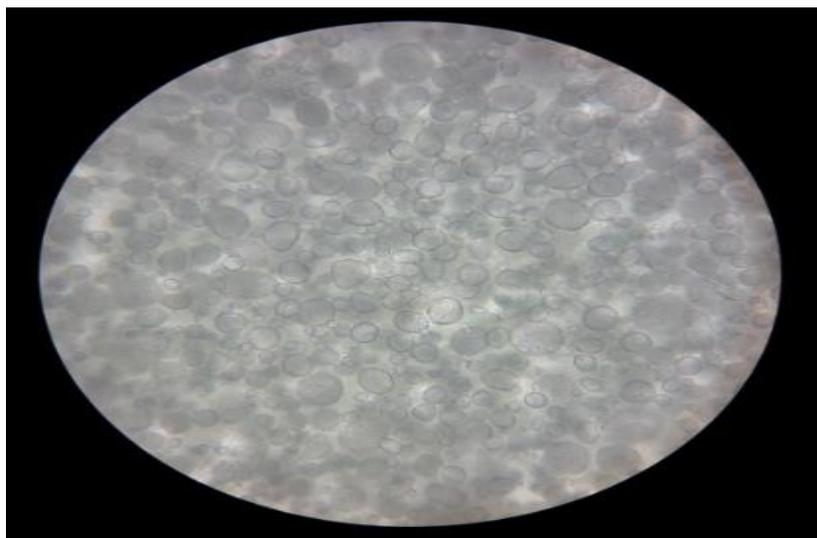


Figure IV.1: Observation microscopique :

- **Mesure du PH :**

Tableau IV.4 : les résultats de pH pour les crèmes stables

| Essais | Ph |
|--------------|----------|
| 55/45 | |
| 1 | 5.4 |
| 3 | Instable |
| 5 | 5.9 |
| 60/40 | |
| 1' | 5.7 |
| 4' | 5.8 |
| 5' | 5.6 |
| 50/50 | |
| 1 | 5.6 |

Les résultats obtenus permettent de voir clairement que les pH de certaines formulations stables obéissent aux normes 5,5 à 6, c'est-à-dire inférieures à 6 et supérieur à 5,5.

De ces formulations on s'est intéressé à celui qui contient le moins de cire d'abeille et le moins de tensioactif c'est la formulation 5'

- **Influence de l'aire :**

La crème formulé en absence de conservateur a été exposée à l'aire libre pendant une semaine. Dépassant cette durée, on constate l'absence de moisissure.

- **Influence de température :**

La crème a été mise dans une étuve pendant 3 jours, a une température de 37 °C. Après cette période aucune séparation de phase n'a été observée, ce qui confère à crème une qualité meilleur.

b) Analyse microbiologique:

➤ **Pour la crème :**

Un produit cosmétique doit avoir une qualité microbiologique contrôlée, Comme nous avons expliqué les étapes de cette analyse dans le chapitre III. Les analyses microbiologiques réalisées au laboratoire sont des indicateurs clés dans l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques.

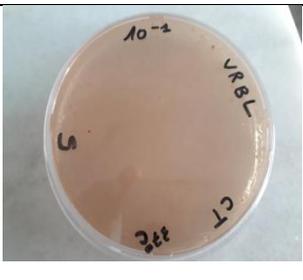
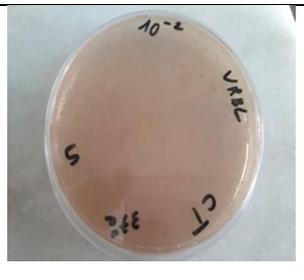
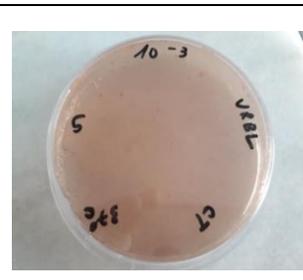
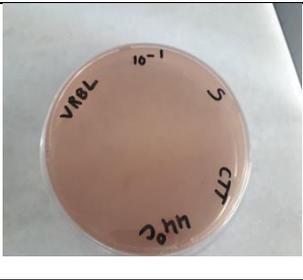
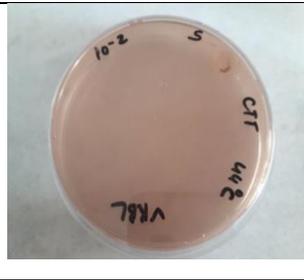
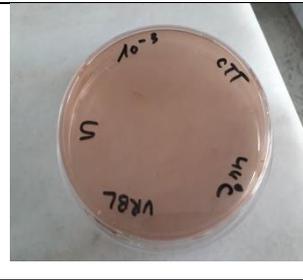
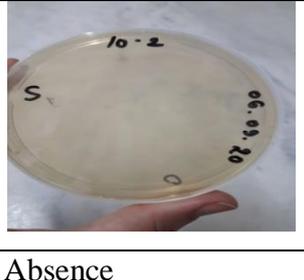
On utilise la formule mathématique (1)

$$N = \frac{\sum c}{V \text{ ml} * (n_1 + 0,1n_2) * d_1} \dots\dots\dots(1)$$

- N : Nombre d'UFC par gramme ou par ml de produit initial ;
- $\sum c$: Sommes des colonies des boîtes interprétables ;
- V ml : Volume de solution déposé (1 ml) ;
- n_1 : Nombre de boîtes considérées à la première dilution retenue ;
- n_2 : Nombre de boîtes considérées à la seconde dilution retenue ;
- d_1 : Facteur de la première dilution retenue.

Les résultats de l'analyse sont regroupés sur le tableau suivant :

Tableau IV.5: Analyse microbiologique de la crème formulée.

| Type de germe | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} |
|---|---|--|---|
| Des germes aérobies mésophiles totaux |  |  |  |
| | Absence | Absence | Absence |
| Coliformes totaux |  |  |  |
| | Absence | Absence | Absence |
| Coliformes fécaux |  |  |  |
| | Absence | Absence | Absence |
| Levures et moisissures |  |  |  |
| | 90.9 UFC/g de crème | Absence | Absence |

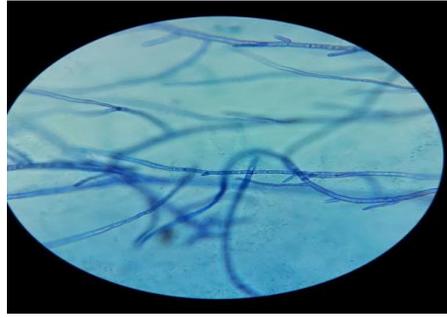


Figure IV.2: Observation microscopique de la moisissure trouvée.

L'analyse microbiologique révèle une absence des germes aérobies mésophiles totaux, coliformes totaux, coliformes fécaux et de champignons.

La crème formulée est conforme aux normes ISO (NF ISO 21149, - NF ISO 16212) qui limite les taux UFC (Unité Formant Colonie)/g. ainsi pour les bactéries aérobies mésophiles les taux limités doivent être < 100 UFC/g), alors que pour les moisissures et les levures (taux limite < 100 UFC/g). Cette conformité est aussi valable selon la norme algérienne (NA8282).

➤ **Pour l'hydrolat :**

❖ **Dénombrement des Coliformes :**

Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau IV.6: Dénombrement des coliformes.

| Germes | Coliformes totaux | | Coliformes fécaux | | |
|------------------|---------------------|------------------------|----------------------|--------|------------------------|
| | Test de présomption | Nombre Caractéristique | Test de confirmation | | Nombre Caractéristique |
| | | | Gaz | Indole | |
| 1 X 50 ml | + | 1 | + | + | 1 |
| 5 X 10 ml | + | 5 | + | + | 5 |
| | + | | + | + | |
| | + | | + | + | |
| | + | | + | + | |
| | + | | + | + | |
| 5 X 1 ml | + | 5 | + | + | 3 |
| | + | | + | + | |
| | + | | + | + | |
| | + | | - | - | |
| | + | | - | - | |

-Le nombre caractéristique est donc « 1 5 5 » ; ce qui correspond sur la table de Mac Grady au nombre 240.

-Le nombre caractéristique relatif au dénombrement des Coliformes fécaux est donc «1 5 3», ce qui correspond sur la table du NPP au chiffre 92

Les résultats finals sont :

| |
|--|
| 240 Coliformes totaux dans 100 ml d'hydrolat |
| 92 Coliformes fécaux dans 100 ml d'hydrolat |

Remarque :

- Etant donné que les Coliformes fécaux font partie des Coliformes totaux, il est pratiquement impossible de trouver plus de Coliformes fécaux que de Coliformes totaux.
- De plus, il faut prendre en considération la pandémie du covid-19 qui a influencé sur le stockage de notre hydrolat au niveau de laboratoire de l'université.

❖ **Dénombrement des Streptocoques fécaux :**

Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau IV.7: Dénombrement des Streptocoques fécaux

| Germes | Streptocoques fécaux | |
|-----------|----------------------|------------------------|
| | Test de présomption | Nombre Caractéristique |
| 1 X 50 ml | - | 0 |
| 5 X 10 ml | - | 0 |
| | - | |
| | - | |
| | - | |
| | - | |
| 5 X 1 ml | - | 0 |
| | - | |
| | - | |
| | - | |
| | - | |

Le nombre caractéristique relatif au dénombrement des Streptocoques fécaux est donc « 0 0 0 », ce qui correspond sur la table du NPP au chiffre < 1. Ce qui indique que l'hydrolat ne contient aucune germe de type Streptocoques fécaux.

IV.3. Etude comparative de la crème BIO formulée et celle commercialisée (SOIN DEPIGMENTANT VENUS) :

Les résultats de la comparaison sont regroupés dans les tableaux suivants :

Tableau IV.8: Composition d'une crème conventionnelle BIO, et celle formulée.

| | Crème bio élaborée | Crème bio commercialisée |
|------------------|--|--|
| Excipient | <p>Phase aqueuse : Hydrolat des algues rouges</p> <p>Phase huileuse : Cire d'abeille Beurre de karité Huile d'amande douce</p> <p>Émulsifiant : Lécithine de soja</p> | <p>Phase aqueuse : Eau</p> <p>Phase huileuse : Propylène glycol Cyclopentasiloxane Octocrylene Niacinamide</p> |

Tableau IV.9 : Comparaison des paramètres étudiés pour les deux crèmes.

| Paramètre | Crème élaborée | Crème de référence |
|------------------------------|--|--|
| PH | 5.6 | 5 |
| Analyse Microbiologie | Absence des aérobies totaux et des champignons | Absence des aérobies totaux et des champignons |

Les observations microscopiques de la crème de référence a permet de voir que la dispersion des gouttelettes et la taille sont homogènes. Les mêmes observations ont été constaté sur la crème formulée ce qui confirme que notre crème possède les même propriétés microscopiques que ceux existes dans le commerce . Voir figure IV.3.

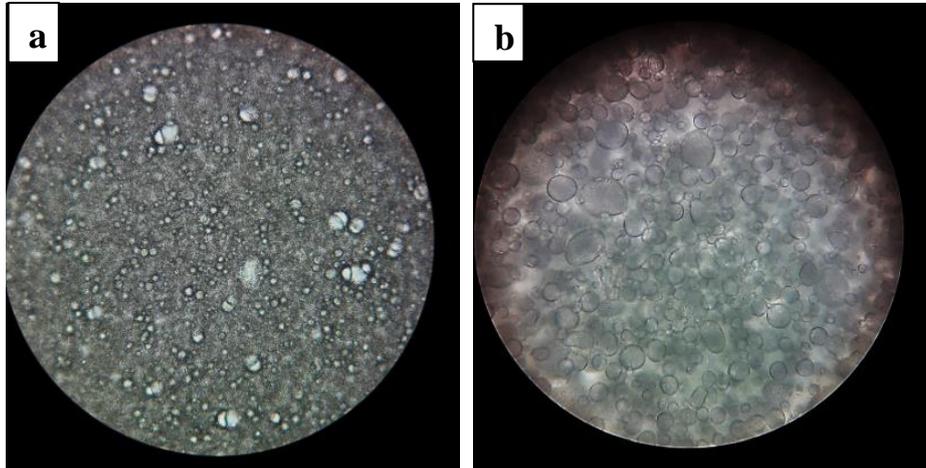


Figure IV.3: Observation microscopique : (a) crème de référence ; (b) crème élaborée.

IV.4 Effet de la crème sur la peau :

Afin de valoriser l'activité dépigmentante de la crème stable formulée, une application de cette crème a été réalisé sur un volontaire qui souffre de présence de taches de rousseur et ce pendant 04 jours. Les résultats après cette courte période d'essais sont les suivants:

- Aucune réponse désagréable, des irritations ou des effets secondaires n'ont été remarqués.
- Il été remarqué aussi que les taches commencent à s'alléger progressivement et certaines ont disparu.

De ce fait nous pouvons dire que notre crème ne présente aucun effet indésirable, et le résultat a été plutôt positif.



Figure IV.4 : Effet de la crème.

Conclusion Générale

Les algues rouges sont largement distribuées au niveau du littoral algérien, elles contiennent de l'huile essentielle qui possède des propriétés thérapeutiques pour la peau, cette huile est utilisée pour la formulation des crèmes cosmétique et dermique.

Le but précis de ce mémoire est de contribuer à la formulation d'une crème cosmétique bio anti taches de rousseur. Au départ l'idée directrice de notre étude a consisté à extraire l'huile essentielle par hydrodistillation, mais la pandémie du covid-19 nous a empêcher d'obtenir le rendement nécessaire pour la formulation de la crème, pour cela nos essais ont été effectués avec de l'hydrolat.

Pour atteindre notre objectif, nous avons réalisé une série de tests physico-chimique et microbiologique sur notre crème et sur l'hydrolat, on a pu montrer que :

- Nous avons obtenu des crèmes stables même avec une diminution de la quantité de la phase huileuse et celle du tensioactif ce qui a été prouvé dans la formulation N° 5 ' (CA : 3%, BK : 3%, HAD : 34%, TA : 1.2%) comme étant celle qui présente les meilleures critères.
- Les contrôles ont révélés une bonne stabilité et homogénéité de la crème, ainsi que le pH des crèmes stables obéit aux normes.
- Aucun changement de phases n'a été observé après un vieillissement forcé.
- les analyses antimicrobienne et antifongique de la crème ont été négatives, absence de tous les germes.
- Pour l'hydrolat, les analyses ont montrés une présence de coliformes totaux et fécaux qui sont le résultat d'un mauvais stockage. Avec l'absence totale des germes de type streptocoques fécaux.
- Une étude comparative avec une crème de référence « SOIN DEPIGMENTANT- VENUS » a montré que les paramètres physicochimique et microbiologique sont semblables à celle de la crème formulé.
- D'après l'application de la crème sur la peau d'un volontaire nous pouvons dire que cette dernière ne présente aucun effet indésirable et le résultat a été plutôt positif.

Références bibliographiques

- [1] **Diane Langlois**, (1994). Alimentation vivante, Aspects théoriques et pratiques 2^{ième} édition. p 47-53.
- [2] **Rivard Sirois, C**, (2005).
- [3] **MICHEL, C.**, 2000 : « Algues-opéron, Biologie Module 1, Diversité des algues et des plantes ». 20 p,
- [4] **Hillison, C.I.** (1977). Seaweeds, a color-coded, illustrated guide to common marine. Plants of east coast of the United States, Keystone Books. *The Pennsylvania State University Press*, p. 1–5.
- [5] **Wariaghli F., El Ghzaoui G. & Al Amouri M.**, 2004/2005. Les algues et leur intérêt en écotoxicologie. UFR: biodiversité du littoral marocain. Module: Ecotoxicologie. Université Mohamed V Faculté des sciences Rabat-Agdal. Wells E., Wilkinson M., Wood P. & Scanlan C., 2007. The use of macroalgal species richness and composition on intertidal rocky seashores in the assessment of ecological quality under the European Water Framework Directive. *Mar. Pollut. Bull.*, 55, 151-161
- [6] **Gayral P.** (1975). Les algues : morphologie, reproduction, écologie. Edition *Dion. Paris*. p 55-70.
- [7] **Reviere, B.** (2002). Biologie et phylogénie des algues. Édition par Belin ; *Paris : Sup de Belin*. p 352-353
- [8] **Garon lardiere.** (2004). Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales) : These de Doctorat. Université de Bretagne occidentale école doctorale des sciences de la matière, de l'information et du vivant : Spécialité : Chimie.
- [9] **Garon-Lardiere, S.** 2004 : Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales). Université De Bretagne Occidentale.
- [10] **LE GRANCHÉ Stéphane, LE GRANCHÉ Philippe, DUPRÉ Catherine** in : **DORIS**, 22/01/2017: *Sphaerococcus coronopifolius* Stackhouse, <https://doris.ffessm.fr/ref/specie/583>
- [11] **Gevaert F, Creach A, Davoult D, Kling R & Lemoine Y.** 2001 : Réponses des grandes algues marines *Laminaria saccharina* aux variations d'irradiance lors d'un

- cycle de marée simulé : photoinhibition et photoprotection (résultats préliminaires), *Journal de Recherche Océanographique*, 16(1-2) : 9–17
- [12] **Leclerc V., Floc’h J.-Y. 2010** : Les secrets des algues. *Carnets de sciences*, ISSN 2110-2228.
- [13] **Chopin, T. 1997** : Marine biodiversity monitoring. Protocol for monitoring of seaweeds. Environment Canada, Ecological monitoring and Assessment Network. Ottawa, 40p.
- [14] **Rorrer, G., L., Cheney, D.P. 2004** : Bioprocess engineering of cell and tissue cultures for marine seaweeds. *Aquacultural Engineering*.32, 11-41
- [15] **Praud, A. 1994** : Isolement, caractérisation structurale et analyse de nouveaux métabolites d’algues méditerranéennes appartenant aux genres *Cystoseira* et *Lyngbiya*. Thèse. Doc. Sien.Spectro. physico-Chimie Structurale. Univ. Aix-Marseille 1, France, 186p.
- [16] **Marfaing, H. 2004** : Les algues dans notre alimentation : Intérêt nutritionnel et utilisations. *Revue de nutrition pratique*. Dietecom Bretagne.CEVA. 1-9.
- [17] **Sauvageau C., 1920**. Utilisation des algues marines. *Ed. Doin*, Paris, 390p.
- [18] **Milton R.F., 1961**. Liquid seaweed as fertilizer. *Proc.4th Internat. Seaweed. Symp.*, 428-431.
- [19] **Naegele E & Nagele A., 1961**. Que sais-je sur les algues. Presses universitaires de France.N° 91
- [20] **Cohen.,I., Neori, A. 1991** : *Ulva lactuca* biofilters for marine fish pond effluents. Ammonia uptake Kinetics and nitrogen content. *Bot.Mar.*34, 475-482.
- [21] **Guist, G.G ; Humm, J.J. 1976** : Effect of sewage effluent on growth of *Ulva lactuca* *Florida Sci.*, 39,267-271.
- [22] **Beuchet P. (2007)**. Influence des nitrates, de la salinité et du stress lumineux sur la teneur en acides gras et en β -carotène de *dunaliella salina*, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **146** : 235-250.
- [23] **Ulf Karsten, Kevin D. Barrow, Anlka S. Mostaert and Robert J. King. (1995)**. The Osmotic Significance of the Heteroside Floridoside in the Mangrove Alga *Catenella nipae* (Rhodophyta: Gigartinales) in *Eastern Australia Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **40**, 239-247

- [24] **Roussi, S.** (2006). Etude de la signalisation cellulaire de l'apoptose induite par 7 β -hydroxystrol dans les cellules cancéreuses coliques humaines. *Thèse de Doctora*. Université de Strasbourg. Spécialité : Aspects Moléculaire et Cellulaires de la Biologie p 678.
- [25] **Nianjun Xu, Xiao Fan, Xiaojun Yan, Xiancui Li, Rongli Niu and Tseng C. K.** (2002). Antibacterial bromophenols from the marine red alga *Rhodomela confervoides*. *Phytochemistry*, **62**, 1221–1224.
- [26] **Matteo Francavilla, Pasquale Trotta, and Rafael Luque.** (2010). Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application *Bioresource Technology* **101**, 4144–4150
- [27] **Gayral P. et Cosson J.**, « Connaître et reconnaître les algues marines ». Édition Ouest France, 1986.
- [28] **Becker, E.W.** (1994). Microalgae biotechnology and microbiology. University Press, Cambridge, p 293.
- [29] **Rossana Aguiar Cordeiro, Valdirene Moreira Gomes, Ana Fontenele Urano Carvalho and Vânia Maria Maciel Melo.** (2006). Effect of Proteins from the Red Seaweed *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux on the Growth of Human Pathogen Yeasts, *Printed in Brazil*. **49/ 6**, 915-921
- [30] **Biosvert.** (1988). Les jardins de la mer du bon usage des algues. Edition. Terre vivant. Parise. p 149.
- [31] **Mac Artain P, Gill CIR, Brooks M, Campbell R. and Rowland IR.** (2007). Valeur nutritive des algues comestibles. *La nutrition passe en revue*, **65**, 535
- [32] **AFNOR**, « Huiles essentielles », Recueil de normes Françaises, 3^{ème} édition, AFNOR, Paris, 1989.
- [33] **Bruneton J.** « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales », 2^{ème} édition Tec & Doc, Paris, France, 1999.
- [34] **Dorman H.J.D & Deans S.G.**, “Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils”, *journal of applied microbiology*, **88**, 2000, 308-316.
- [35] **Benayad N. (2008)** :les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines :moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées . Projet de recherche .Université Mohamed V-Agdal . Laboratoire des Substances Naturelles et Thermolyse Eclair . Département de Chimie. Faculté des Sciences de Rabat . P 61

- [36] **Faye O., Lo M., Gaye O.(1997)** : Connaissances et circuits thérapeutiques relatifs au paludisme en zone rurale Sénégalaise. Médecine tropicale P 57 ; 161-164 .
- [37] **Eisenhut M. (2007)** - The toxicity of essential oils, article in presse, International Journal of Infectious Diseases. 11(4): 365.
- [38] **El Kolli M. (2008)** – Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Athemis pedunculata* Desp., d'*Athemis punctata* Vahl. et de *Daucus crinitus* Desf. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- [39] **Kaloustian J, Hadji-Minaglo F** : La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie. Paris. Edition Springer. 2012
- [40] **Franchrome P , Jollois R, Pénoel D.** L'aromathérapie exactement : encyclopédie de l'utilisation des extraits aromatiques. Paris : Edition Roger Jollois. 2001.
- [41] **Bruneton J. (1999)** - Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- [42] **Courtial S.** précis d'aromathérapie vétérinaire à l'usage des pharmaciens d'officine [thèse].
- [43] **Biotechnologie végétale.** Les huiles essentielles[en ligne]. 2012 [consulté en Janvier 2018]. Disponible sur [http : mira biotéchnologievégétale.blogspot.com](http://mira.biotéchnologievégétale.blogspot.com)
- [44] **Kaloustian J, Hadji-Minaglo F.** La connaissance des huiles
- [45] **Jammaledine M.** Extraction et caractérisation de la composition des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et *Juniperus oxycedrus* du Moyen Atlas [Mémoire]. Université sidi mohammed ben abdellah. Fès, 2010
- [46] **Fekih N.** Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *Pinus* poussant en Algérie [thèse].Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid. 2015.
- [47] **Chouiteh O.** composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra* [thèse] Oran : Université d'Oran 2012.
- [48] **Fekih N.** Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *Pinus* poussant en Algérie [thèse].Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid. 2015.

- [49] **Elhaib A.** Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformation catalytique [thèse] Toulouse : Université de Toulouse. 2011.
- [50] **Lardry J-M, Haberkorn V.** L'aromathérapie et les huiles essentielles. Kinesither Rev 2007; 61 : 14-7.
- [51] **Iserin P.** Encyclopédie des plantes médicinales 2^{ème} édition. Paris: Larousse. Edition 2001.
- [52] **Chabrier J-Y.** Plantes Médicinales et Formes d'utilisation en phytothérapie. [Thèse] Université Henri Poincare-Nancy. 2010
- [53] **Muther L.** Utilisation des huiles essentielles chez l'enfant [thèse].Faculté de pharmacie de Clermont Ferrand, 2015
- [54]**Catherine Baures, Sonia Bedda, Emilie Garderes, Lucie Moreau,Melanie Raulot, 2009 :** Les cosmétiques biologiques à la loupe « Entrez dans l'univers des controverses actuelles, des labels et de la réglementation ». Mastère Management des Industries de Santé, P 6-24.
- [55]**Emilie Lebreton, 2014 :** plantes à usage cutané chez l'enfant. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Joseph Fourier. P 6.
- [56]**Julie Bourdais, 2009 :** Les cosmétiques écologiques et biologiques. Thèse de doctorat N°8, université de NANTES. Page 13-17.
- [57]. **Martini, Marie-Claude.** Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie. Paris: Editions médicales internationales, 2003. 401p.
- [58]. **Felton L.** Remington. Essentials of pharmaceutics.Philadelphia. Pharmaceutical press; 2013. p.448- 449.
- [59] **Carole BARUS.** Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et biphasique - Application aux produits dermocosmétiques. Thèse En vue de l'obtention du Doctorat de L'université de TOULOUSE. Paul Sabatier. 2008.
- [60]. **Doumeix, O.** Opérations Unitaires En Génie Biologique. Tome 1: Les Émulsions. CRDP d'Aquitaine. 2011.
- [61]. **Nadine Pierat.** préparations d'emulsions par inversion de phase induite par agitation. Thèse de Doctorat. Universite Henri Poincare - Nancy 1. 2010. p.7.

- [62]. **Bhandari, B.R., Dumoulin, E. et H. Richard.** Techniques de préparation d'arômes élaborés (chapitre 7) dans Les arômes alimentaires, Éd. Lavoisier, Paris, 1992. 438p.
- [63]. **Anisha Agrawal, Sunisha Kulkarni, Shyam Bihari Sharma.** Recent advancements and applications of multiple emulsions. School of Studies in Pharmaceutical Sciences, Jiwaji University, Gwalior, Madhya Pradesh, India. International Journal of Advances in Pharmaceutics. 2015.
- [64]. **Rachid Denine. Professeur.** Cours de pharmacie galénique .Office des publications universitaires. 2008. p.149.
- [65]. **Brochette P. Emulsification :** Elaboration et étude des émulsions. Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés. 1999. J2150 : 1-18.
- [66]. **Denine . R; Ghanassi. F ; Boudendouna . H ; Nouas . M, Dgeraba . S.** Cours de pharmacie galénique ; Université d'Alger ; département de pharmacie Faculté de médecine ; 2002.
- [67]. **Tharwat F. Tadros.** Emulsion Science and Technology. Industrial Applications of Emulsions: A General Introduction. 2009. p. 2-3.
- [68]. **LE HIR A.** Pharmacie Galénique : Bonnes Pratiques de Fabrication des médicaments.9e édition. Paris : Masson, 2009. P.151.
- [69]. **Shinoda, K. & Arai, H.** The Correlation between Phase Inversion Temperature in Emulsion and Cloud Point in Solution of Nonionic Emulsifier. The Journal of Physical Chemistry, 68. 1964. 3485–3490.
- [70] **Rieger, M. & Rhein, L.D.** Surfactants in Cosmetics. 1997.
- [71] **Ariyaprakai, S, S.R. Dungan.** Influence of surfactant structure on the contribution of micelles to Ostwald ripening in oilin- water emulsions. Journal of Colloid and Interface Science. 2010, 343, 102-108.
- [72] **Rosen . M. J. Livre .** Surfactants and interfacial Phenomena. Third Edition. Editions Wiley-Interscience. 2004.
- [73]. **Larpent C. Tensioactifs.** Techniques de l'ingénieur, traité constantes physicochimiques. 1995. K342: 1-14.
- [74] **GOMES PB, MATA VG, RODRIGUES AE.** « Characterization of Portuguese grown geranium oil (Pelargonium sp) ». J. Essent. OilRes. 16 (2004) 490–495].

Table NPP

| 1 X 50 ml | 5 X 10 ml | 5 X 1 ml | Nombre caractéristique | Limites de confiance | |
|-----------|-----------|----------|---------------------------|----------------------|------------|
| | | | | Inférieure | Supérieure |
| 0 | 0 | 0 | <1 | | |
| 0 | 0 | 1 | 1 | <0,5 | 4 |
| 0 | 0 | 2 | 2 | <0,5 | 6 |
| 0 | 1 | 0 | 1 | <0,5 | 4 |
| 0 | 1 | 1 | 2 | <0,5 | 6 |
| 0 | 1 | 2 | 3 | <0,5 | 8 |
| 0 | 2 | 0 | 2 | <0,5 | 6 |
| 0 | 2 | 1 | 3 | <0,5 | 8 |
| 0 | 2 | 2 | 4 | <0,5 | 11 |
| 0 | 3 | 0 | 3 | <0,5 | 8 |
| 0 | 3 | 1 | 5 | <0,5 | 13 |
| 0 | 4 | 0 | 5 | <0,5 | 13 |
| 1 | 0 | 0 | 1 | <0,5 | 4 |
| 1 | 0 | 1 | 3 | <0,5 | 8 |
| 1 | 0 | 2 | 4 | <0,5 | 11 |
| 1 | 0 | 3 | 6 | <0,5 | 15 |
| 1 | 1 | 0 | 3 | <0,5 | 8 |
| 1 | 1 | 1 | 5 | <0,5 | 13 |
| 1 | 1 | 2 | 7 | 1 | 17 |
| 1 | 1 | 3 | 9 | 2 | 21 |
| 1 | 2 | 0 | 5 | <0,5 | 13 |
| 1 | 2 | 1 | 7 | 1 | 17 |
| 1 | 2 | 2 | 10 | 3 | 23 |
| 1 | 2 | 3 | 12 | 3 | 28 |
| 1 | 3 | 0 | 8 | 2 | 19 |
| 1 | 3 | 1 | 11 | 3 | 26 |
| 1 | 3 | 2 | 14 | 4 | 34 |
| 1 | 3 | 3 | 18 | 5 | 53 |
| 1 | 3 | 4 | 21 | 6 | 66 |
| 1 | 4 | 0 | 13 | 4 | 31 |
| 1 | 4 | 1 | 17 | 5 | 47 |
| 1 | 4 | 2 | 22 | 7 | 59 |
| 1 | 4 | 3 | 28 | 9 | 85 |
| 1 | 4 | 4 | 35 | 12 | 100 |
| 1 | 4 | 5 | 43 | 15 | 120 |
| 1 | 5 | 0 | 24 | 8 | 75 |
| 1 | 5 | 1 | 35 | 12 | 100 |
| 1 | 5 | 2 | 54 | 18 | 140 |
| 1 | 5 | 3 | 92 | 27 | 220 |
| 1 | 5 | 4 | 160 | 39 | 450 |
| 1 | 5 | 5 | >240 | | |