

1930 =
30244

OEL 01730

E800-ROE-R

DÉPARTEMENT ENVIRONNEMENTAL
LITORAL ET GESTION DU MILIEU
MARIN

F

Contrat I F R E M E R 24/7708

S A R G A S S U M
M U T I C U M

AOUT 1986

Laboratoire de Cosmétologie
et de Pharmacie Industrielle
Professeur Y. De Roeck Holtzhauer

68 Boulevard Eugène Orioux 44000 NANTES
(tel. 40 74 23 22)

Contrat I F R E M E R

S A R G A S S U M
M U T I C U M

AOUT 1986

Laboratoire de Cosmétologie
et de Pharmacie Industrielle
Professeur Y. De Roeck Holtzhauer

68 Boulevard Eugène Orioux 44000 NANTES
(tel. 40 74 23 22)

P L A N
 =:~::~=:

INTRODUCTION - GENERALITES	SUR SARGASSUM MUTICUM	_____	2
I - <u>EXTRACTION DES VITAMINES</u> :		_____	11
- Recherche bibliographique			
- Description des protocoles :			
- vitamines liposolubles			
- vitamines hydrosolubles			
pour chaque :	- justification		
	- schéma du dosage		
	- manipulation		
	- description de l'extrait		
	- identification par Chromatographie		
	en Couche Mince		
II - <u>DOSAGE DES VITAMINES</u> :		_____	33
1) Recherche bibliographique			
2) Appareillage :	- schéma		
	- utilisation		
3) Conditions opératoires pour chaque vitamine			
4) Courbes			
5) Résultats :	- tableaux des calculs		
	- conclusion pour chaque vitamine		
6) Conclusion et projets de recherches			
III - <u>ESSAIS D'EFFICACITE BACTERIOSTATIQUE</u>		_____	200
IV - <u>SCREENING COSMETIQUE</u>		_____	202
<u>CONCLUSION GENERALE</u>		_____	245
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>		_____	247

INTRODUCTION

Une quinzaine d'algues environ sur les 2 000 connues sont utilisées à ce jour en applications cutanées, que ce soit en Cosmétologie ou en Thalassothérapie. Le plus généralement, sous forme d'extraits d'algues, type alginates ou carraghénanes, ou de bouillies d'algues mélangées employées en application locale, en massage ou sous forme de crèmes ou de masques.

Avec ainsi trois types d'application :

- algue excipient permettant la réalisation de gels aqueux,
- algue en thalassothérapie,
- algue en cosmétologie.

Le laboratoire de Cosmétologie et de Pharmacie Industrielle de l'Université de Nantes s'est donné pour tâche depuis sa création en 1972, de valoriser l'utilisation thérapeutique ou cosmétique des algues spécifiques, donc d'étudier algue par algue les applications possibles dans le domaine cutané ou muqueux.

- Prise d'un brevet en 1975 sur la carraghénine issue de *Chondrus crispus* en thérapeutique bucco-dentaire :

brevet français
brevet américain.

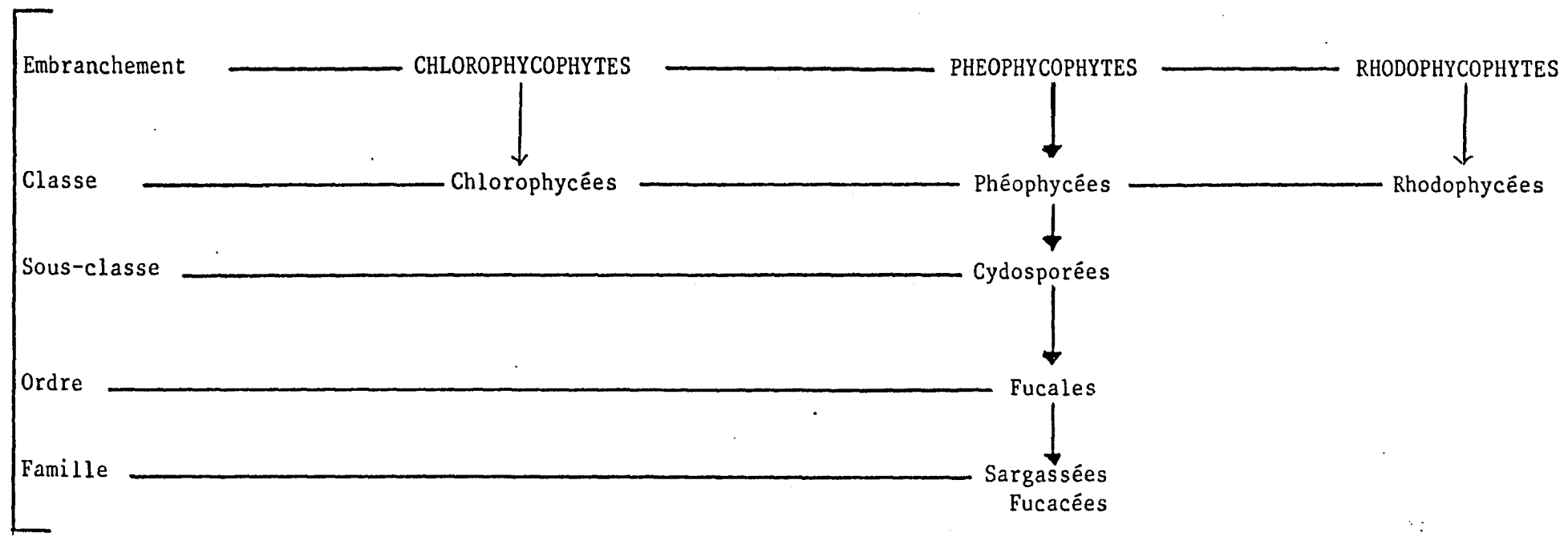
- Etude de *Delesseria sanguinea*, en collaboration avec l'IFREMER de Brest, la Faculté de Rennes et les laboratoires GOEMAR : travail de D.E.A. de Mme Ch. BAUDRY : *Delesseria sanguinea*, travaux de recherche, réalisation et conception d'une crème contre les jambes lourdes.

- Analyse du phytoplancton de l'Ile de Ré : travail de recherche de Diplôme de Cosmétologie.

- Mise au point d'une batterie de tests permettant de juger de l'efficacité d'une crème cosmétique sur l'évolution de l'état de surface cutanée, de façon à réaliser un véritable screening cosmétique de tout produit nouveau à utiliser comme principe actif, d'origine végétale ou algale, ceci figurant dans la quatrième partie de notre dossier.

<p>Dans le cadre de ces recherches, l'IFREMER nous a confié une étude sur <i>Sargassum muticum</i> comprenant l'analyse des vitamines sur un cycle complet de végétation, et une recherche des potentialités cosmétiques de cette algue.</p>
--

SITUATION BOTANIQUE DES SARGASSES



I - DENOMINATION - NOMENCLATURE :

L'espèce se nomme actuellement SARGASSUM MUTICUM (Yendo) FENSHOLT, car décrite par Yendo en 1907 pour le genre, et par Fensholt en 1947, qui en a défini l'espèce.

Elle appartient à la famille des Sargassées, de l'ordre des Fucales, de la sous-classe Cyclosporées, de la classe des Phéophycées.

II - HISTORIQUE :

Nous rappellerons brièvement l'historique de son expansion, compte tenu du nombre d'ouvrages détaillés qui s'y réfèrent déjà.

Cette algue, d'origine japonaise, a envahi les côtes américaines vers 1940 et les côtes européennes dès 1973. Tous les algologues s'accordent actuellement pour penser que l'origine de ce développement est dû à l'importation ostréicole de naissain japonais ; pour remplacer les huîtres dites portugaises atteintes d'une maladie, les parcs ont été repeuplés artificiellement par des huîtres japonaises, Croissistera Giga, sur lesquelles Sargassum muticum était implantée au niveau des coquilles.

En Europe, Sargassum a d'abord envahi le sud de l'Angleterre (l'île de Wight) puis a traversé la Manche. Elle est arrivée en France vers 1975 et a progressé le long de nos côtes, tant par l'est que le nord, envahissant la Normandie, puis les Pays-Bas ou vers l'ouest sur la baie de Morlaix dès 1981.

On l'a repérée dès 1983 dans la baie d'Etel (Morbihan), puis dans le golfe du Morbihan en 1983. On la trouvait dans la baie de Bourgneuf, au sud de la Loire, en 1984, puis en 1985 sur les côtes basques en points isolés. Parallèlement, on retrouve des Sargasses en Méditerranée de part et d'autre de l'étang de Thau, point de départ de l'installation méditerranéenne.

Il est à noter que cet envahissement n'est pas linéaire, en ce sens qu'il n'envahit pas l'ensemble des côtes mais parallèlement, on trouve çà et là des surfaces couvertes par Sargassum muticum, surfaces localement très délimitées, puis se rejoignant.

Il semblerait en outre que l'expansion commence par d'énormes masses flottantes non fixées allant au grè des courants, avant de se fixer définitivement dans un lieu qu'elles envahissent alors parfaitement.

III - CYCLE ECOPHYSIOLOGIQUE :

L'algue présente une forme réduite en hiver avec un pied court et peu de ramures.

Puis les rameaux s'allongent au printemps pour donner un large thalle flottant présentant une certaine ressemblance avec les végétaux supérieurs : elle possède en effet des organes foliacés avec parfois des pseudonervures.

En été, la plante atteint sa grandeur optimale, le thalle pouvant mesurer jusqu'à douze mètres. L'algue porte alors sur ses pieds fertiles des aérocytes pédicellés et des réceptacles reproducteurs : après fusion des gamètes, les embryons sont libérés et flottent sur l'eau où ils dérivent au gré des courants et marées. On voit ainsi arriver au flot et repartir au jusant d'immenses plaques brunes-pourpres constituées de filaments et de milliers de petites boules flottantes. C'est ainsi que Y. et H. DE ROECK ont pu décrire à Bréhat, sur la laise de haute mer, un ruban de 30 cm de large et de plusieurs centaines de mètres de long de ces éléments isolés après forte marée, constituant autant de futures algues.

Après la libération des organes fertiles, la plante dégénère, en perdant la plus grande partie de son thalle qui se décompose. *Sargassum muticum* prend alors sa forme hivernale : courte et buissonnante, jusqu'au printemps suivant.

Sa localisation de fixation principale est au niveau moyen des basses mers de vives eaux, car l'algue craint les longues périodes de déshydratation, contrairement à d'autres fucales.

Enfin, on a constaté que le développement du thalle était en relation avec plusieurs facteurs naturels :

- la salinité : pouvant aller de 24 ‰ à 35‰. avec un optimal à 30-35‰.
- la longueur des jours, maximale en juin.
- la température, 7°-30°C avec une préférence pour les eaux entre 25 et 30°.

La libération des organes fertiles étant, pour sa part, vraisemblablement en relation avec les cycles lunaires.

Cette brève étude écophysiological montre de la part de *Sargassum muticum* une remarquable adaptation aux conditions extérieures.

IV - LA SARGASSE : UN PROBLEME ECOLOGIQUE :

Outre cette remarquable faculté d'adaptation, *Sargassum muticum* a pour elle, les qualités qui font de cette algue, l'"envahisseur type".

- Les embryons possèdent déjà des rhizoïdes et se fixent rapidement dès leur libération du thalle.

- Une jeune sargasse est fertile en trois mois et peut même libérer des organes reproducteurs (fécondation extérieure à la plante).

- Elle se fixe sur les coques mobiles, d'où une possibilité de dessémination au long cours.

- Et surtout, des rameaux de sargasses détachés flottent emportés par les courants, vivant et se reproduisant pendant plus de trois mois après leur rupture avec la plante mère.

Tout ceci explique l'invasion rapide de la plante depuis son arrivée sur les côtes occidentales : elle a su adapter ses conditions de vie japonaise à nos eaux, et se reproduire beaucoup plus efficacement que les algues indigènes.

L'invasion de *Sargassum muticum* est gênante par trois aspects :

- elle limite les chances de survie des autres algues et des éléments préexistants du milieu (aspect écologique) ;
- elle gêne le développement et le ramassage des huîtres dans les parcs (aspect ostréicole) ;
- elle paralyse la navigation cotière dans les étiers, abers et ports qu'elle a envahis (marine marchande).

Pour toutes ces raisons, on a recherché à la détruire.

Or, toutes les tentatives d'éradication ont échoué à ce jour.

Les arrachages manuels ou mécaniques n'ont pas réussi à éliminer l'algue dans les localisations où l'expérience a été tentée alors que le moindre rameau arraché et non ramassé favorise l'extension de l'algue dans les régions avoisinantes.

Tous les herbicides utilisés ne se sont révélés efficaces qu'à des concentrations toxiques pour le milieu. Par ailleurs, toutes les expériences locales tentées telles que incinérations, adifications, plongées dans l'eau douce ont finalement échoué .

Devant cet échec des moyens d'éradication et l'invasion progressive de *Sargassum muticum*, apparue en France en 1975, le long de nos côtes, des démarches de valorisation de l'algue ont été tentées.

V - LA SARGASSE : SON ETUDE CHIMIQUE EN VUE D'UNE EXPLOITATION :

Outre des études écologiques faites pour comprendre et tenter de contrôler ce développement invasif et anarchique, des études chimiques sont actuellement en cours :

- une étude sur les possibilités d'extraction des alginates à partir de *Sargassum muticum* a été effectuée : - Sobalg
- Goëmar.
- des réalisations de compostages de l'algue avec du lizier de porc et des déchets de bois de forêt sont réalisés : Quatre-Vaux
Pleubian
- des essais de screening pharmacologique sont effectués à Montpellier : Professeur Girard,
- dans le cadre de ce contrat IFREMER, le but de notre recherche est de connaître les concentrations des principales vitamines hydro et liposolubles de l'algue au cours de l'année : et ce, dans un double but :

- dans un but écologique :

Pour mieux situer les variations chimiques de la composition de l'algue au cours de l'année et chercher une éventuelle corrélation si elle existe, entre ces variations et son cycle écophysio-logique.

- dans un but de valorisation à visée cosmétologique ou thalasso-thérapeutique : on rappellera ultérieurement le rôle des vitamines dans les extraits utilisés dans ce domaine.

VI - LES METHODES DE COLLECTE ET DE CRYOBROYAGE :

Le laboratoire qui s'est chargé de cette recherche se situe à Nantes, donc dans une région où l'implantation de *Sargassum muticum* n'est pas encore bien établie. En effet, les deux plus proches foyers de l'algue sont respectivement la baie de Bourgneuf et le golfe du Morbihan. Et nos collecteurs ont constaté qu'à ces endroits, on trouvait le plus souvent l'algue sous forme d'immenses masses flottantes plutôt que dans des zones de fixation. Ceci a rendu la collecte régionale difficile.

Aussi, la plus grande partie de notre approvisionnement provient-elle de : Pleubian
Saint-Malo
Bréhat.

Nous remercions encore nos collecteurs à cette occasion : Monsieur BRAULT de Pleubian
Monsieur ARBONA de Saint-Malo
Monsieur et Madame H. DE ROECK pour Bréhat

Le laboratoire s'est attaché à cette idée de pluralité d'approvisionnement :

- il permettait de connaître les variations éventuelles de concentration de vitamines suivant la localisation (et ces variations ne sont pas notables) ;
- il permettait de mieux randomiser l'échantillonnage à des fins statistiques.

Nous avons choisi des origines caractéristiques chaque mois :

- Pleubian : mai 1985
juin 1985
- Bréhat : juillet 1985
- Morbihan : août 1985
septembre 1985
- Saint-Malo : octobre 1985
- Bouin : janvier 1986
- Morbihan : janvier 1986.

Les algues collectées étaient, soit congelées sur place (Pleubian), soit rapidement transportées à Nantes, en boîte de polyester étanche pour éviter la déshydratation ou même en cuve d'eau de mer, et immédiatement broyées sous azote liquide.

Plusieurs techniques de broyage ont été expérimentées dont une seule a été retenue.

Trois techniques différentes par broyeurs à hélice ont échoué. En effet, Sargassum muticum présente une remarquable résistance à la coupe et une élasticité qui avaient pour conséquence de voir l'algue s'enrouler autour des hélices sans être sectionnée et ce, quelque soit la température (20°, 0°, -160° par jet d'azote liquide dans le réceptacle de broyage) et le type de broyeur.

La technique finalement retenue est celle du broyeur à maillet : l'algue a été écrasée avec un maillet en bois contre un tamis de maille équivalente à celles d'une toile métallique et ce dans une enceinte isotherme en polyester devant un jet intermittent d'azote liquide (2 secondes toutes les 30 secondes).

Cette technique a permis d'isoler deux résidus :

- une fine poudre d'algue constituée de brisure de rameaux du thalle, de vésicules reproductrices et d'acrocytes mélangées à de fins cristaux de glace de condensation ;

- un résidu ne passant pas au tamis, constitué des principaux axes du thalle brisé et de glace.

Les deux formes de l'algue isolées ont été stockées au congélateur à -18°C.

La division du broyage correspondant à peu près à une distinction botanique (axes principaux du thalle / organes pseudofoliacés et acrocystes), il nous a paru intéressant de faire des dosages séparés pour chacun des résidus.

Sur cette page, se trouve un tableau résumant les origines, les dates de collectes et les formes de broyage : à chaque échantillon a été attribué un numéro qui restera le même, quelles que soient les méthodes d'extraction et de dosage des vitamines.

ORIGINE	DATE DE LA RECOLTE	RESIDUS DE BROYAGE	POUDRE FINE	NUMERO D'IDENTIFICATION
Pleubian	mai 1985	X		2
			X	1
Pleubian	juin 1985	X		4
			X	3
Bréhat	juillet 1985		X	5
		X		6
Morbihan	août 1985		X	7
		X		8
Morbihan	septembre 1985		X	9
		X		10
Saint-Malo	octobre 1985		X	11 *
Bouin	octobre 1985		X	12 *
	novembre 1985			**
	décembre 1985			**
Bouin	janvier 1986		X	13 *
Morbihan	février 1986		X	14 *

Remarques : * les algues ont été broyées dans leur totalité. Il n'y a pas eu de résidus de broyage.

** aux mois de novembre et décembre 1985, il n'y a pas eu d'approvisionnement d'algues

Enfin, des équivalences poids sec / poids humide ont été effectuées, non entre l'algue fraîche et l'algue sèche proprement dites (vu l'éloignement des sources d'approvisionnement), mais entre l'algue cryobroyée (forme résiduelle et forme poudre) et l'algue desséchée après passage à l'étuve à 105°C jusqu'à poids constant.

Notre équipe a choisi ce mode d'expression bien que consciente du moyen drastique de déshydratation : cet assèchement est apparu la seule technique pour exprimer tous les résultats à la même référence de base.

Le tableau suivant donne les équivalences : poids cryobroyé - poids sec .

Les variations enregistrées s'expliquent, d'une part par les différences de concentration en cristaux de glace (poudre/résidu) et par le fait que le cryobroyage était quelquefois fait sur place (origine différente).

NUMERO D'ECHAN- TILLON	POIDS CRYOBROYES	POIDS SECS	% DE POIDS SEC
1	13,00 g	1,88g	14,5
2	25,00 g	3,00g	12
3	20,11 g	2,94 g	14,7
4	15,00 g	2,5 g	16,7
5	23,00 g	3,4 g	14,7
6	17,17 g	3,4 g	19,8
7	21,67 g	3,14 g	14,5
8	18,00 g	2,8 g	15,5
9	20,00 g	2,6 g	13,
10	19,80 g	3,00 g	15,15
11	10,00 g	1,70 g	17
12	10,00 g	1,68 g	16,8
13	10,00 g	0,80 g	8,10
14	10,00 g	1,63 g	16,3
Algue fraîche	10,00 g	0,80 g	8

I - EXTRACTION DES VITAMINES :

A) RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE :

Une recherche bibliographique ad'abord été organisée dans trois directions :

- existence des vitamines dans les végétaux inférieurs,
- extraction phytochimique des vitamines,
- phytochimie spécifique des algues.

Nous avons recherché, pour chaque vitamine, une méthode qui soit reproductible et la plus spécifique possible. C'est ainsi que plusieurs sources bibliographiques ont été exploitées, en particulier les documents suivants :

- Technique d'Analyse et de Contrôle dans les IAA, Industries Agro-Alimentaires,
- Chemical Abstracts General Subjects,
- Methods in enzymology.

Pour chaque vitamine, un protocole a donc été établi en vérifiant, à chaque fois, que la composition phytochimique déjà connue de Sargassum muticum ne présentait pas d'incompatibilité avec les réactifs d'extraction vitaminiques choisis.

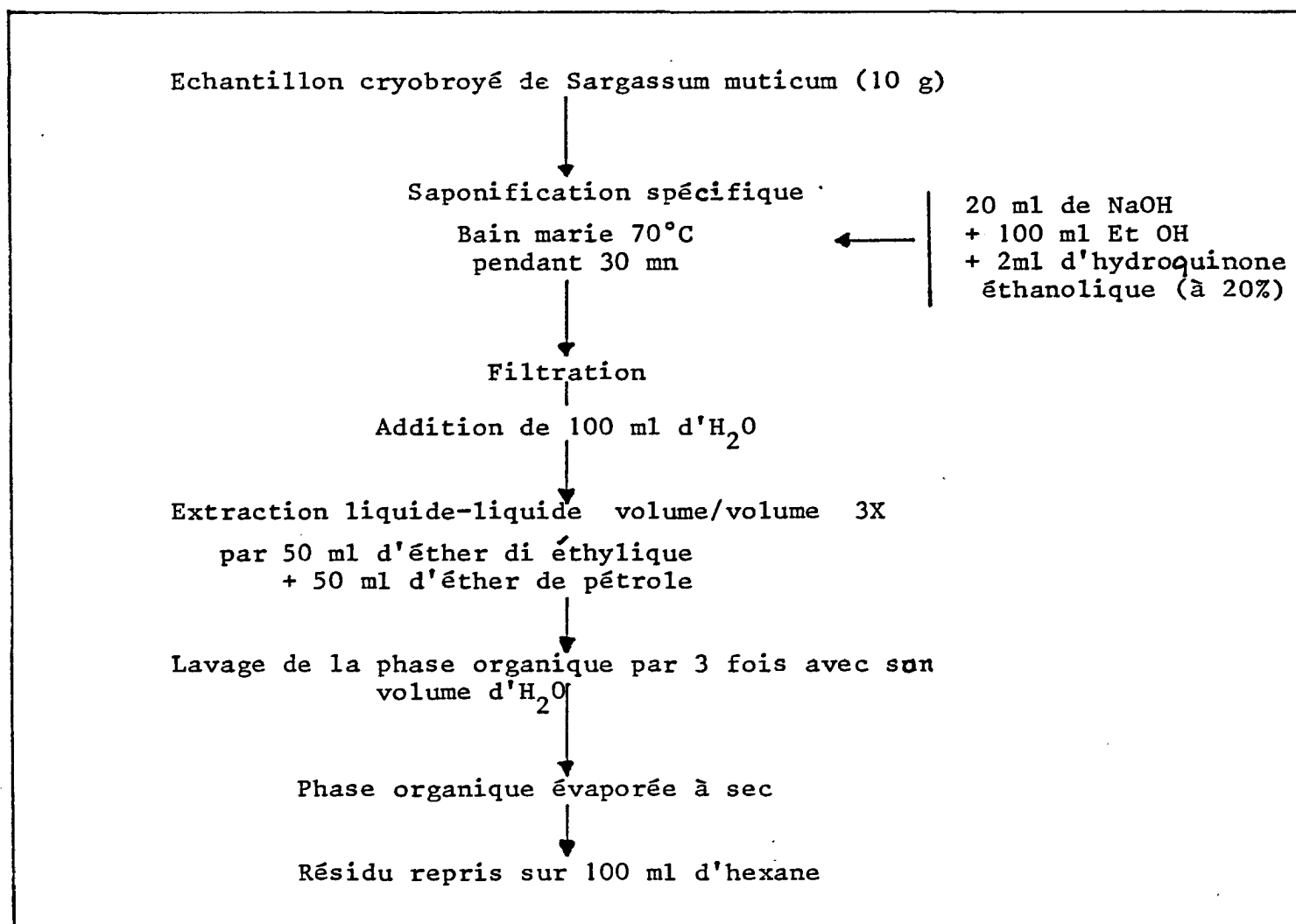
B) DESCRIPTION DES PROTOCOLES :1) Vitamines liposolubles :

Chaque fois que cela a été possible, l'extraction a été précédée d'une saponification spécifique. Ces vitamines étant solubles dans les solvants organiques, une concentration de l'extrait à l'évaporateur rotatif était toujours envisageable, donc il est possible de descendre très bas la limite de détection.

a) Vitamine A - Rétinol :→ 1. Justification :

Les végétaux ne contiennent pas de rétinol, mais leur vitamine A est dimérisée sous la forme de β carotène qui, par hydrolyse, redonne deux molécules de vitamine A.

Notre extraction avait donc pour but, dans un premier temps, de saponifier les lipides contenues dans le broyat et d'hydrolyser le β carotène en vitamine A pour l'extraire selon une méthode liquide-liquide. Toutes ces opérations étaient menées à l'abri de la lumière, étant donnée la fragilité des molécules de rétinol.

→ 2. Description du protocole :

→ 3. Manipulation :

Le cryobroyat d'algue était sorti du congélateur et pesé précisément à 10 grammes.

Puis mis en solution dans un ballon sphérique avec une solution de NaOH (50%) additionnée de 100 ml d'éthanol et de 2 ml d'une solution alcoolique d'hydroquinone à 20%.

Le ballon est porté au bain marie à 70°C pendant une demi-heure, puis, après refroidissement, on procède à une filtration sur Büchner. Le filtrat est additionné de 100 ml d'eau et mis dans une ampoule à décanter.

Puis on ajoute 50 ml d'éther éthylique et 50 ml d'éther de pétrole.

Après agitation et décantation, la phase organique est récupérée et la phase aqueuse est réextraite deux fois par 150 ml d'éther de pétrole.

On procède ensuite au lavage des phases étherées, rassemblées en ampoule à décanter, par trois fois 100 ml d'eau distillée.

La phase organique est ensuite évaporée sous pression réduite. Le résidu est repris par exactement 100 ml d'hexane RP.

→ 4. Description de l'extrait :

La solution est parfaitement limpide, de couleur variant du jaune pâle à l'orange. Elle a une forte odeur d'hexane. L'extrait est conservé au réfrigérateur à +4°C.

1 ml de cet extrait est mis dans un tube à essai. On ajoute 1 ml d'une solution chloroformique de trichlorure d'Antimoine. Il apparaît alors une couleur bleue qui disparaît dans les cinq minutes suivantes.

Cette réaction permet d'identifier la présence de vitamine A.

→ 5. Chromatographie en Couche Mince :

Une réaction d'identification est possible sur extrait concentré dans les conditions expérimentales suivantes :

Phase stationnaire : DC AluFolien Kieselgel 60.F-254

Phase mobile : Ether de pétrole 50
 Ether éthylique 40
 Acétate d'éthyle 10

Révélateur : Acide sulfurique concentré

Une tâche bleue violette est révélée alors au même Rf qu'un étalon de vitamine A.

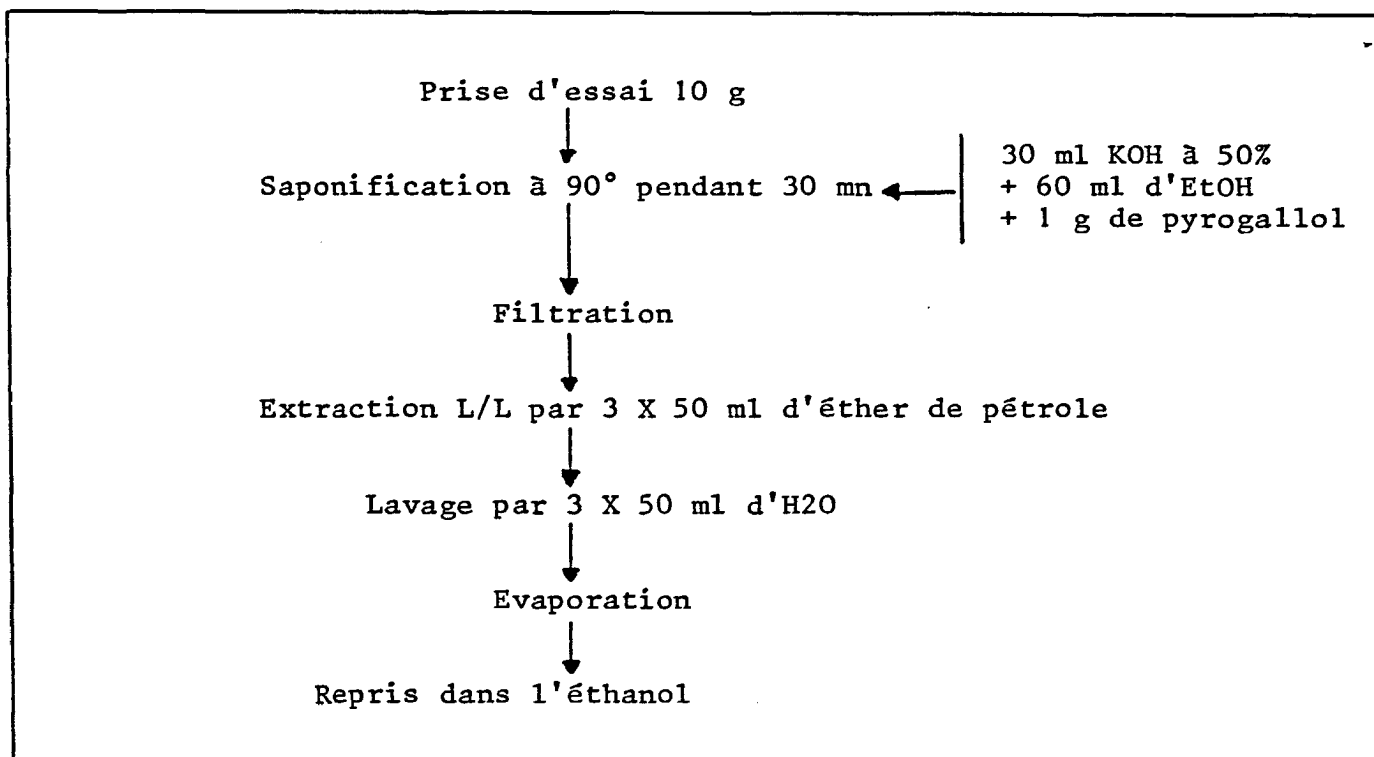
b) Vitamine D₃ :

→ 1. Justification :

La vitamine D₃ (cholécalférol) est le seul représentant de la famille des calciférols se trouvant présent dans les tissus végétaux (et encore à titre exceptionnel).

Sa fragilité oblige aussi une extraction à l'abri de la lumière, mais une saponification demeure possible.

→ 2. Description du protocole :



→ 3. Manipulation :

Une solution A comprenant 60 ml d'éthanol RP et 1 g de pyrogallol est préparée.

Le cryobroyat de *Sargassum muticum* est pesé (10 g) et mis dans un ballon sphérique, contenant 30 ml d'une solution de potasse aqueuse à 50%.

La solution A est alors rajoutée : l'ensemble se colore en brun foncé et est mis au bain marie à 90°C pendant 30 minutes.

Après refroidissement, la solution est filtrée et le filtrat placé en ampoule à décanter. L'extraction est conduite par trois fois avec 50 ml d'éther de pétrole.

Les fractions étherées sont alors réunies et lavées par trois fois avec 100 ml d'eau.

On procède alors à l'évaporation à sec de la phase organique sous pression réduite. L'extrait sec est repris par 100 ml d'éthanol exactement mesuré.

→ 4. Description de l'extrait :

L'extrait obtenu est jaune pâle, d'odeur éthylique.

Il présente une certaine fragilité à la lumière.

Il sera conservé au réfrigérateur à + 4° C.

→ 5. Chromatographie en Couche Mince :

Une réaction d'identification est possible sur extrait concentré dans les conditions expérimentales suivantes :

Phase stationnaire : DC AluFolien Kieselgel 60.F-254

Phase mobile : Ether de pétrole 50
Ether éthylique 40
Acétate d'éthyle 10

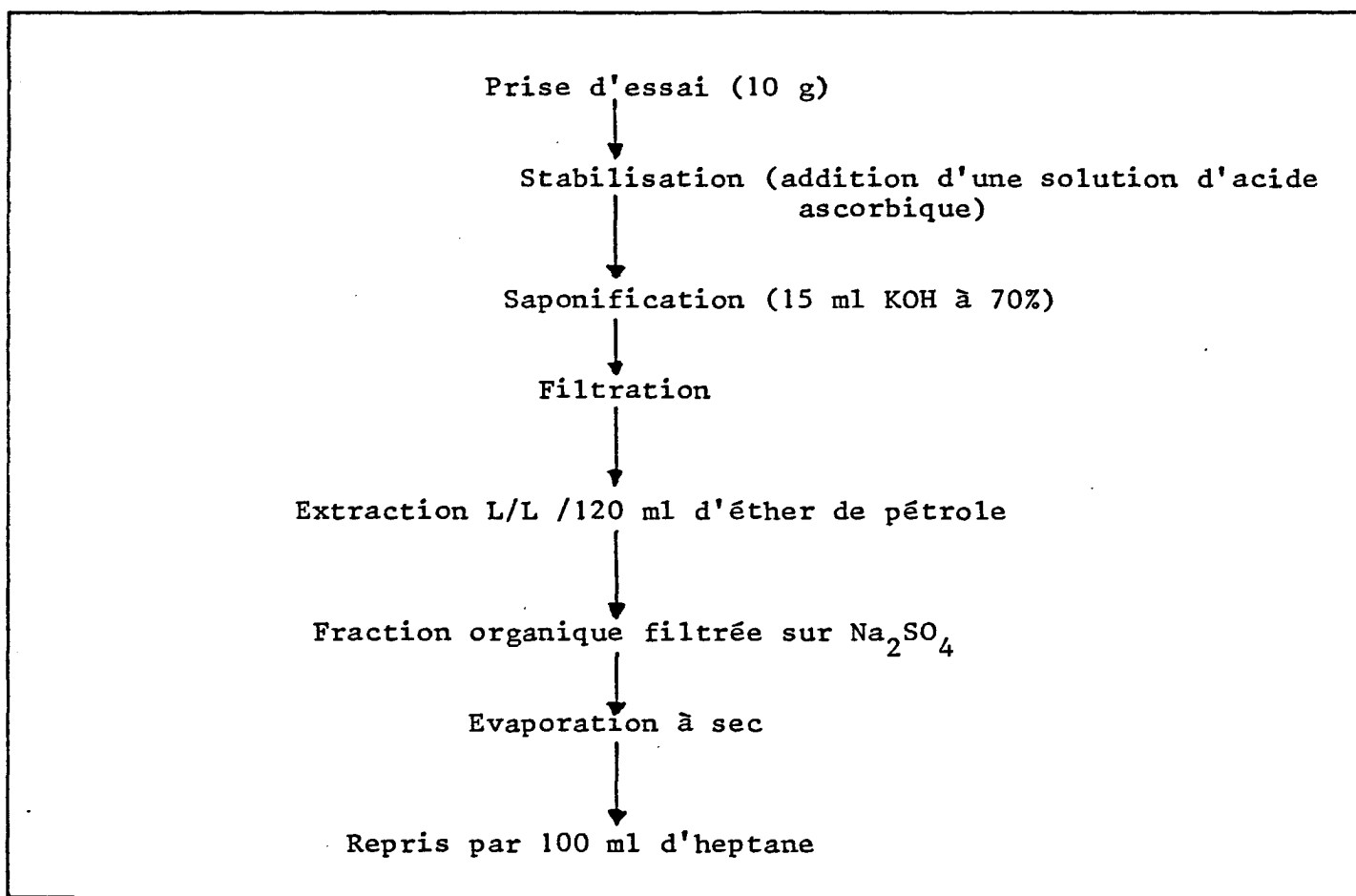
Révéléateur : Acide sulfurique concentré.

Une tâche brun orange en regard de l'étalon est révélée au même Rf qu'un étalon de vitamine D₃.

c) Vitamine E :→ 1- Justification :

Les tissus végétaux possèdent le plus souvent une faible quantité d' α tocophérol, ce qui nous a incité à la doser dans *Sargassum muticum*.

Comme toute vitamine liposoluble, l' α tocophérol se situe dans l'insaponifiable des tissus, ce qui nous a conduit à une extraction par solvants organiques après saponification de la prise d'essai.

→ 2- Description du protocole :

→ 3-Manipulation :

L'algue cryobroyée est pesée puis mise dans un ballon sphérique. On y ajoute une solution méthanoéthanolique d'acide ascorbique fabriquée extemporanément, dans les proportions suivantes :

- Acide ascorbique	0,5 g
- eau	4 ml
- éthanol	20 ml
- méthanol	100 ml.

L'ensemble est mis au bain marie à 90°C pendant 20 minutes.

Puis on procède à une saponification par addition de potasse (15 ml de KOH à 70% + bain marie à 90°C pendant 40 minutes).

Après refroidissement, l'ensemble est filtré sur büchner et extrait une première fois en ampoule à décanter par 120 ml d'éther éthylique.

Cette phase organique est ensuite déshydratée par du sulfate de sodium puis filtrée. Une deuxième extraction est effectuée dans les mêmes conditions.

Les phases organiques sont évaporées à sec et le résidu est repris par 100 ml d'heptane, exactement mesuré.

→ 4-Description de l'extrait :

L'extrait se présente sous la forme d'un liquide transparent, jaune. Après décantation, on observe l'apparition d'une deuxième phase orangée (1 ml pour 100 ml d'heptane environ).

Cette deuxième phase provient du résidu d'évaporation : celle-ci n'ayant jamais pu être effectuée totalement, il subsiste toujours dans le ballon de l'évaporateur, un résidu jaune orange visqueux, non soluble dans l'eau, faiblement soluble dans l'heptane, très soluble dans l'éthanol et dégageant une forte odeur de crevette.

→ Ce résidu pouvant éventuellement servir en aromatisation n'a pas été identifié.

→ 5. Chromatographie en Couche Mince :

Une réaction d'identification est possible sur extrait concentré dans les conditions expérimentales suivantes :

Phase stationnaire : DC AluFolien Kieselgel 60 F 254

Phase mobile : Ether de pétrole 50
 Ether éthylique 40
 Acétate d'éthyle 10

Révélateur : Acide sulfurique concentré.

Un spot jaune orange est révélé au même Rf que l'étalon de vitamine E.

d) Vitamine K :

→ 1. Justification :

De l'ensemble des ménadiones caractérisant les vitamines K, seule la phytoménadione (K1) est présente dans les tissus végétaux. Cette substance est composée d'un noyau fonctionnel : ménadione, et d'un radical phytyle, qui est une longue chaîne insaturée $C_{20}H_{39}$.

Cette chaîne carbonée contribue à son insolubilité dans l'eau, mais surtout rend très instable la molécule tant à la température, à la lumière, qu'à toute forme d'oxydation, ce qui fait la très grande difficulté de l'extraction phytochimique de la vitamine K_1 .

La recherche bibliographique que nous avons effectuée nous a permis de constater que cette vitamine K_1 était très rarement extraite, le plus souvent dosée, sans extraction spécifique par chromatographie phase gazeuse.

Les rares protocoles trouvés proposaient une succession de deux chromatographies, une en colonne ouverte ou semi-préparative en phase normale suivie d'une séparation en colonne - phase greffée.

Toute saponification préalable étant, bien sûr, impossible.

Le rendement de ce type d'extraction est inversement proportionnel au temps, compte-tenu de la fragilité de la molécule. Le principal agent oxydant reste la moindre trace d'ultra-violet : si on laisse à la lumière du jour un bécher d'hexane contenant de la vitamine K1, il ne subsiste, dix minutes plus tard, que moins de 10% de la concentration initiale de phytoménadione.

D'où l'importance, pour augmenter le rendement, d'un protocole rapide. Aucune technologie ne permettant de travailler en phytochimie sans la moindre trace d'ultra-violet, nous avons mis au point, au bout de quelques mois, une technique, très rapide, d'extraction en obscurité totale, qui permet un rendement très important, puisque sur des extraits de *Sargassum muticum* dopés en vitamine K1, nous retrouvons 90% de la vitamine.

→ 2-Principe de la séparation :

Les extraits de *Sargassum muticum* étaient extraits dans l'obscurité sous agitation magnétique par un solvant spécifique, puis filtrés sur précolonne avant d'être dosés en CLHP.

→ 3-Description de l'extrait :

Les extraits se présentaient sous forme d'une solution limpide, jaune, dont la couleur disparaissait dans les jours suivants, malgré un stockage à l'obscurité dans réfrigérateur à +4°C.

→ 4. Chromatographie en Couche Mince :

Une réaction d'identification est possible, sur extrait concentré, dans les conditions expérimentales suivantes :

Phase stationnaire : DCAluFolien Kieselgel 60.F-254

Phase mobile :

Ether de pétrole	50
Ether éthylique	40
Acétate d'éthyle	10

Révélateur : Acide sulfurique concentré.

Un spot marron orange en regard de l'étalon de vitamine K est révélé.

2) Vitamines hydrosolubles :

Nous avons, comme pour les vitamines liposolubles, choisi de doser celles que l'on trouve dans les tissus végétaux, plus la vitamine B 12 commune dans tous les microorganismes. En effet, nous avons constaté que *Sargassum muticum* était très souvent parasitée par des microorganismes de type indéterminé, et qui ne semblent pas gêner sa croissance.

Le problème essentiel posé dans ce travail, est que les vitamines hydrosolubles ne sont extractibles (comme l'indique leur nom) que par de l'eau. Or étant plus ou moins sensibles à la température, toute évaporation d'eau restait impossible sous une forme d'ébullition, fût-elle sous pression réduite. Et nous ne possédons pas, par ailleurs, de lyophilisateur, ce qui a beaucoup nui à notre limite de détection, la situant pour trois cas de vitamines au dessus de la teneur moyenne des vitamines dans les algues.

L'acquisition d'un lyophilisateur semble être indispensable pour pouvoir doser ces trois vitamines.

Le pH est remonté à 4,5 par addition de soude normale, puis on procède à une délipidation en ampoule à décanter par addition d'éther de pétrole et rejet de la phase organique.

L'extraction L/L est conduite volume à volume et reproduite deux fois.

Cette phase aqueuse résiduelle constitue l'extrait.

→ 1. Description de l'extrait :

L'extrait est une solution aqueuse verte pâle, limpide, de pH 4,5.

Elle est stockée au réfrigérateur et dosée rapidement après neutralisation extemporanée à 6,9 de pH par addition de soude.

La conservation en pH acide permet de limiter une contamination bactérienne.

Ce type d'extraction chlorhydrique doit être suivi d'un dosage contre un étalon de thiamine dichlorhydrate et non de thiamine mononitrate, après neutralisation à pH 6,9 qui salifie la thiamine (Pka $\#$ 5,5)

→ 2. Chromatographie en Couche Mince :

Une réaction d'identification n'est possible que sur extrait lyophilisé. Ceci a été réalisé en prenant pour :

Phase stationnaire : DC AluFolien Kieselgel 60-F-254

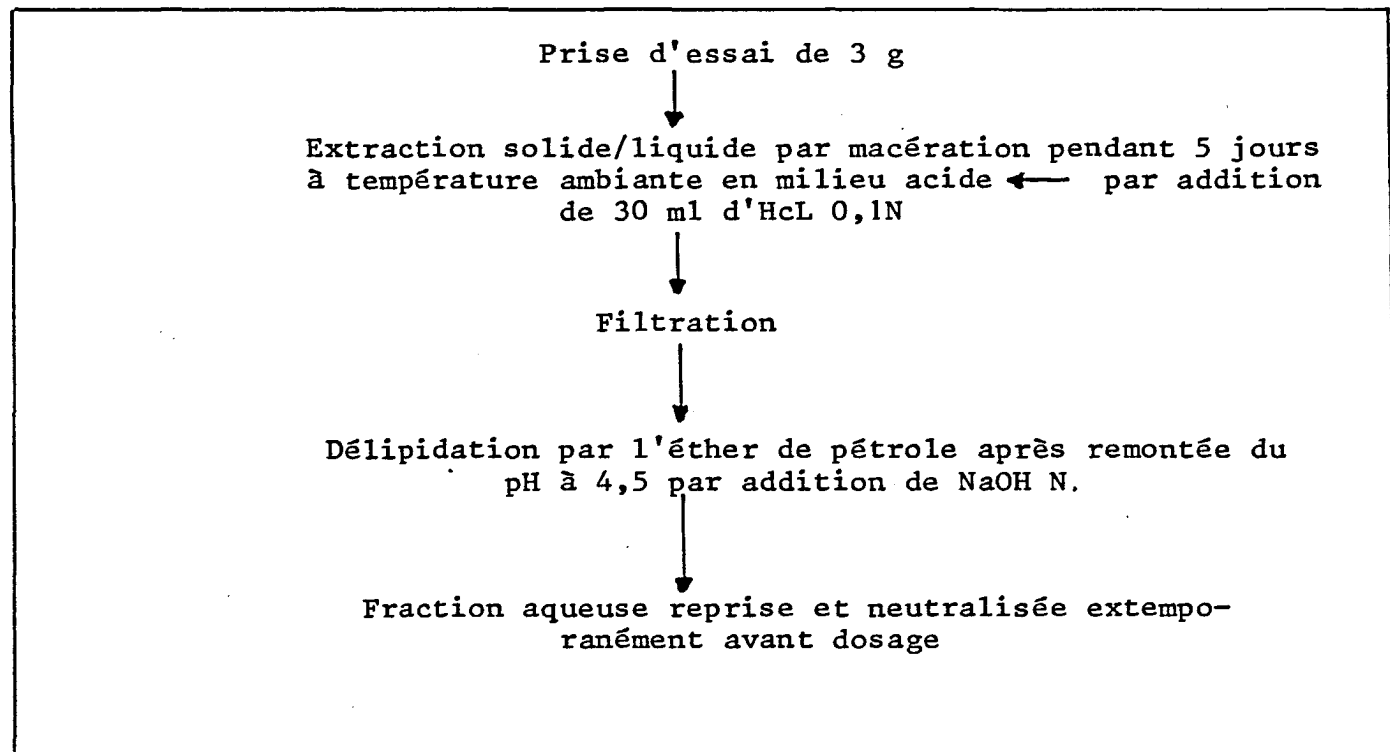
Phase mobile : benzène, méthanol, acide acétique, acétone
(70, 20, 5, 5)

Révélation à 366 nm, 254 nm

Conclusion : On observe à un Rf proche de 0, une tache bleue violette, fluorescente sur lampe UV 366 nm et une tache violette d'inhibition de fluorescence à 254 nm.

a) Vitamine B₁ :→ 1. Justification :

Plusieurs protocoles étaient proposés pour l'extraction de la thiamine. Nous avons choisi celui qui nous a semblé le plus simple, donc le moins préjudiciable à la molécule, vu, en particulier, sa fragilité à la température.

→ 2. Description du protocole :→ 3. Manipulation :

Sargassum muticum cryobroyée est pesée puis mise en suspension dans une solution chlorhydrique 0,1 N (30 ml) à température ambiante pendant 5 jours.

Puis la suspension est filtrée.

b) Vitamine B₂ :

→ 1. Justification :

La Riboflavine, de part son rôle de coenzyme, est présente dans toutes cellules animales ou végétales.

L'extraction par l'acide chlorhydrique 0,1N est commune à celle de la Riboflavine, les deux molécules ayant le même comportement dans ce type d'extraction.

Nous ne donnerons donc pas de précision pour la description du protocole, la manipulation et la description de l'extrait. Se reporter au chapitre "a) Vitamine B₁".

→ 2. Chromatographie en Couche Mince :

Une réaction d'identification est possible et a été réalisée dans les conditions expérimentales suivantes :

Phase stationnaire : DC AluFolien Kieselgel 60-F-254

Phase mobile : benzène, méthanol, acide acétique, acétone
(70, 20, 5, 5)

Révélation à 366 nm, 254 nm.

Conclusion : On observe à un Rf de 0,2 environ, une tache bleue violette à 366 nm et noire en inhibition de fluorescence à 254 nm.

C) Vitamine B₆ :

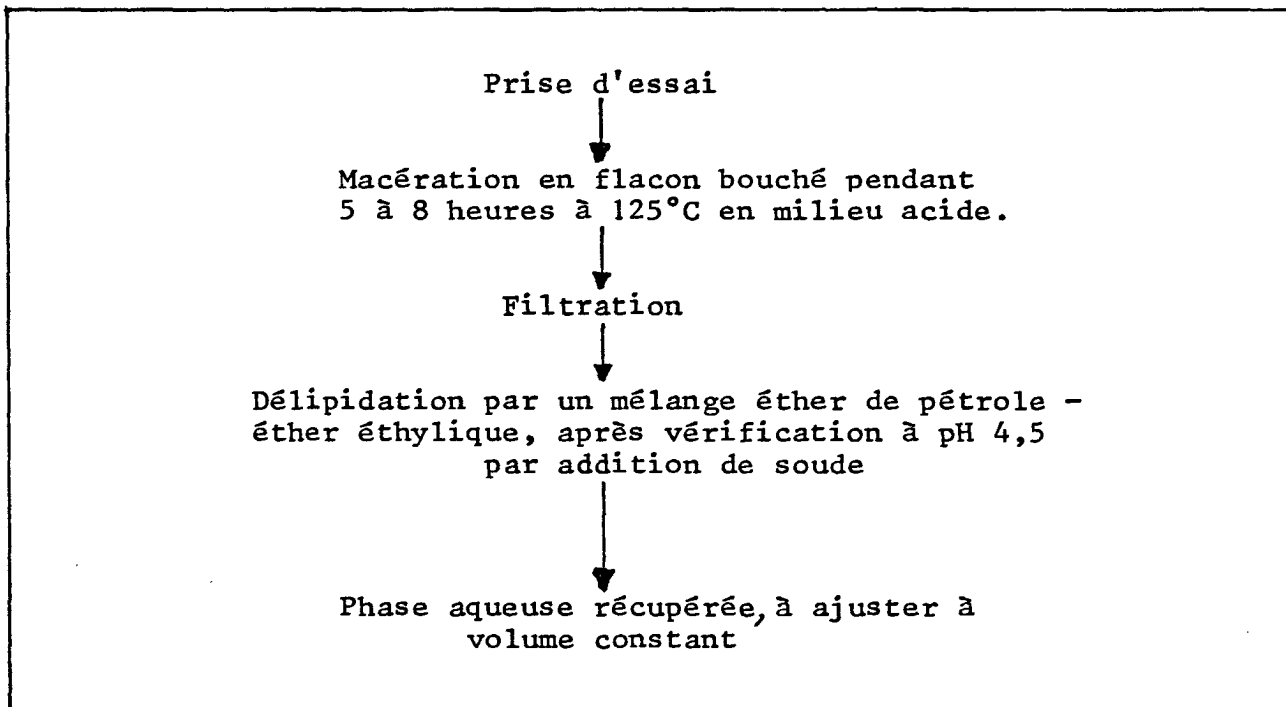
→ 1. Justification :

La pyridoxine ou vitamine B6 est une molécule toujours présente dans les tissus animaux, moins souvent dans les tissus végétaux.

Nous avons tout de même essayé de la doser dans *Sargassum muticum*.

Le fait que la pyridoxine est une molécule moins fragile que les précédentes, nous a autorisés à un dosage plus drastique, donc plus spécifique.

→ 2. Description du protocole :



→ 3. Manipulation :

Le crybroyat d'algue est pesé (2 g) et mis dans un flacon avec 10 fois son poids d'acide chlorhydrique molaire. Le flacon est bouché et le tout est porté à l'étuve pendant 5 à 8 heures.

La suspension est filtrée et le filtrat ajusté à pH 4,5 par addition de soude molaire.

On procède ensuite à un lavage de la phase aqueuse en ampoule à décanter, par un mélange équivolume d'éther éthylique et éther de pétrole. L'extraction V/V est recommencée deux fois.

La phase aqueuse constitue l'extrait. Elle est ajustée à volume constant.

→ 4. Description de l'extrait :

L'extrait se présente sous forme d'une solution limpide jaunâtre, sans odeur. Elle doit être stockée au réfrigérateur à 4°C, ou mieux, lyophilisée, pour éviter toute contamination bactérienne, et dosée le plus rapidement possible.

Juste avant le dosage, une neutralisation à pH 6,9 par addition de soude N est nécessaire.

→ 5. Chromatographie en Couche Mince :

Une réaction d'identification est possible et a été réalisée dans les conditions expérimentales suivantes :

Phase stationnaire : DC AluFolien Kieselgel 60.F.254

Phase mobile : benzène, méthanol, acide acétique, acétone
(70, 20, 5, 5)

Révélation à 366 nm, 254 nm.

Conclusion : On observe pour l'étalon une tâche visible jaune à un Rf de 0,25 devenant violette par inhibition de fluorescence à 254 nm. L'extrait ne présente pas cette tâche.

d) Vitamine B₁₂ :

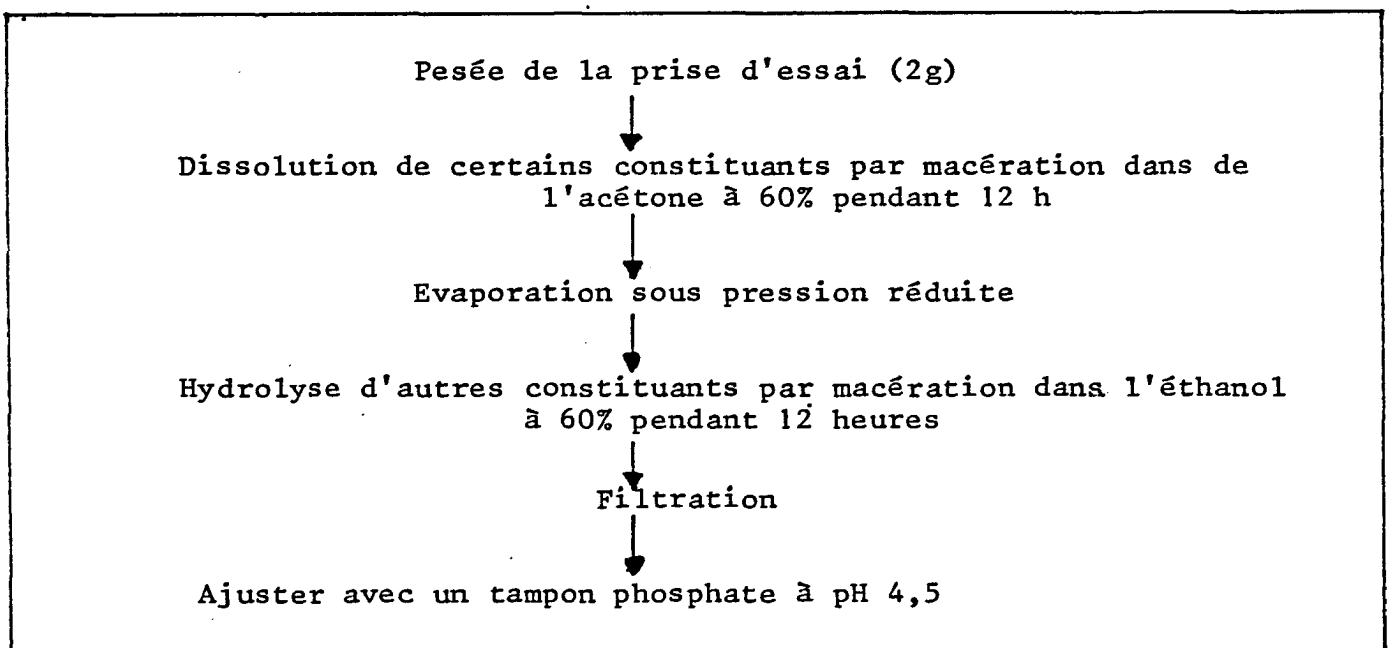
→ 1. Justification :

La vitamine B₁₂ n'existe pas dans les végétaux, mais de nombreux microorganismes en produisent de grande quantité et il se trouve que Sargassum muticum est souvent parasitée par des microorganismes, que l'on n'a pas déterminés avec précision.

Nous avons donc dosé la cyonocobalamine dans les extraits.

La fragilité de cette énorme molécule interdisait le passage en milieu très acide, qui aurait hydrolysé le noyau tétrapyrolique mais une extraction est tout de même possible dans les conditions suivantes.

→ 2. Description du protocole :



→ 3. Manipulation :

Un échantillon de Sargassum muticum cryobroyée est pesé (2 g) et mis à macérer dans 10 fois son poids d'une solution d'acétone à 60% pendant 12 heures à température ambiante.

La suspension est ensuite mise à évaporer sous pression réduite. Le résidu (non sec) est repris par 10 fois son poids d'une solution d'éthanol à 60% et mis à macérer pendant 12 heures.

Puis il y a filtration. Le filtrat est tamponné avec un tampon phosphate à pH 4,5 et ajusté à volume constant.

→ 4. Description de l'extrait :

L'extrait se présente sous la forme d'une solution limpide, grisâtre à pH 4,5, ayant l'odeur du tampon phosphate (odeur acide).

Cette solution est stockée au réfrigérateur et doit être dosée rapidement.

→ 5. Chromatographie en Couche Mince :

Une réaction d'identification n'est possible que sur extrait lyophilisé, ce que nous avons réalisé dans les conditions suivantes :

Phase stationnaire : DC AluFolien Kieselgel 60 F 254

Phase mobile : benzène, méthanol, acide acétique, acétone
(70, 20, 5, 5)

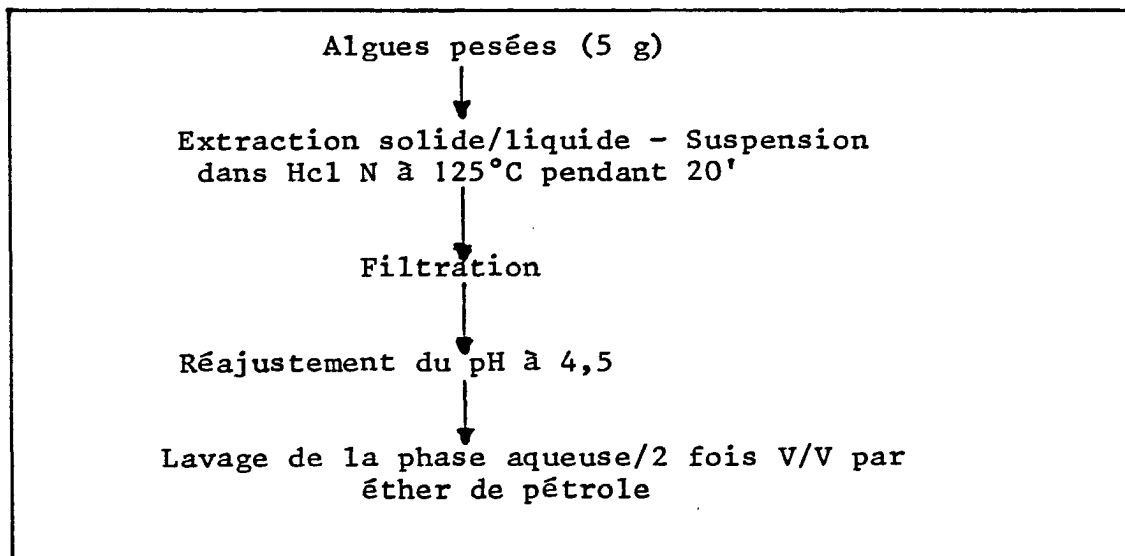
Révélation : 254 nm

Conclusion : On observe un spot au Rf de 0 en lumière visible coloré en jaune et violet par inhibition de fluorescence à 254 nm précisant la présence de vitamine B 12.

e) Vitamine PP :→ 1. Justification :

L'amide nicotinique est une molécule très résistante à la température, donc à toute forme d'hydrolyse acide douce.

Son extraction emploie donc une méthode assez drastique.

→ 2. Description du protocole :→ 3. Manipulation :

L'algue cryobroyée est pesée et mise en béccher dans une solution de 10 fois son poids d'acide chlorhydrique normale.

Le tout est mis à l'étuve pendant 20 minutes, à 125°C.

Après filtration, le filtrat dont le pH est d'1 unité, est réajusté à 4,5 par addition de NaOH normale et est lavé en ampoule à décanter par deux fois par de l'éther de pétrole volume/volume.

La fraction organique, jaune, est rejetée.

La fraction aqueuse constitue l'extrait.

→ 4- Description de l'extrait :

L'extrait se présente sous la forme d'une solution aqueuse jaune, à pH 4,5, inodore, que l'on stocke au réfrigérateur et que l'on dose très rapidement.

Ce type d'extrait fournissant, encore plus qu'un autre, un excellent milieu de culture bactérien.

Le dosage est précédé d'une neutralisation à pH 6,9 par addition de soude normale, qui permet son passage en colonne.

→ 5- Chromatographie en Couche Mince :

Une réaction d'identification est possible dans les conditions expérimentales suivantes telles que réalisées au laboratoire :

Phase stationnaire : DC AluFolien Kieselgel 60.F.254

Phase mobile : benzène, méthanol, acide acétique, acétone (70, 20, 5, 5)

Révélation : 254 nm.

Conclusion : On observe sous lampe UV à 254 nm une tâche sombre à un Rf de 0,5 environ, en regard de l'étalon de vitamine PP, orientant vers l'identification de la vitamine PP dans l'extrait lyophilisé.

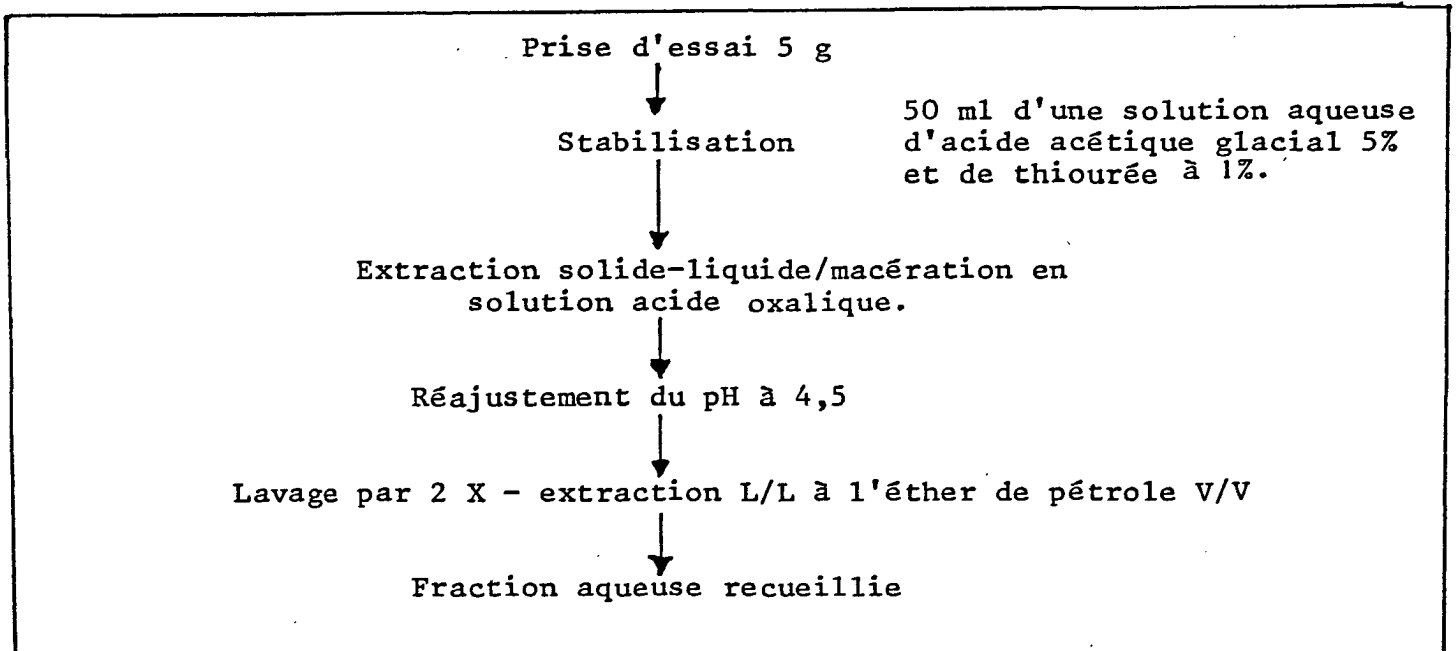
f) Vitamine C :→ 1. Justification :

Les autres vitamines hydrosolubles (du groupe B) ont une valeur de coenzymes dans le métabolisme cellulaire, ce qui explique qu'on les rencontre rarement à des concentrations supérieures à 15 ppm dans les tissus végétaux.

En revanche, la vitamine C, de par son rôle dans la régularisation du potentiel d'oxydoréduction cellulaire, peut être synthétisée en très grande quantité, et dans certains végétaux, stockée en vésicules, comme chez les Citrus par exemple.

Le dosage de la vitamine C est donc tout à fait possible dans *Sargassum muticum*.

Le problème de l'extraction réside dans le fait que l'acide ascorbique a une perpétuelle tendance à se réduire sous forme déhydroascorbique; pour éviter cela, il faut stabiliser l'échantillon avant extraction.

→ 2. Description du protocole :

→ 3. Manipulation :

L'échantillon d'algue est pesé et mis dans une solution aqueuse d'acétique glacial à 5% et de thiourée à 1%.

Ce mélange est placé à l'étuve pendant 20 heures à 60°, puis on ajoute 50 ml d'acide oxalique à 2%.

Le mélange est alors filtré et son pH réajusté à 4,5 par addition de NaOH N.

Enfin, cette solution est lavée en ampoule à décanter par son volume d'éther de pétrole, deux fois.

La phase organique jaune pâle, est rejetée.

La phase aqueuse est gardée.

→ 4. Description de l'extrait :

L'extrait est une solution aqueuse, limpide, vert pâle, inodore, à pH 4,5. Là encore, un stockage à basse température 4°C s'impose ou mieux, une lyophilisation, et le dosage doit être fait rapidement après neutralisation à pH 6,9 par addition de soude normale

→ 5. Chromatographie en Couche Mince :

Une réaction d'identification n'est possible que sur extrait lyophilisé dans les conditions expérimentales suivantes, ce que nous avons réalisé :

Phase stationnaire : DC AluFolien Kieselgel 60 F 254

Phase mobile : benzène, méthanol, acide acétique, acétone
(70, 20, 5, 5)

Révélation : 254 nm

Conclusion : On observe nettement un spot violet par inhibition de fluorescence à 254 nm, à un Rf de 0,6 en regard de l'étalon, orientant vers l'identification de vitamine C dans l'extrait.

II - DOSAGE DES VITAMINES :

1 - RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE :

Là encore, plusieurs voies de recherches ont été choisies.

Nous avons préselectionné un dosage par chromatographie liquide haute performance, bien que chaque fois, il ait existé d'autre type de dosage : colorimétrique, fluorimétrique ou micro-biologique.

La méthode par chromatographie liquide haute performance était, chaque fois, la plus systématisable (dosage en série)., la plus reproductible (ce qui est important quand il s'agit d'extraits phytochimiques) et surtout celle qui admettait la plus faible limite de détection.

Nous avons pu trouver des protocoles permettant de doser plusieurs vitamines dans les mêmes conditions d'élution et de colonnes, mais si ce type de méthode est parfaitement applicable dans le dosage des médicaments, il reste très difficile à appliquer dans le domaine de la phytochimie où les extraits sont beaucoup plus complexes. Une solution médicamenteuse contient rarement plus de vingt substances différentes, tandis qu'un extrait phytochimique simple en contient rarement moins de cinquante, d'où la nécessité de la mise au point d'un système d'élution assez performant.

Nos sources sont restées identiques à celles de la recherche bibliographique en extraction :

- Chemical Abstracts General Subjects,
- Methods en Enzymology,
- Techniques d'Analyse et de Contrôle dans les I.A.A.
- Publications Waters
- Cahiers de Chromatographie
- Applications à la Chromatographie Liquide Haute Performance.

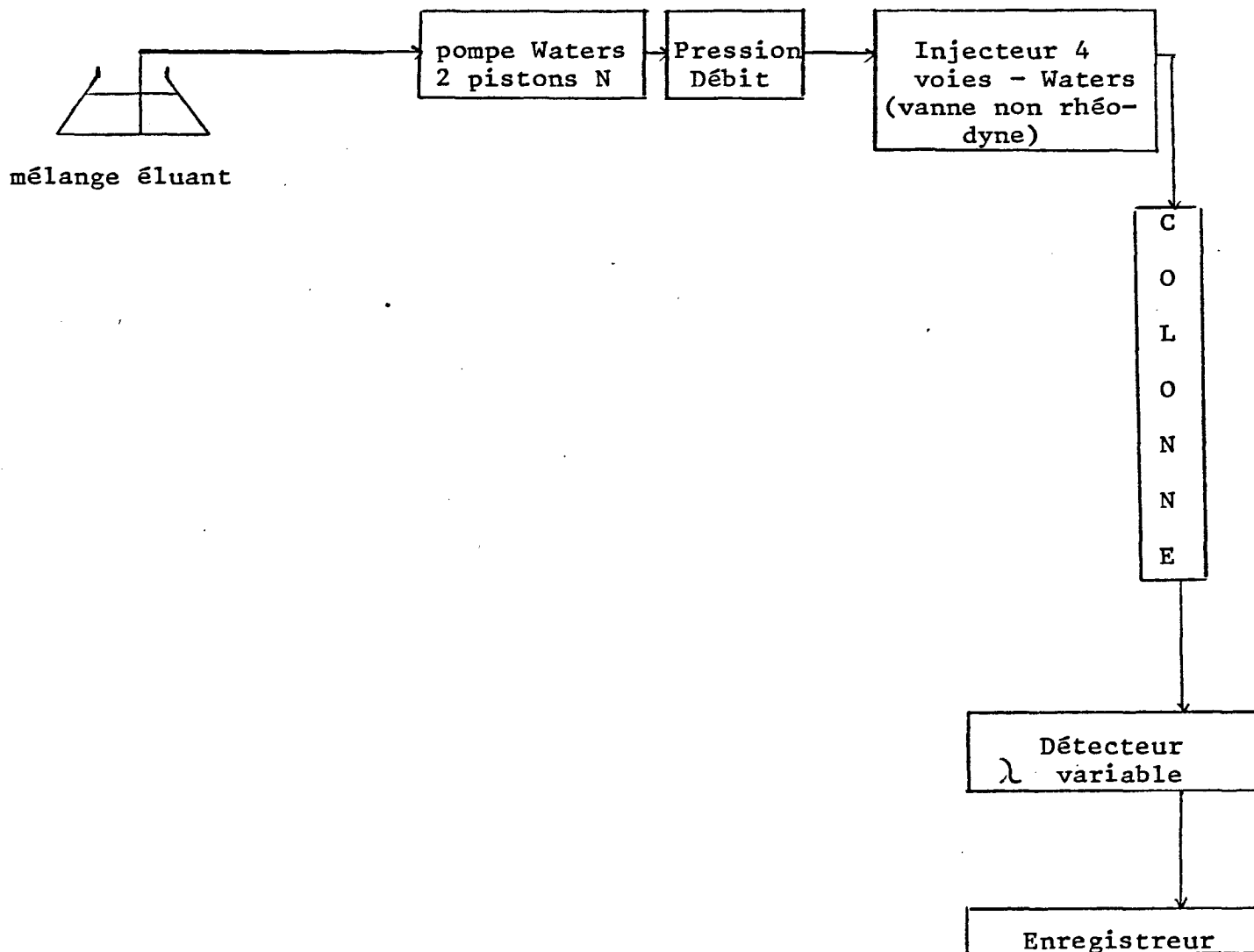
Enfin, chaque fois qu'un choix de protocoles était déterminé, il restait à l'adapter à notre extrait phytochimique et là, seuls des essais expérimentaux nous permettaient d'établir les conditions de dosages définitives.

Le laboratoire ne possédant pas encore de système de gradient d'éluion, les protocoles choisis ont été systématiquement ceux proposés en régime isocratique.

Enfin, le laboratoire ne possédant pas non plus à l'heure de la publication de ce rapport, d'intégrateur*, tous nos résultats ont été calculés en hauteur de pics, ce qui nuit à la précision du dosage et ce qui interdit toute conclusion, quand la résolution du système n'a pas été assez performante (cas d'une vitamine).

2 - DESCRIPTION DE L'APPAREILLAGE :

a) Schéma :



* acquis à ce jour

b) Utilisation :

Tous nos solvants étaient dégazés et filtrés sur membranes stérilisantes avant mélange et utilisation. D'autre part, les échantillons étaient filtrés sur membrane "minisart" avant injection.

L'utilisation de précolonne s'est avéré parfois nécessaire pour ne pas encrasser les têtes de colonne avec des résidus chlorophylliens ou autres.

Puis étaient injectés successivement :

- le solvant de l'étalon,
- l'étalon,
- les extraits.

Il est arrivé que, contrairement aux principes habituels de chromatographie, le solvant ne soit pas miscible avec la phase éluante; nous avons considéré que la faible quantité de l'injection (10 µl) par rapport au débit très important (là 2 ml/mn) permettait une solubilisation tout de même, ce qui explique dans ces cas, la distance de rétention importante du front de solvant.

L'appareil était préparé en élution simple et détection à la longueur d'onde choisie jusqu'à stabilisation de la ligne de base.

Les tableaux qui suivent résument les protocoles utilisés pour les vitamines hydro et liposolubles. Les conditions opératoires ont été mises au point, après avoir dosé des extraits dopés en vitamines pour augmenter leur performances. Ainsi les vitamines liposolubles ont-elles été dosées sur colonne en phase inverse tandis que les vitamines hydrosolubles étaient dosées sur colonne en phase normale. (sauf vitamine B₁₂)

Le choix de la longueur d'onde dépendait du maximum d'absorption du spectre de l'étalon vitaminique. Dans certains cas, ce maximum était relativement faible (210-220 nm); ceci a nuï à la clarté de l'enregistrement car cer-

taines phases mobiles et notamment, les tampons, le méthanol absorbent à d'aussi faibles longueurs d'onde, créant des artéfacts sur l'enregistrement. Néanmoins, un dosage uniforme à 254 nm n'eut pas été aussi performant.

Rappelons enfin que, pour toutes les vitamines hydrosolubles, les extraits ont été neutralisés à pH 6,9 avant passage sur colonne, afin, d'une part de salifier les vitamines type thiamine, d'autre part pour la protection des colonnes qui supportent mal les pH extrêmes et ce, même avec l'utilisation de tampon et d'éluant.

3 - CONDITIONS OPERATOIRES :

Les deux tableaux suivants donnent les conditions pour chaque vitamine.

Tableaux I et II.

4 - COURBES EXPERIMENTALES :

Les courbes sont répertoriées des pages : 39 à 138 .

TABLEAU I

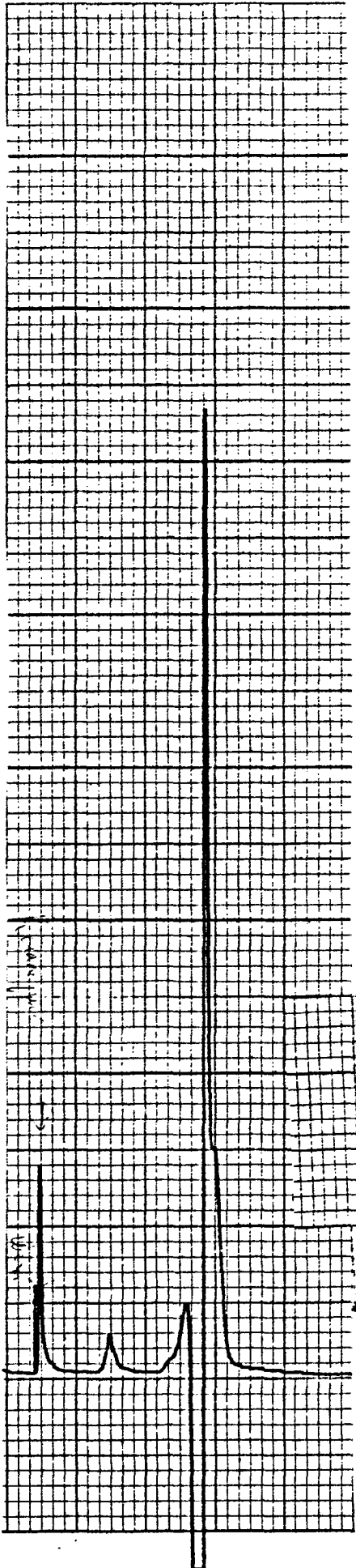
VITAMINES LIPOSOLUBLES - Conditions opératoires.

VITAMINES	TYPE DE COLONNE	MELANGE-ELUANT	DEBIT ml/mn	PRESSION	LONGUEUR d'ONDES	SENSIBILITE	VITESSE DEROULE- MENT PAPIER	OBSERVATIONS
Rétinol	Microbondapak C18	Méthanol 98 Eau 2	1,5	1500	254	0,01	1cm/mn	Extraits 1 → 10
		méthanol 92 Eau 8	1,6			0,005 0,002	1 cm/mn	11 → 15
α tocophérol	Microbondapak C18	Méthanol 92 Eau 8	2,1	1800	288	0,005	1 cm/mn	Extraits 11→15
	Microbondapak C18 Waters	Méthanol 98 Eau 2	1,5	2000	288	0,01	1 cm/mn	Extraits 1 → 10
Phytominadione	Microbondapak TM Phényl	Acétonitril 1 Propanol 2	3	1500	249	0,005	2 cm/mn	
Cholécalci.fé- rol	Microbondapak C18	Méthanol 80 Eau 20	1,5	2000 2500	265	0,005	1 cm/mn	I → V VI → X

TABLEAU II

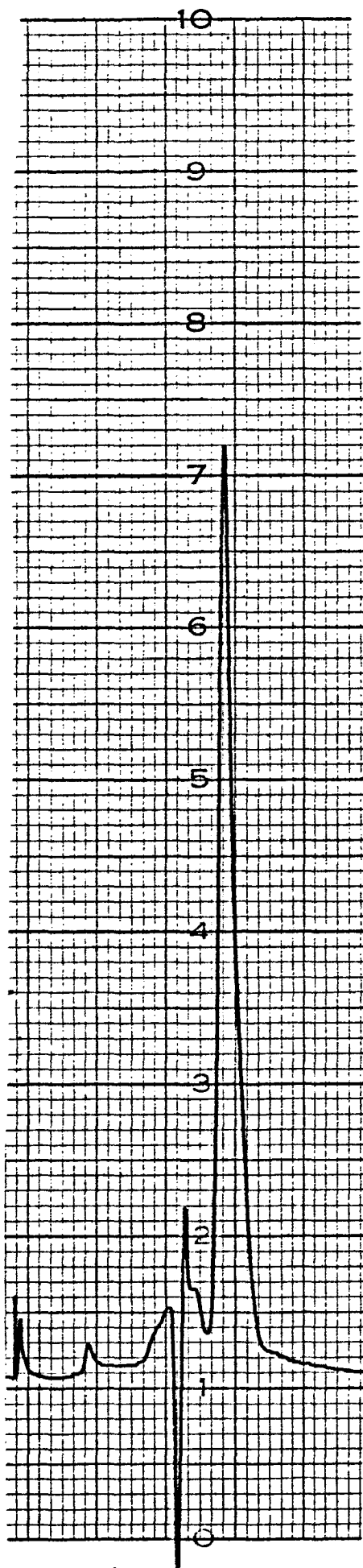
VITAMINES HYDROSOLUBLES - Conditions opératoires.

VITAMINES	TYPES DE COLONNE	MELANGE-ELUANT	DEBIT ml/n	PRESSION	LONGUEUR d'ONDES	SENSIBILITE	VITESSE DEROU- LEMENT PAPIER
Thiamine	Microbondapack NH ₂ 10µm	Acétonitrile 72 Tampon KH ₂ PO ₄ 0,005 ² N 28	3	1500	234	0,01	2 cm/mn
Riboflavine	Microbondapack NH ₂ 10µm	Acétonitrile 72 Tampon KH ₂ PO ₄ 0,005 ² N 28	4	2000	272	0,01	2 cm/mn
Pyridoxine	Microbondapack NH ₂ 10µm	Acétonitrile 92 Tampon KH ₂ PO ₄ 0,005 ² N 8	1,8	1000	286	0,01	1 cm/mn
Cyanocobalamine	Microbondapack C18 10µm	Acetonitrile 15 Acétate Na 85	1	1000 900	212	0,005	0,5cm/mn
Nicotinamide	Microbondapack NH ₂ 10 µm	Acétonitrile 72 KH ₂ PO ₄ 28	3	2000	218	0,01	1 cm/mn
Acide Ascorbique	Microbondapack NH ₂ 10µm	Acétonitrile 73 KH ₂ PO ₄ 27	1,3	900	268	0,005	1 cm/mn



COURBE 0

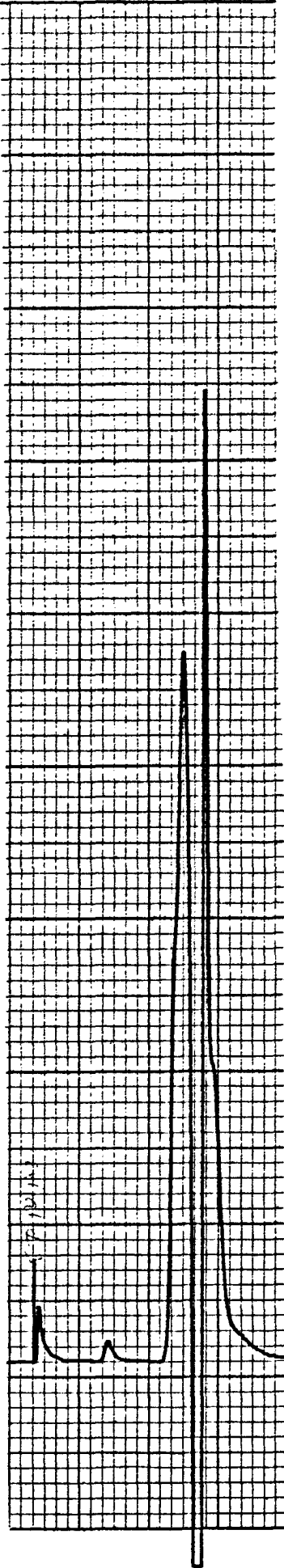
Injection : 10 μ l d'hexane

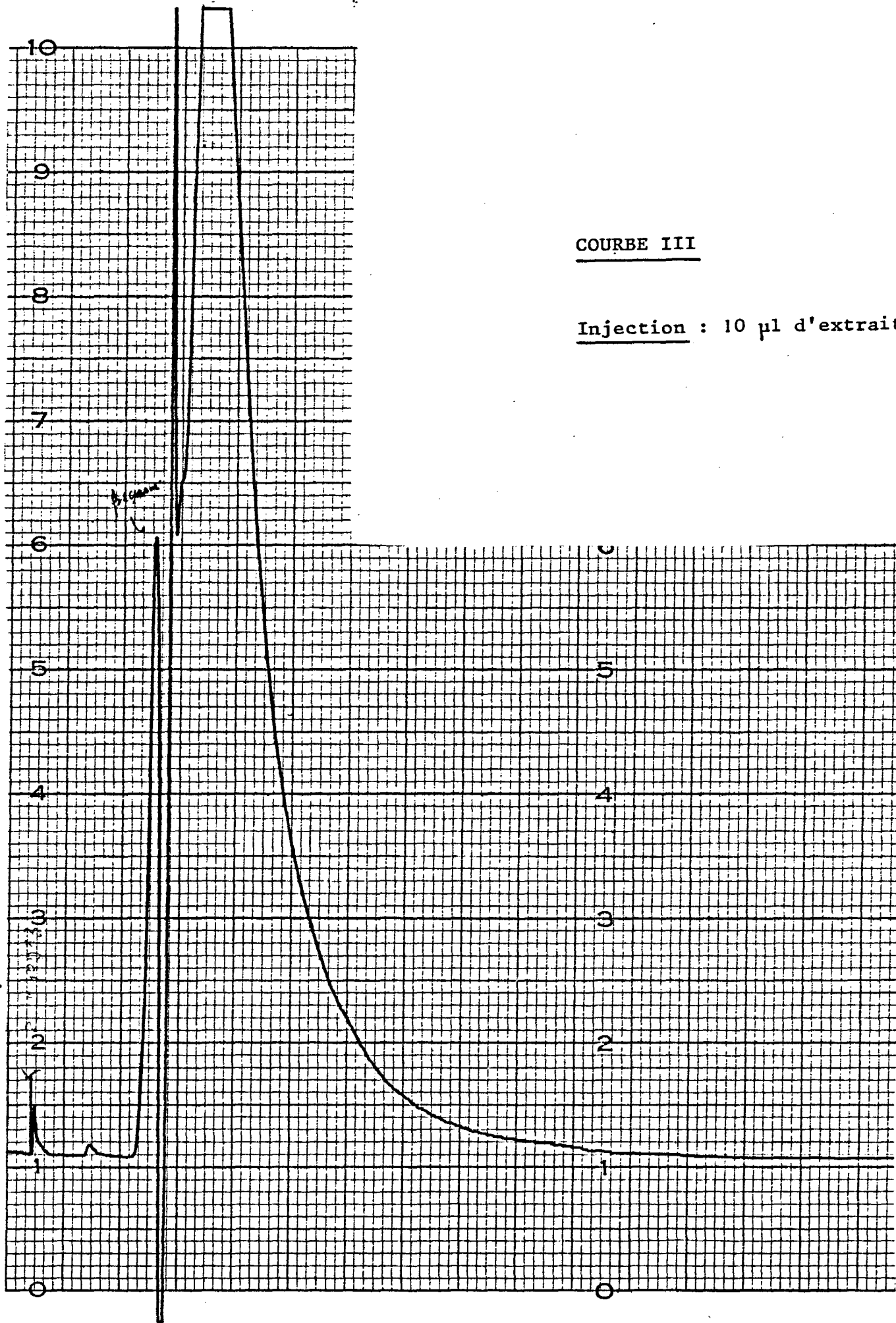


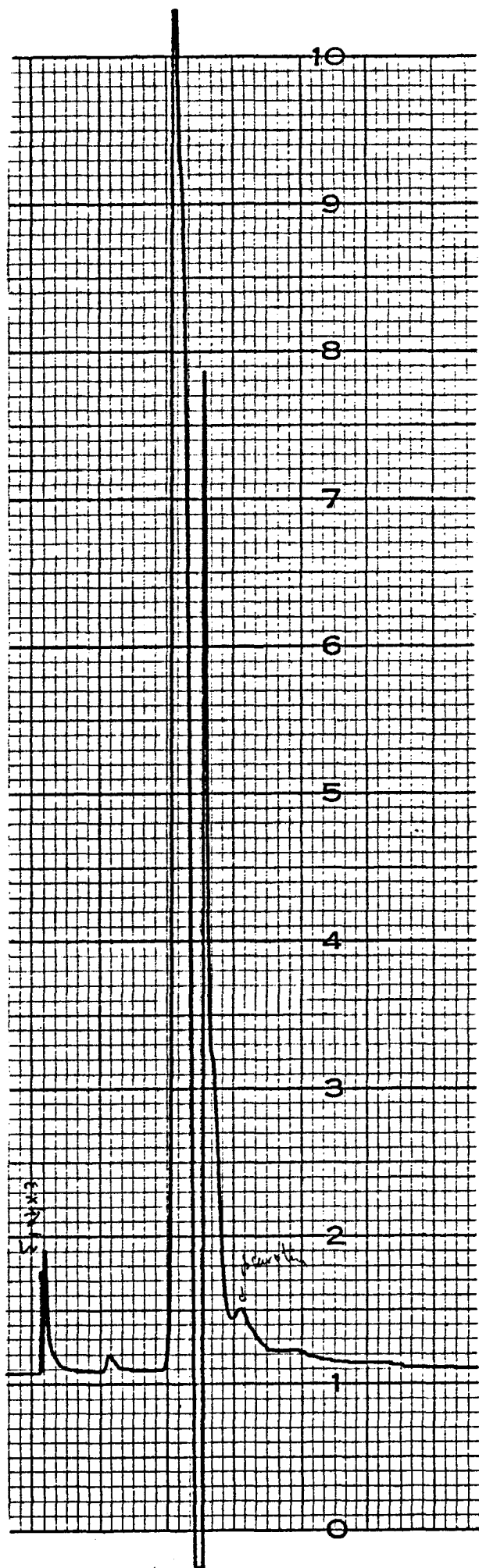
COURBE I BIS

Injection : 2 μ l d'une solution d'acétate de vitamine A dans l'hexane à la concentration de 344 mg/l.

6057/12.83

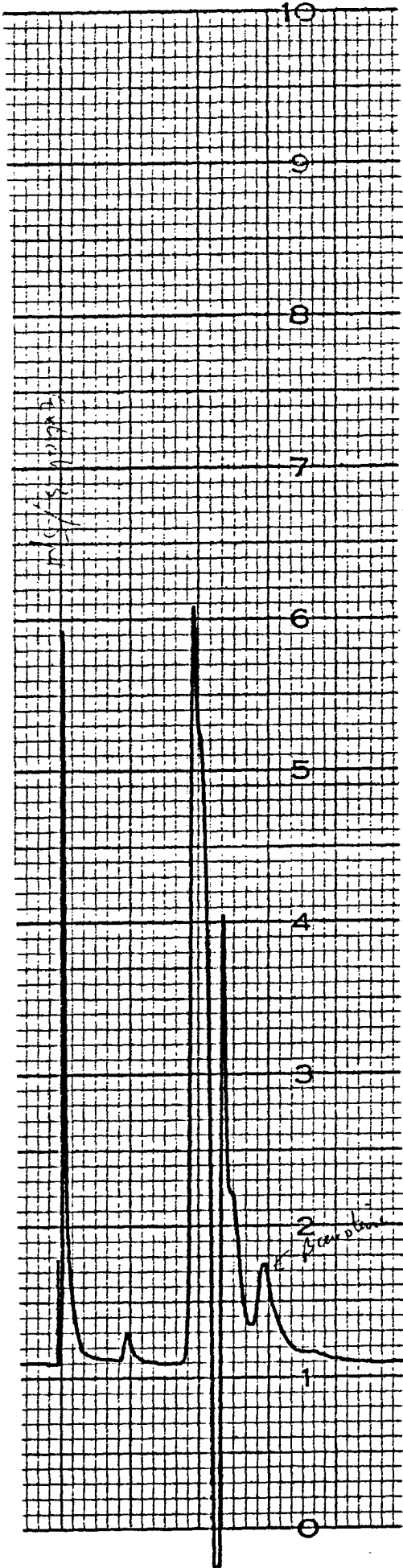
COURBE IIInjection : 10 μ l d'extrait n° 1





COURBE IV

Injection : 10 μ l d'extract n° 3

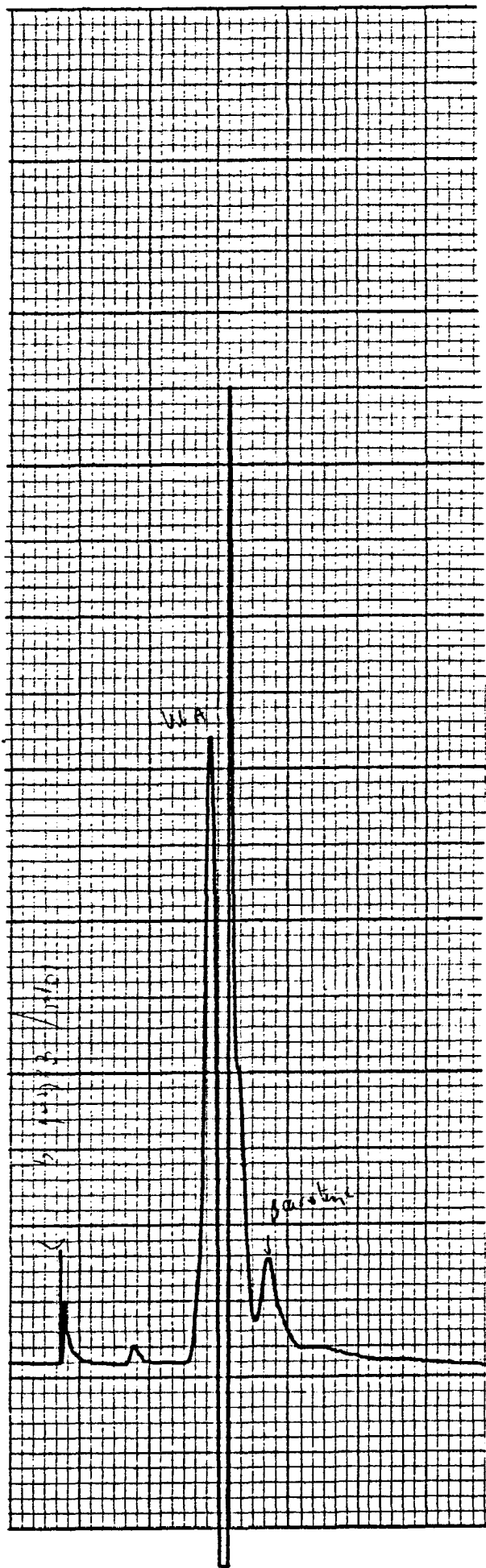


COURBE V

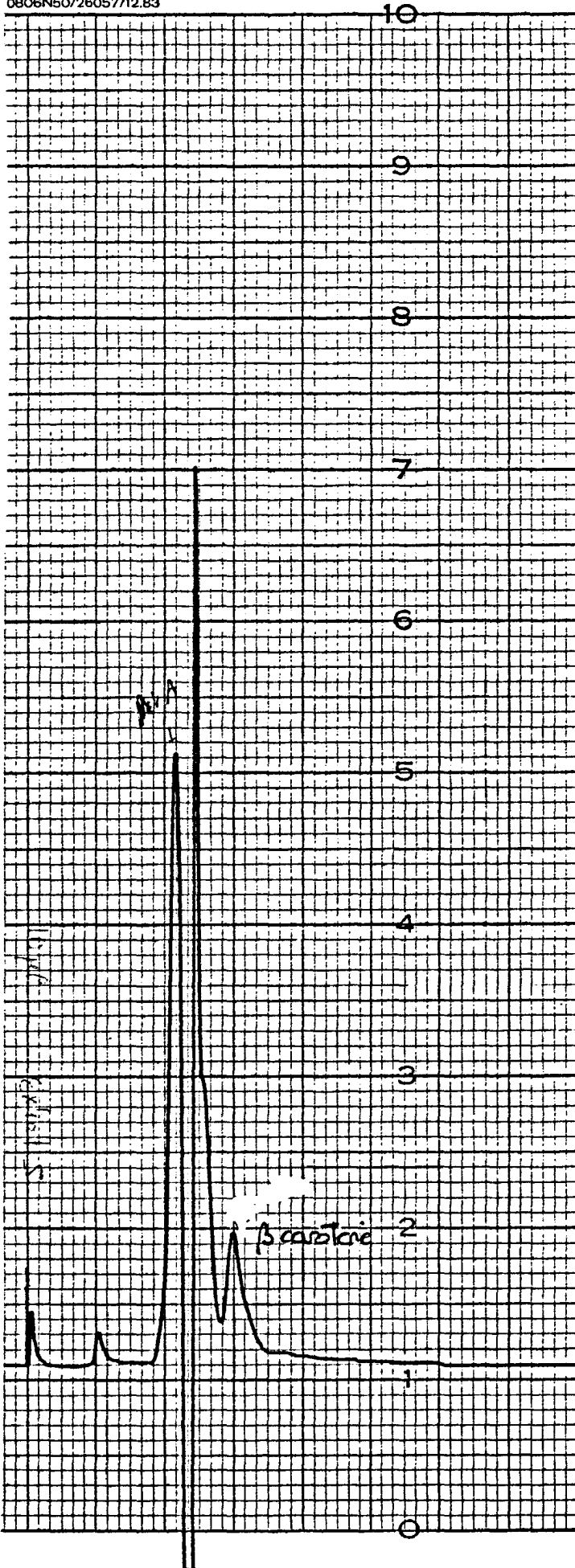
Injection : 5 µl d'extrait n° 3

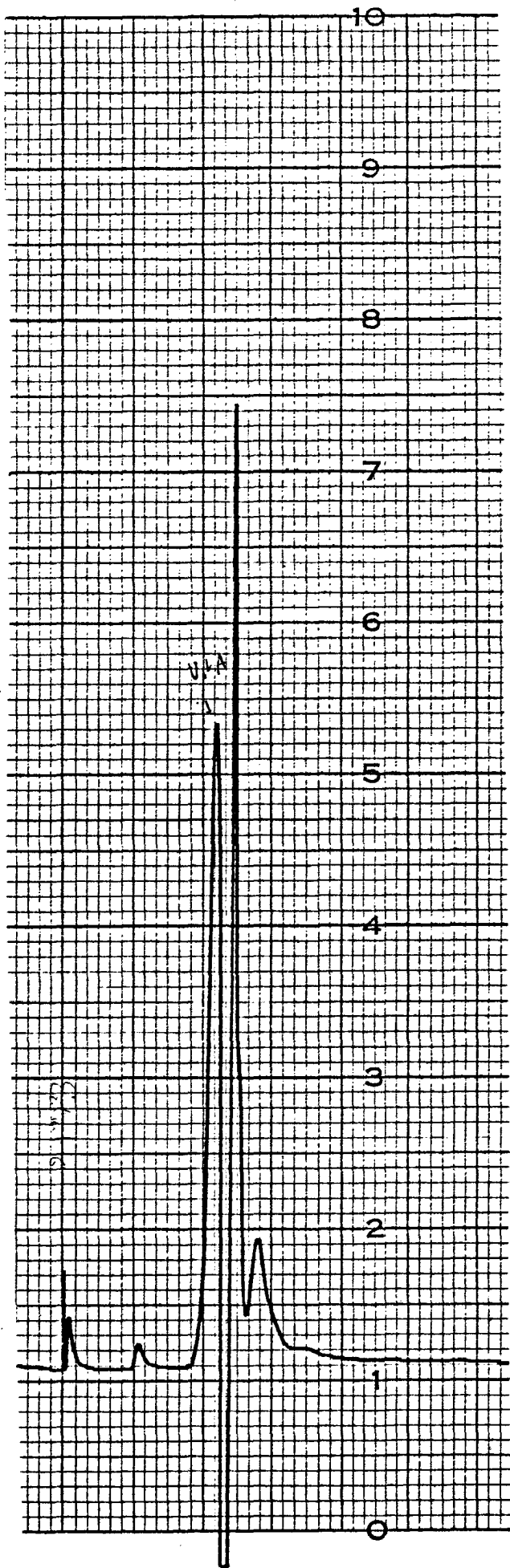
COURBE VI

Injection : 10 µl d'extrait n° 4



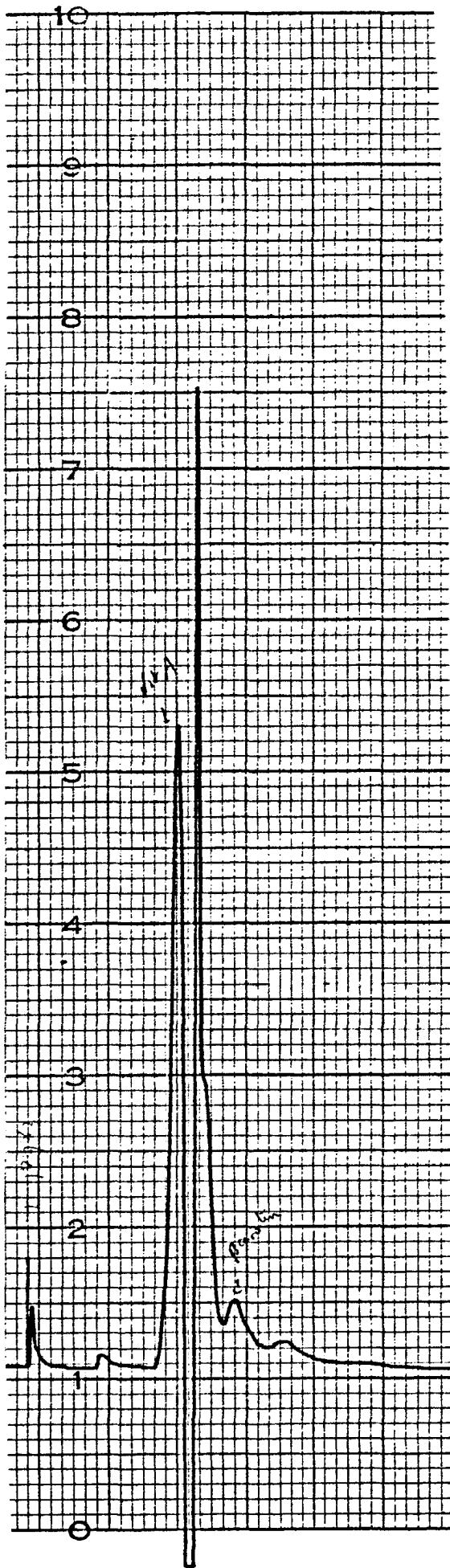
0806N50/26057/12.83

COURBE VIIInjection : 10 μ l d'extrait n° 5



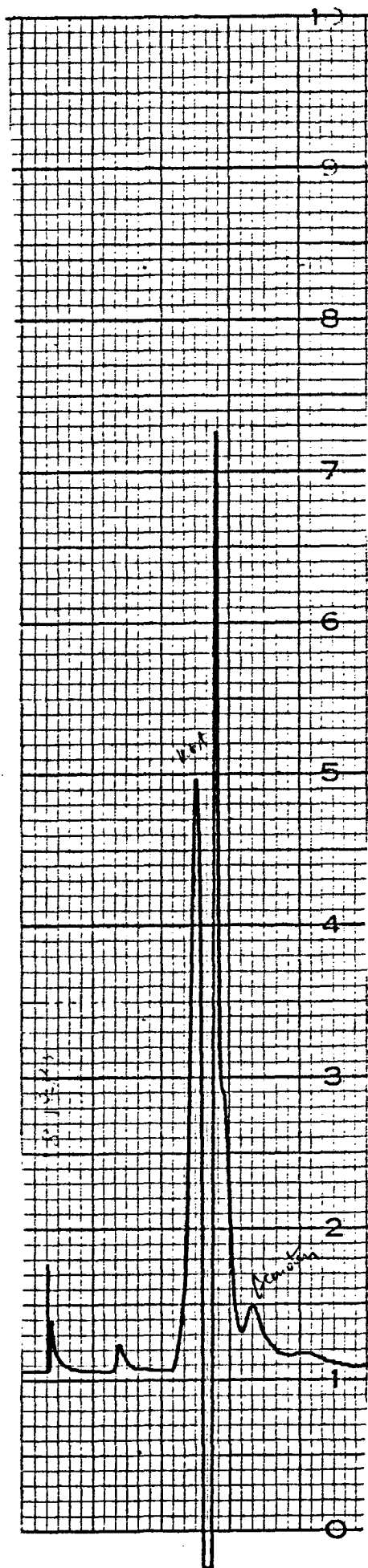
COURBE VIII

Injection : 10 μ l d'extract n° 6



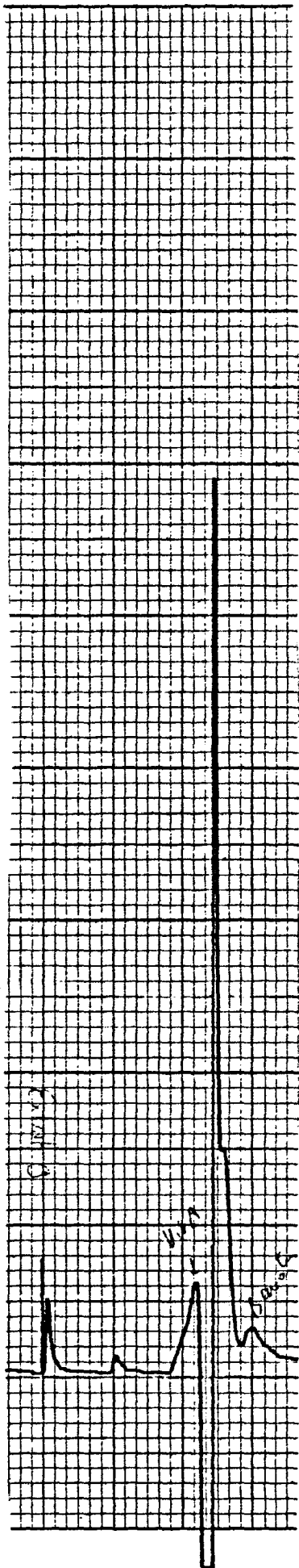
COURBE IX

Injection : 10 µl d'extrait n° 7



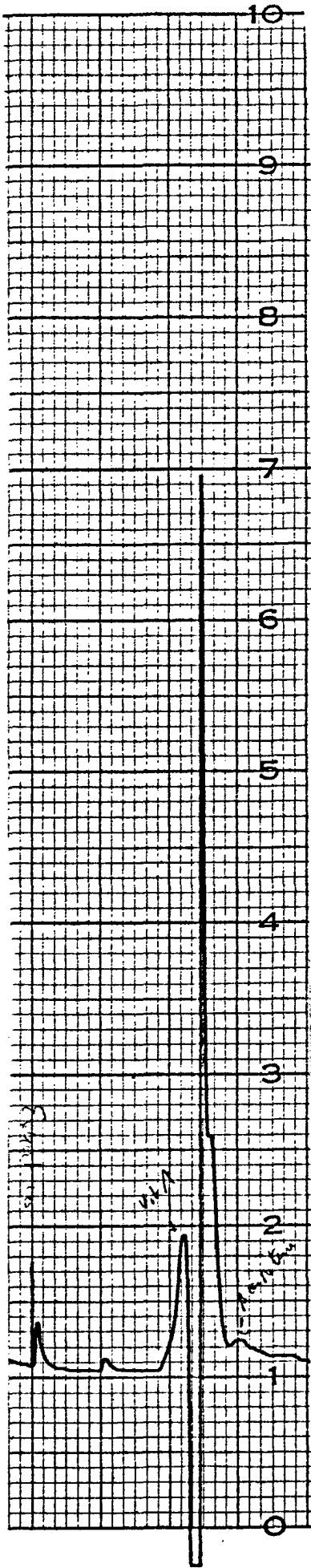
COURBE X

Injection : 10 μ l d'extrait n° 8



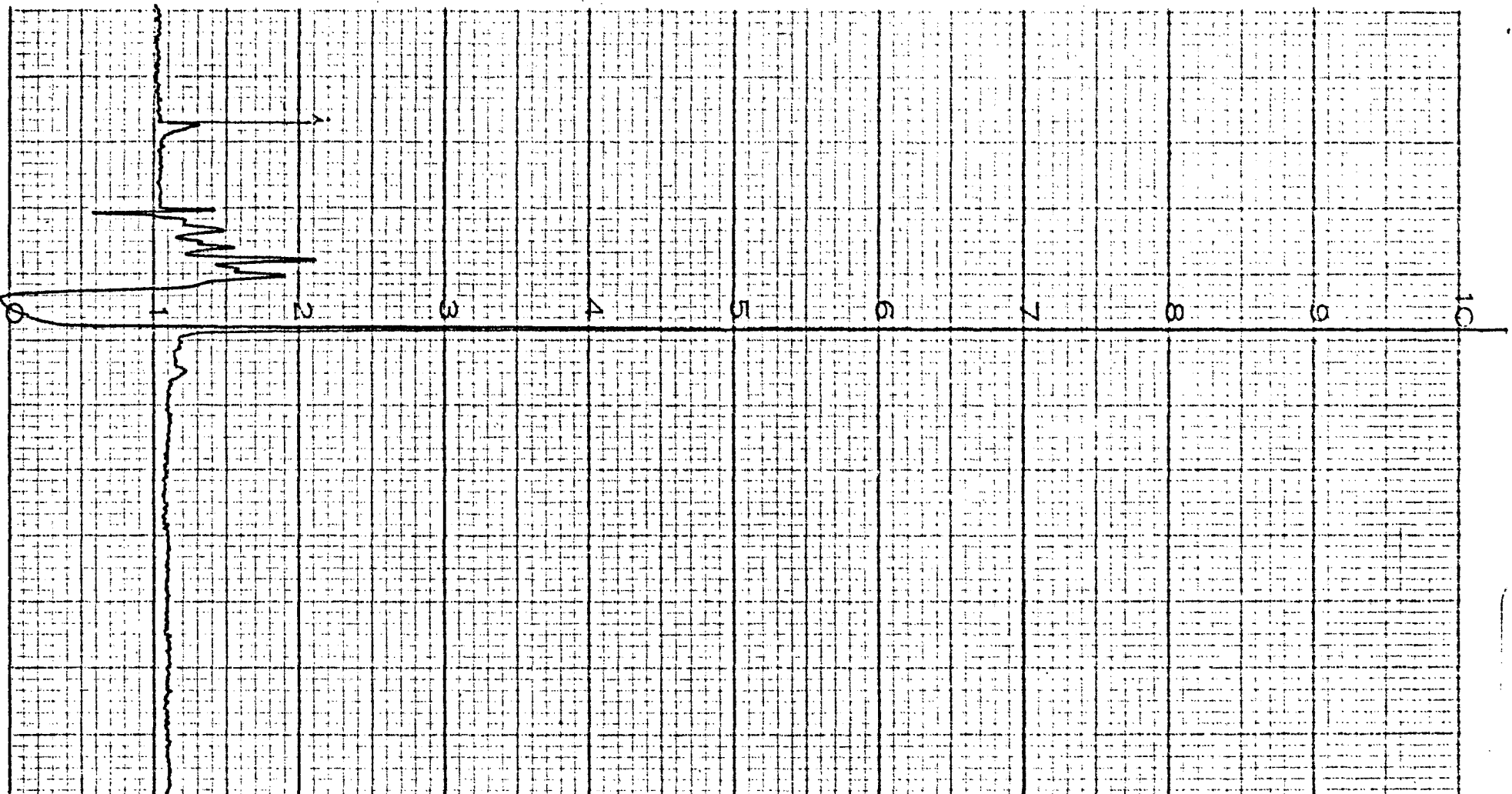
COURBE XI

Injection : 10 μ l d'extrait n° 9



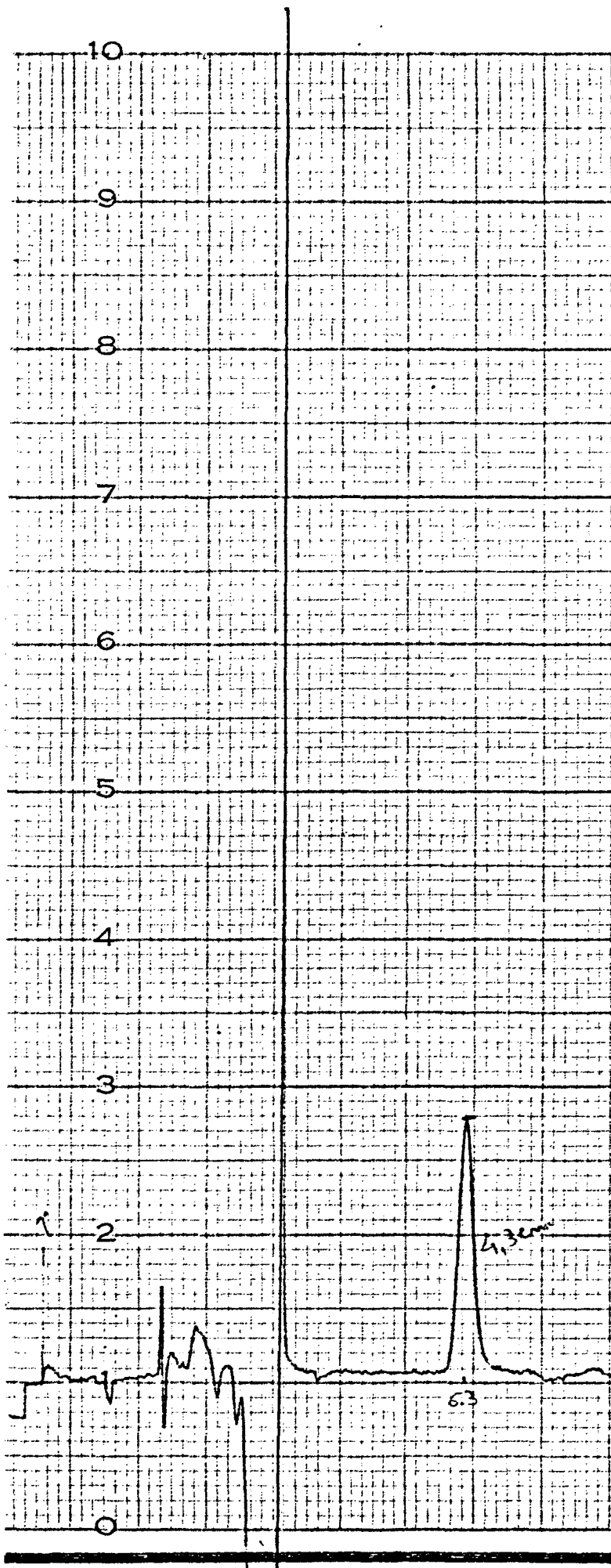
COURBE XII

Injection : 10 μ l d'extrait n° 10



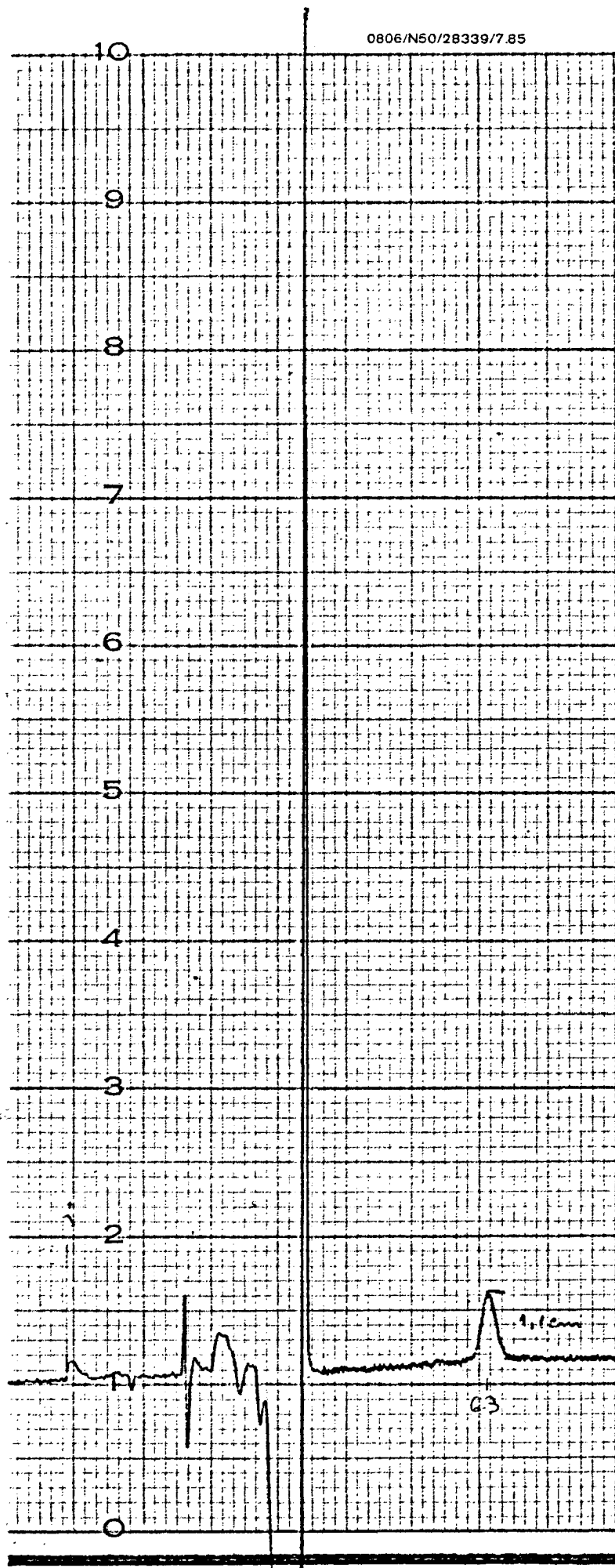
COURBE XIII

Injection : 10 μ l Heptane



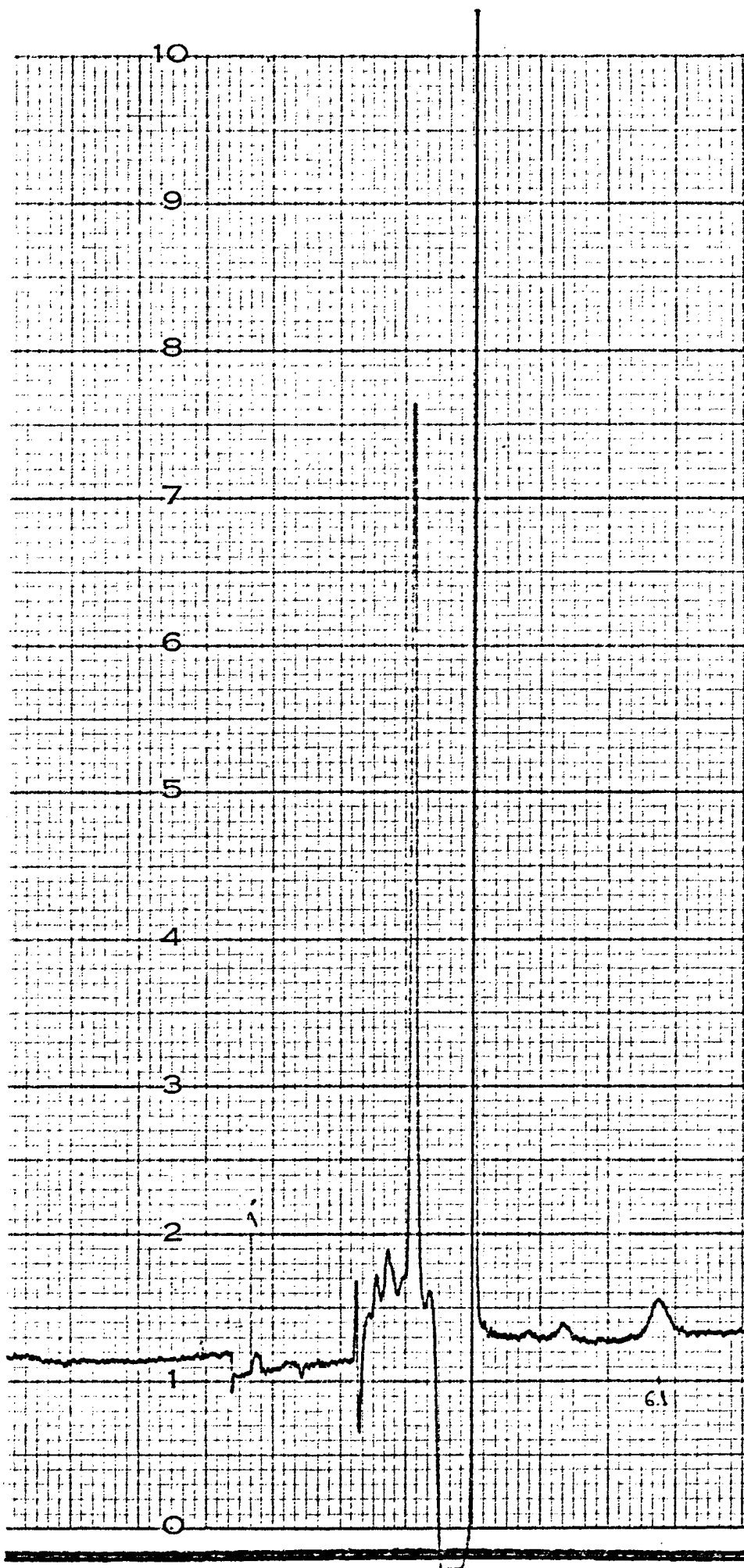
COURBE XIV

Injection : solution étalon
10 μ l acétate de vitamine A
dans Hexane de concentra-
tion 0,66 mg/100 ml



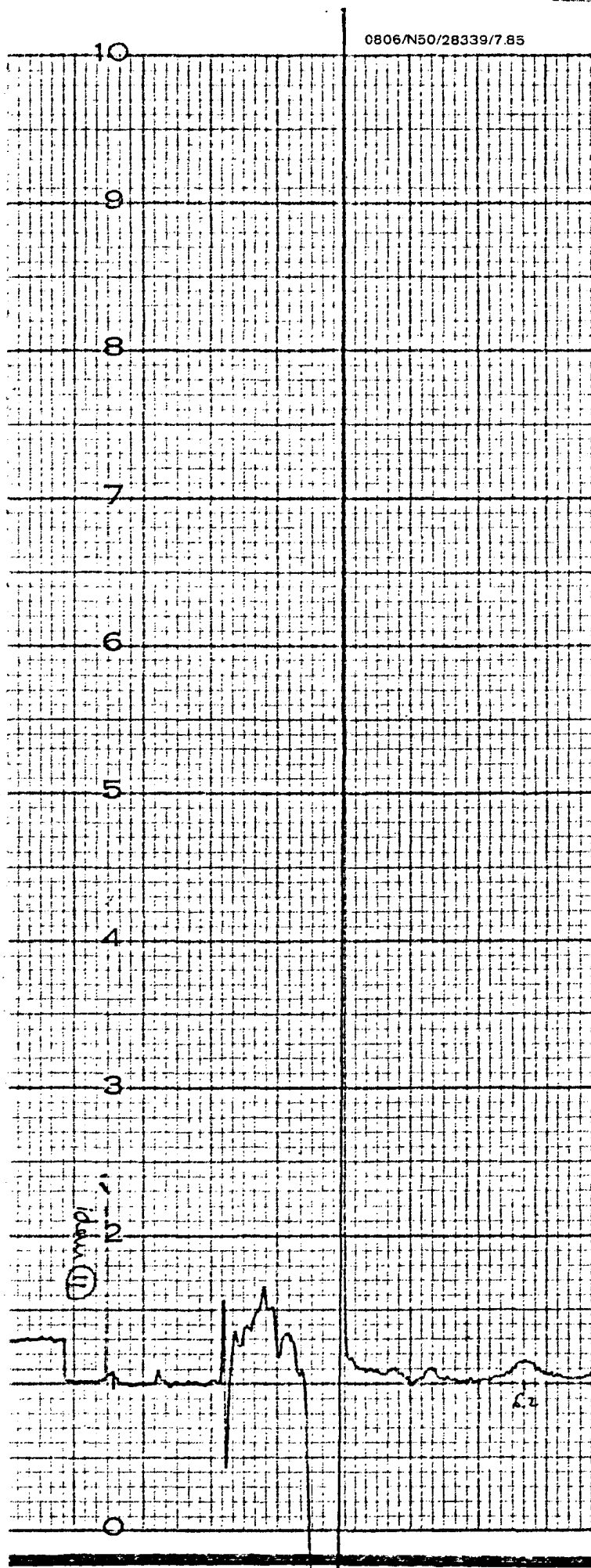
COURBE XV :

Injection : 10 μ l acétate vitamine A
dans hexane de concentra-
tion 0,165 mg/100 ml



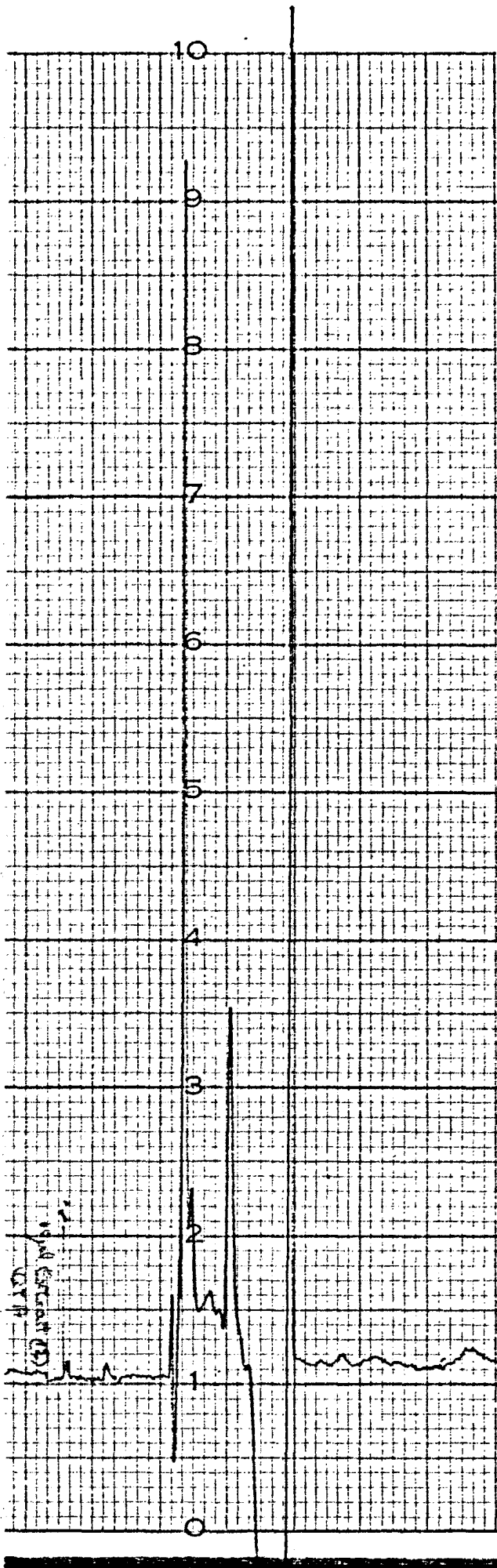
COURBE XVI :

Injection : 10 μ l extrait sur
Sargassum fraîche



COURBE XVII

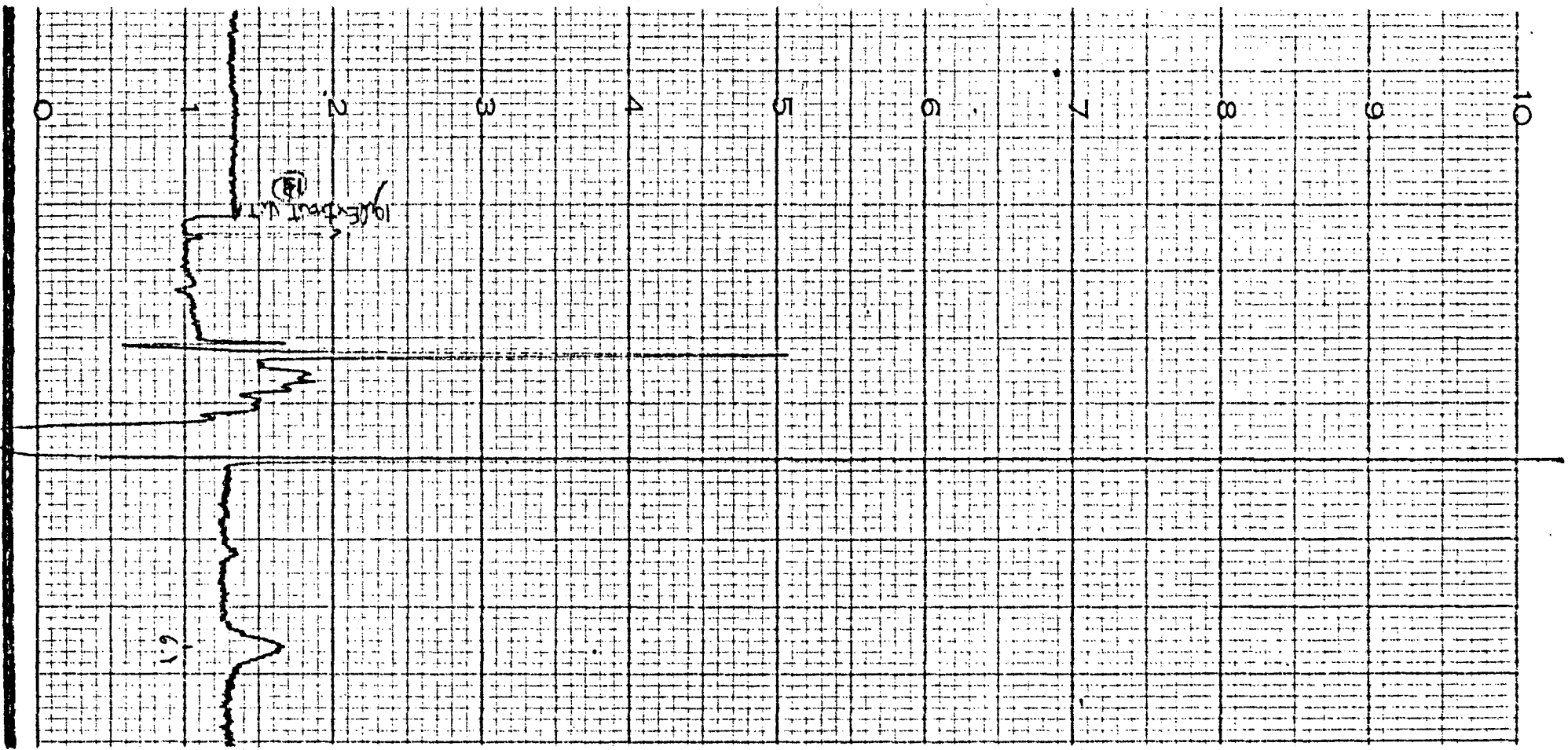
Injection : 10 μ l extrait n° 11

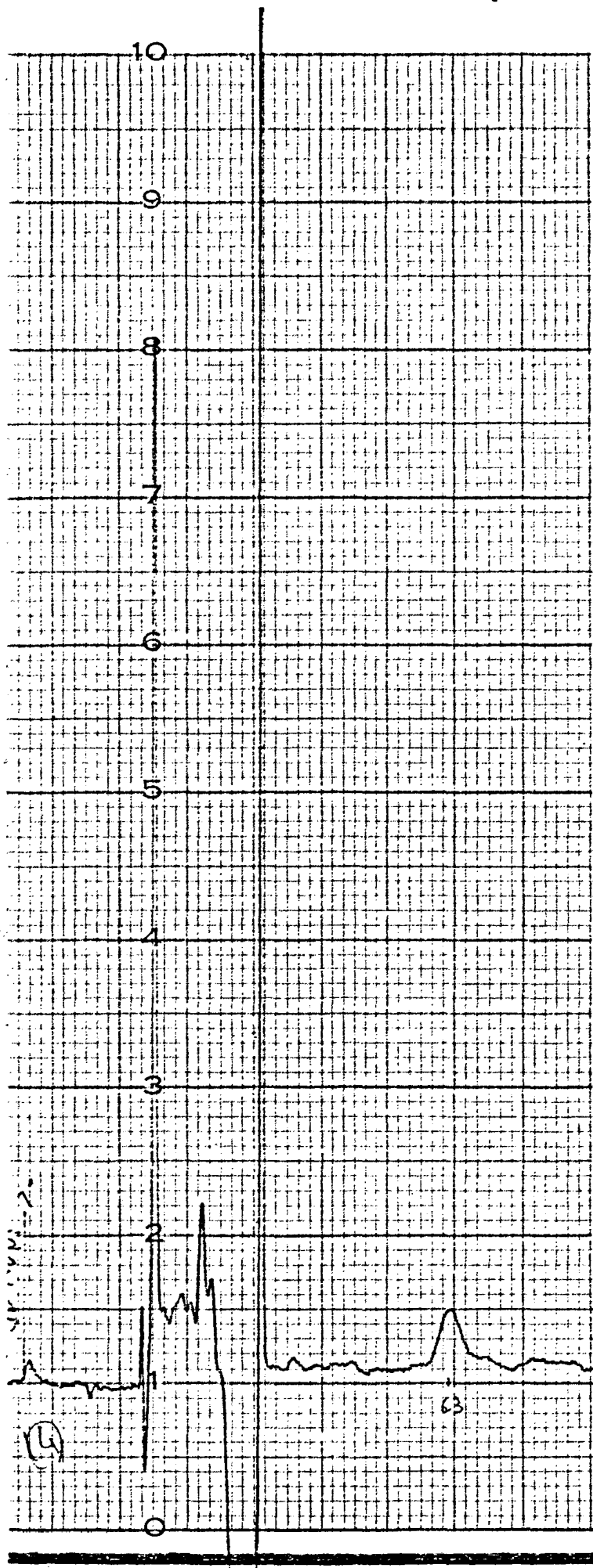


COURBE XVIII

Injection : 10 µl extrait n° 12

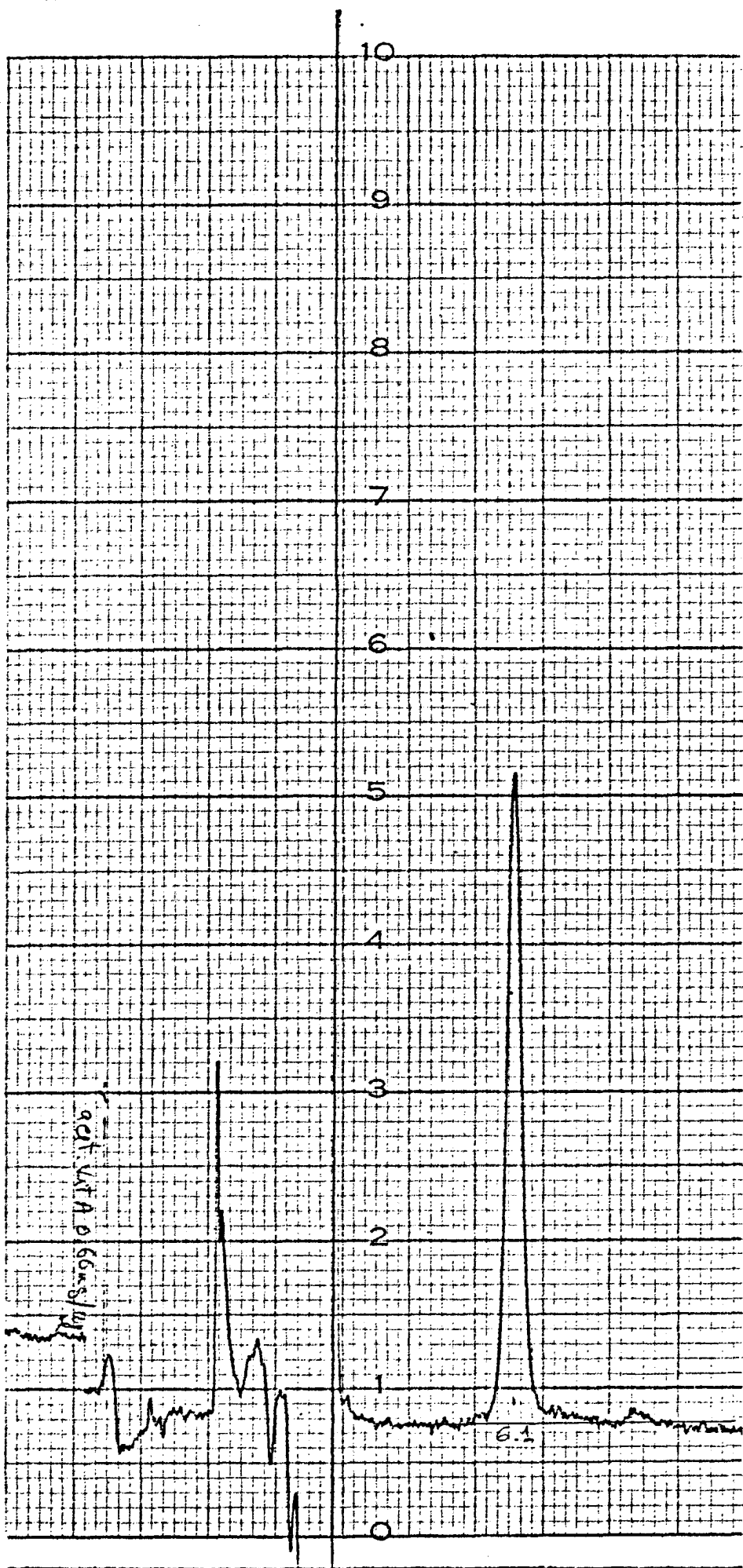
COURBE XIX
Injection : 10 µl extrait n° 13





COURBE XX

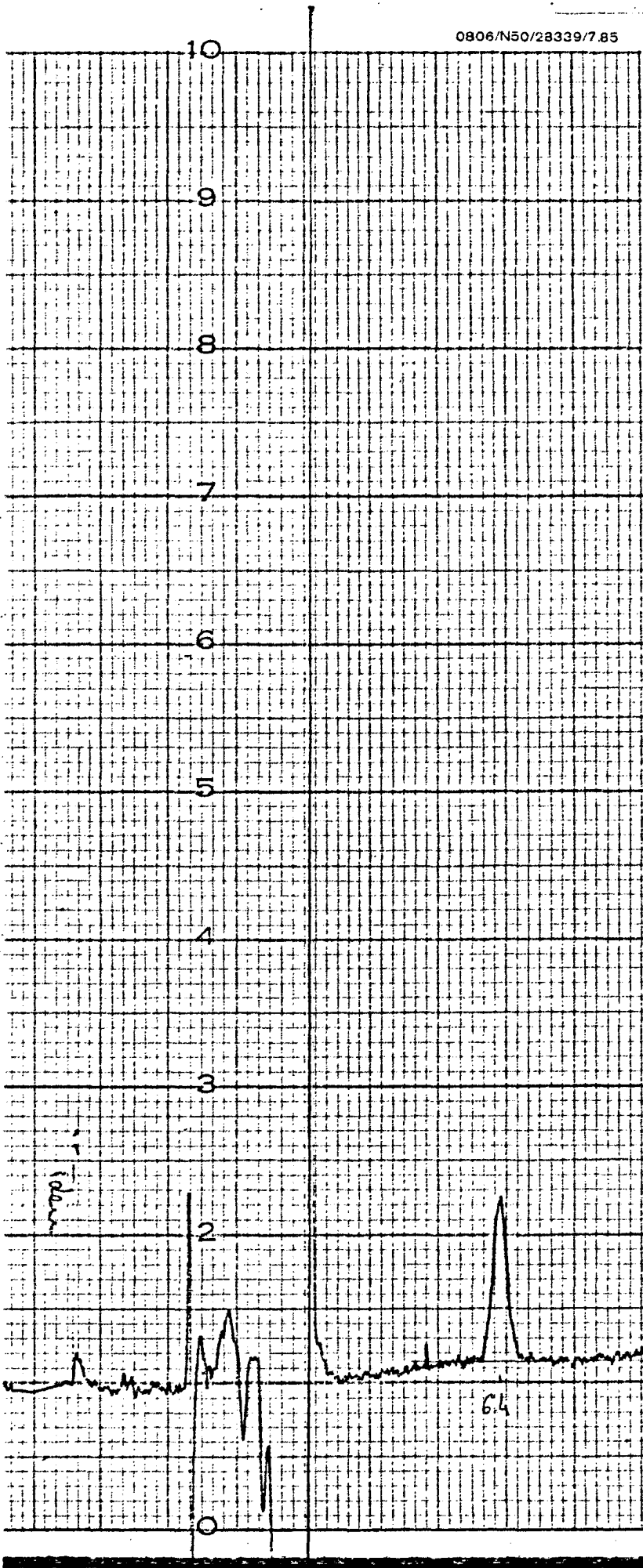
Injection : 10 μ l extrait n° 14



COURBE XXI

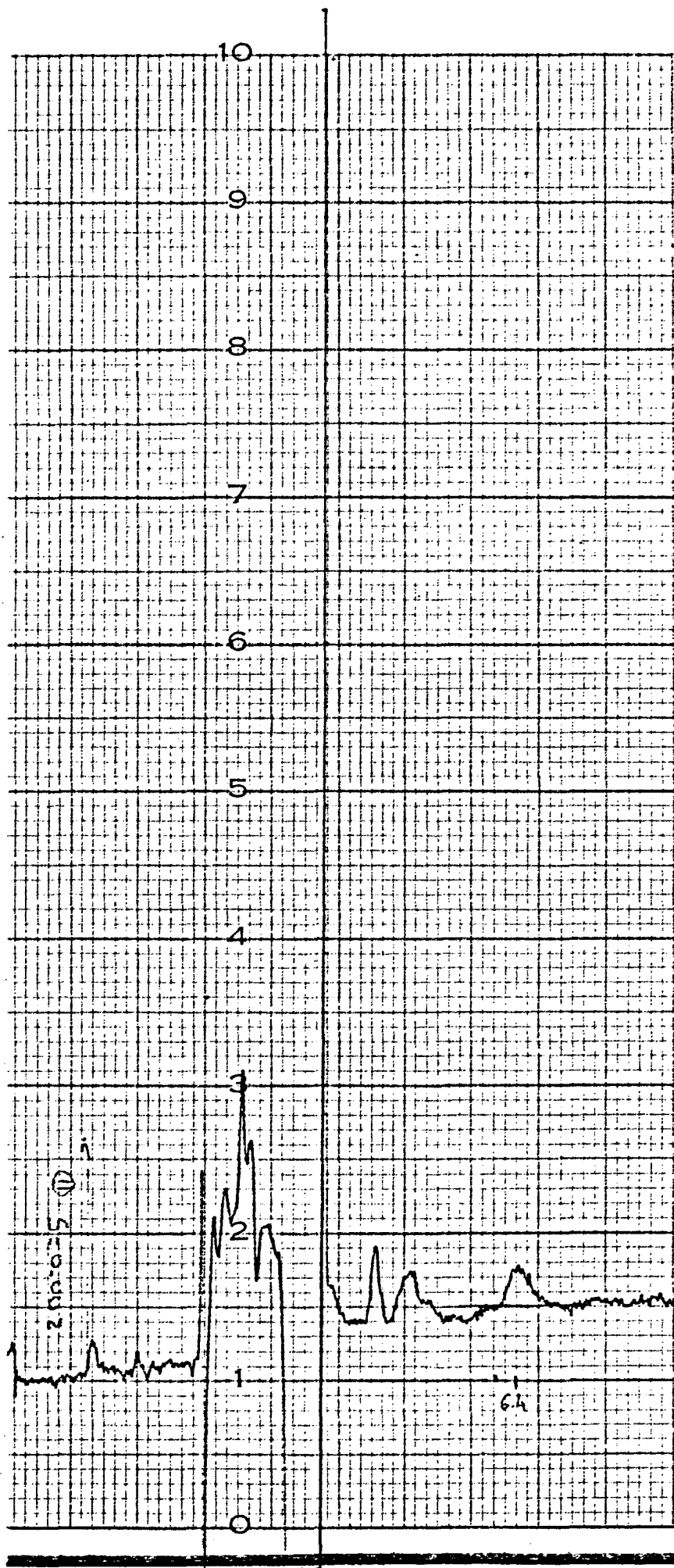
Injection : 10 μ l étalon acétate
Vitamine A dans l'hexane
de concentration 0,66 mg/
100 ml avec une sensibilité
de 0,002.

0806/N50/28339/7.85

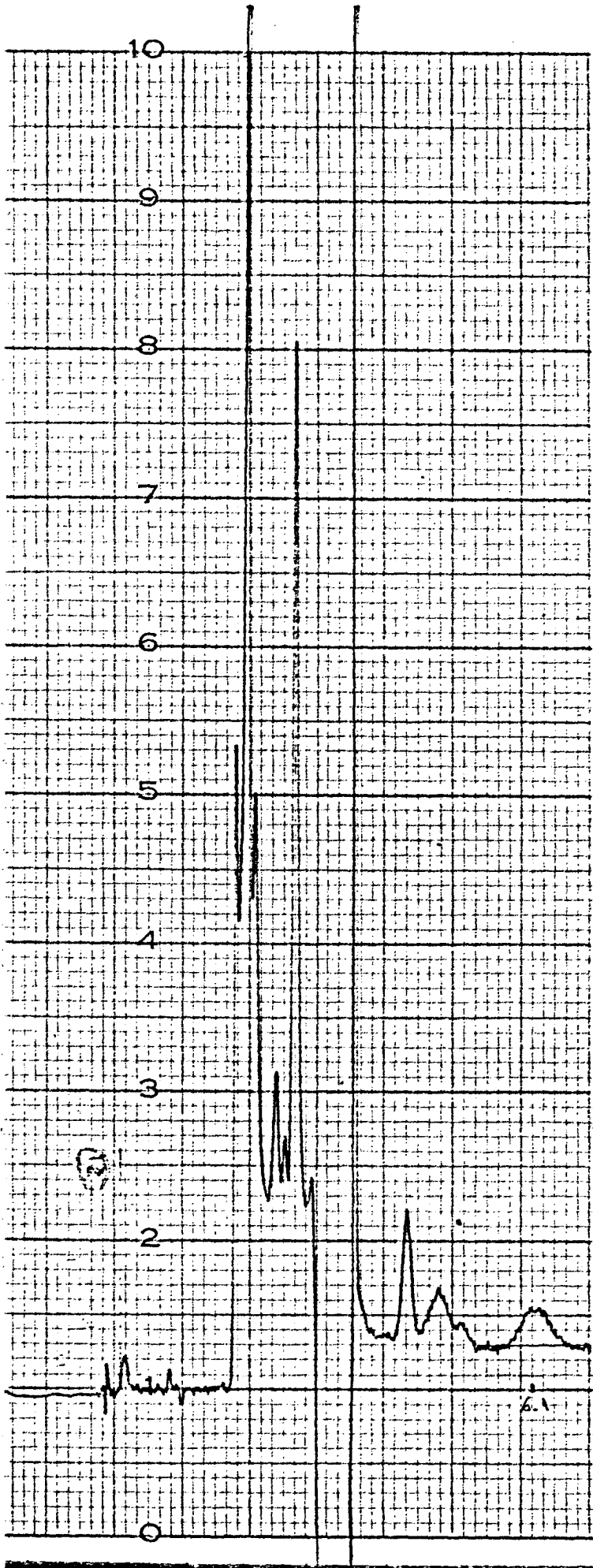


COURBE XXII

Injection : 10 μ l étalon acétate de
vitamine A dans l'hexane
de concentration
0,165 mg/100 ml

COURBE XXIII

* $S = 0,002$
Injection : 10 μ l extrait n° 11

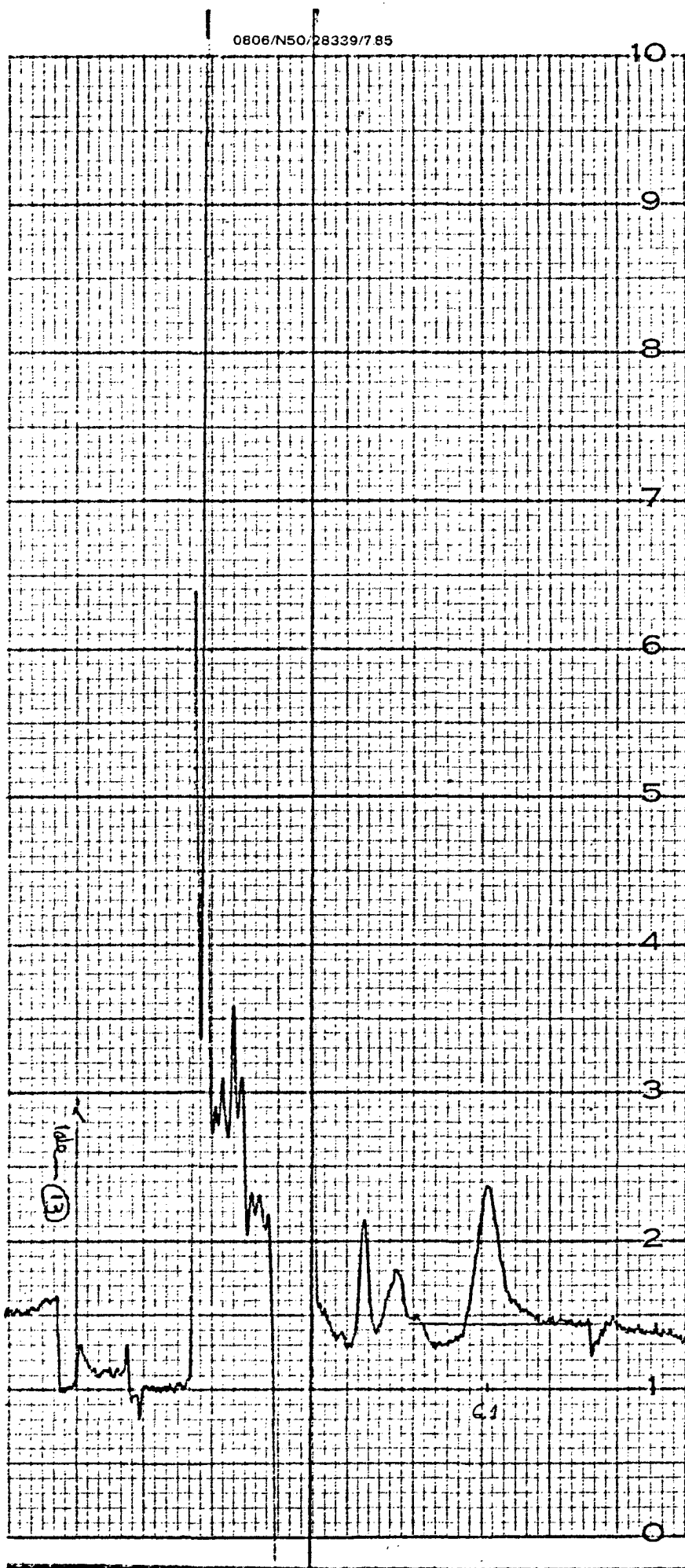


COURBE XXIV

* S = 0,002

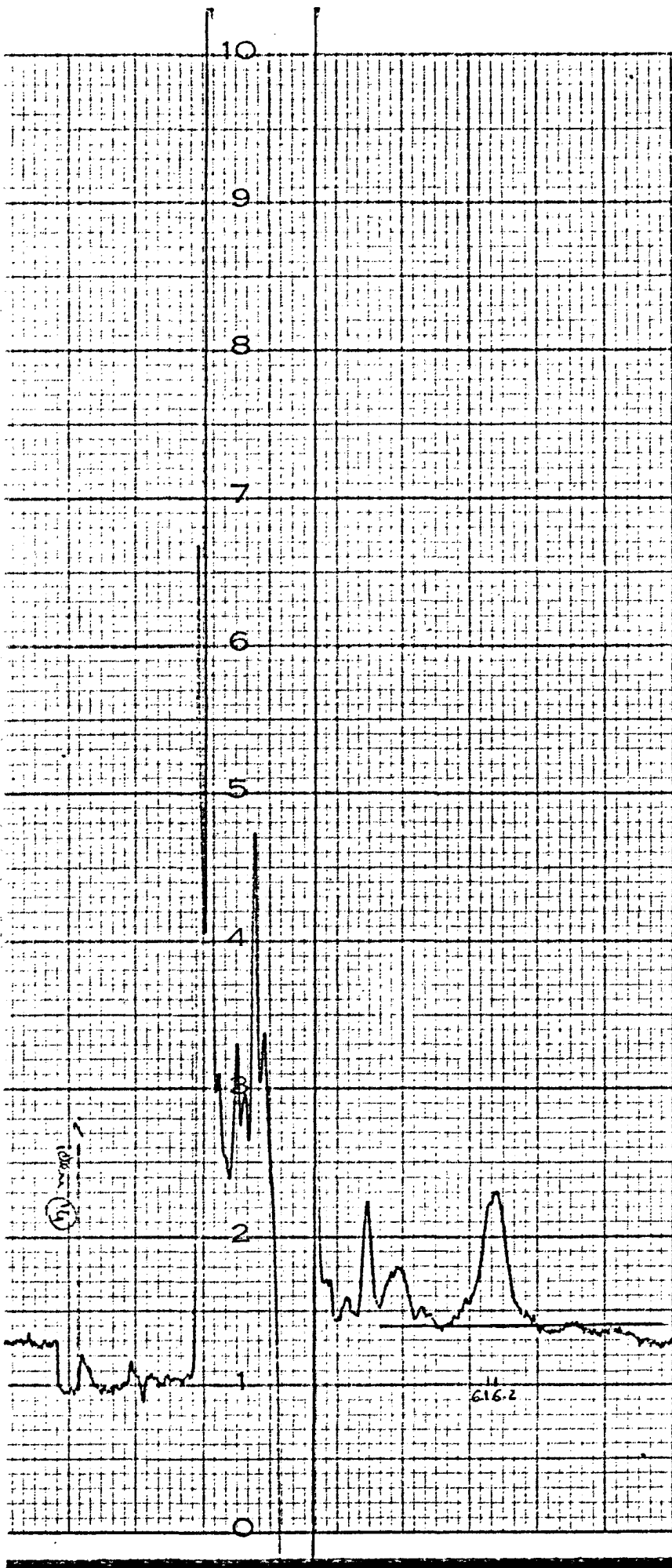
Injection : 10 μ l extrait n° 12

0806/N50/28339/785

COURBE XXV

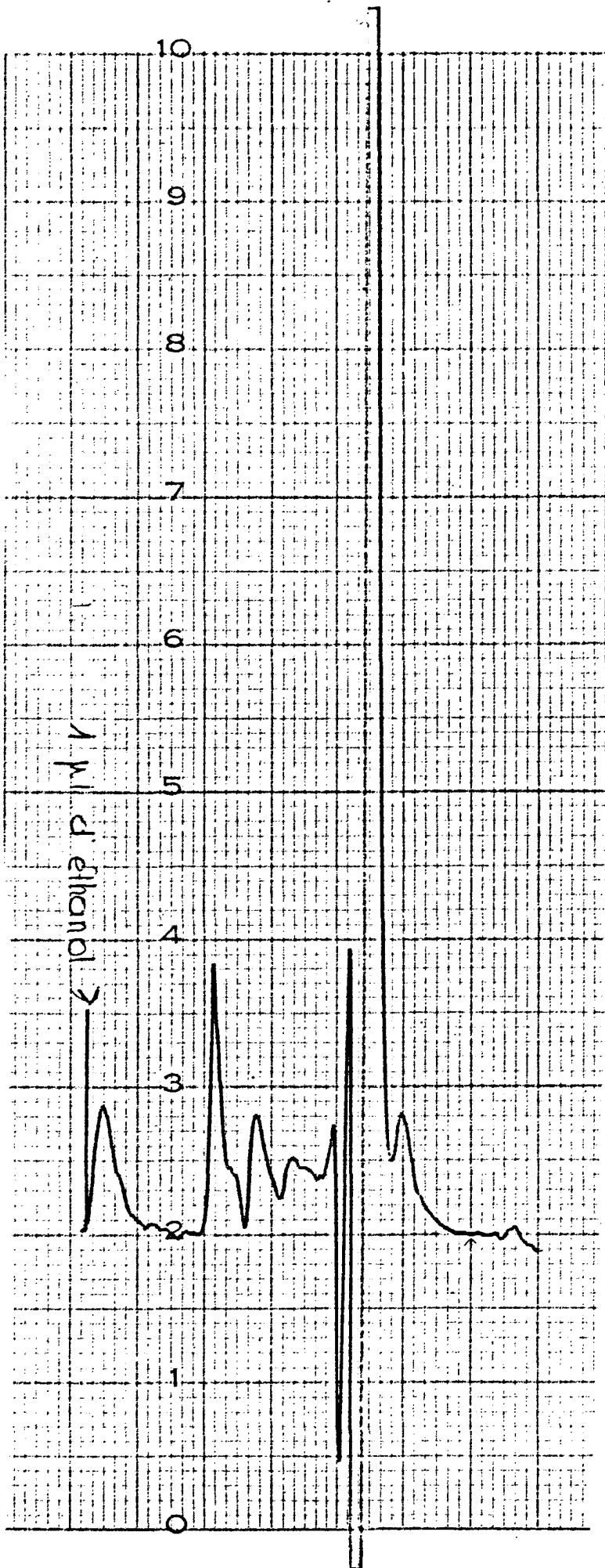
* S = 0,002

Injection : 10 μ l extrait n° 13



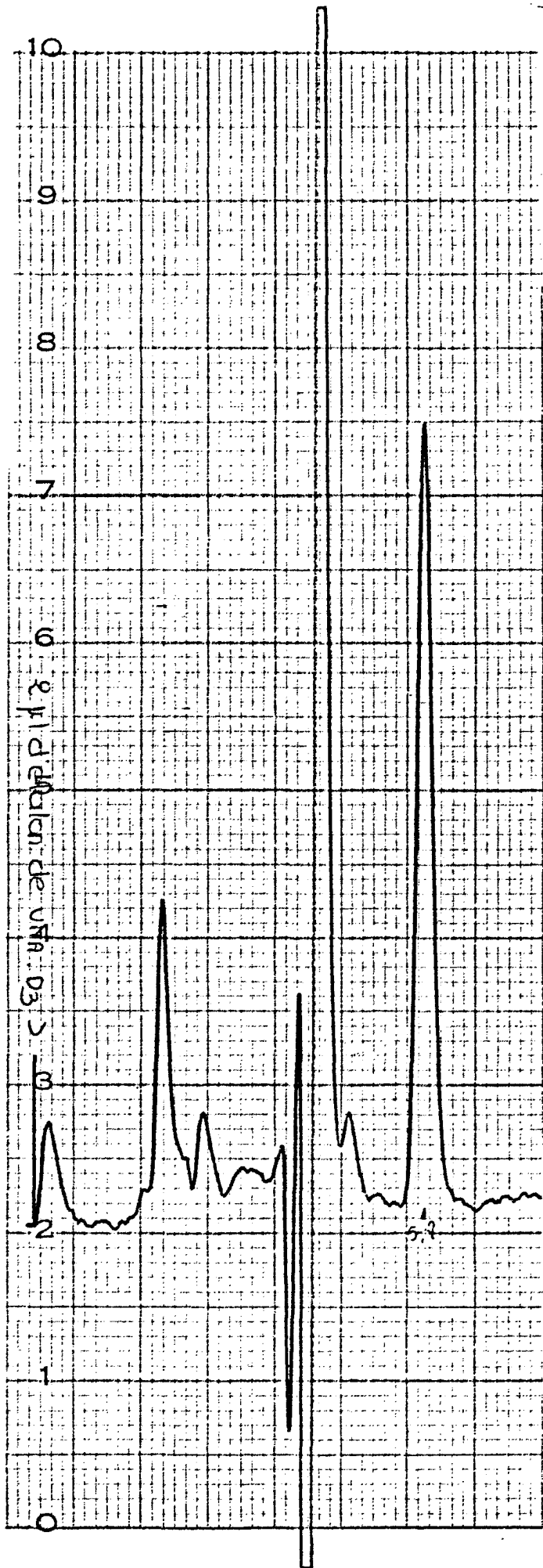
COURBE XXVI

* S = 0,002
Injection : 10 μ l extrait n° 14



COURBE I

Injection : 1 µl d'ethanol

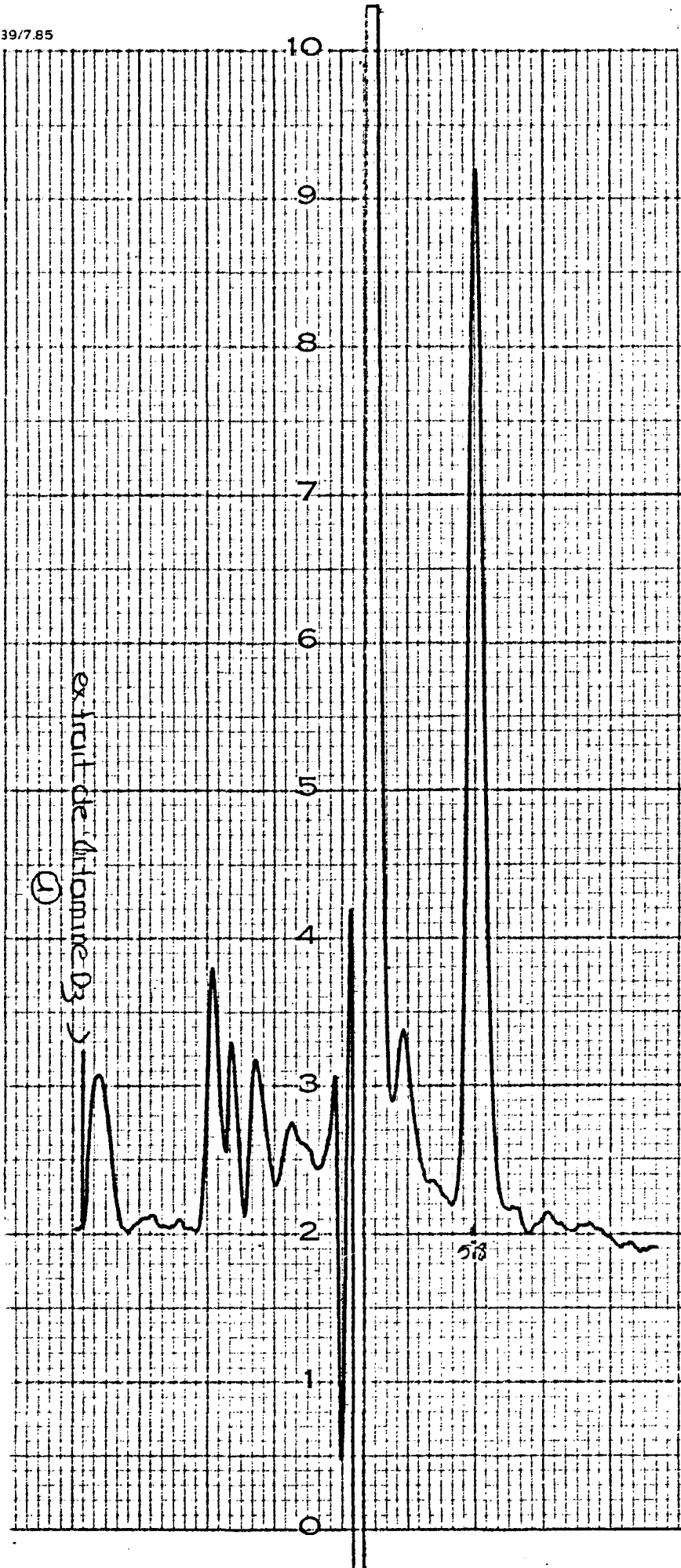


COURBE II

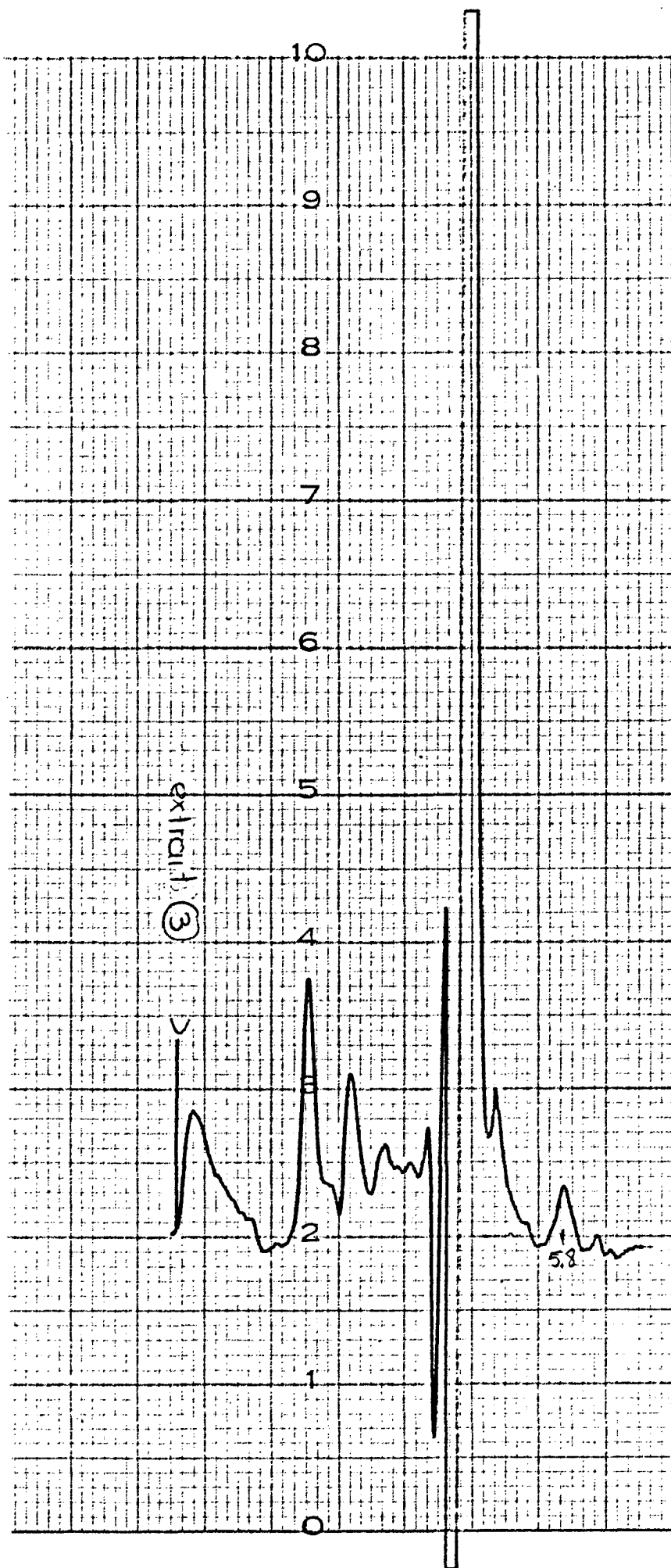
Injection : 2 µl de solution étalon
de vitamine D₃
4010⁻⁵ µg/l

4 10⁻⁶ MUI/l

39/7.85

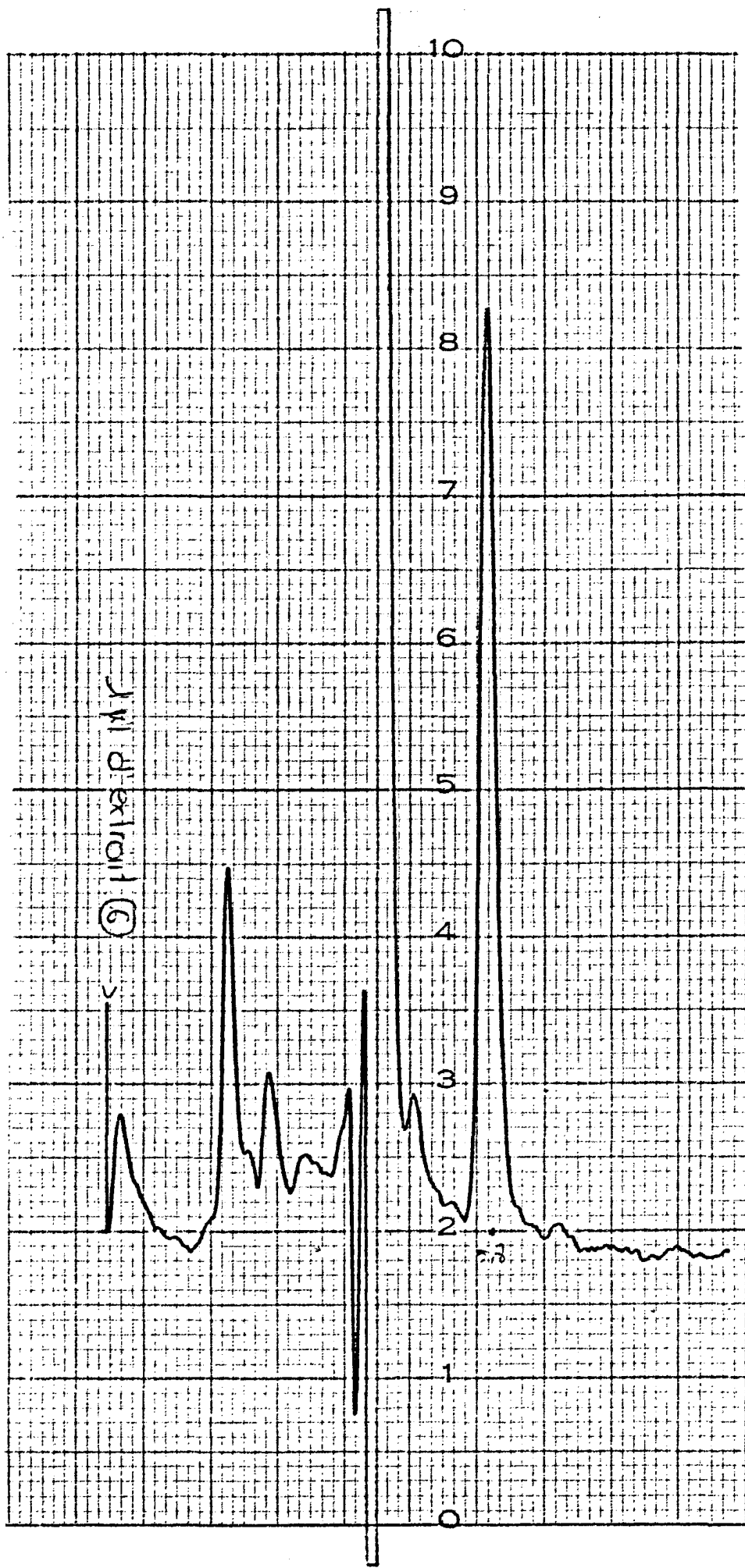
COURBE III

Injection : 1 μ l d'extrait n° 1
de vitamine D₃



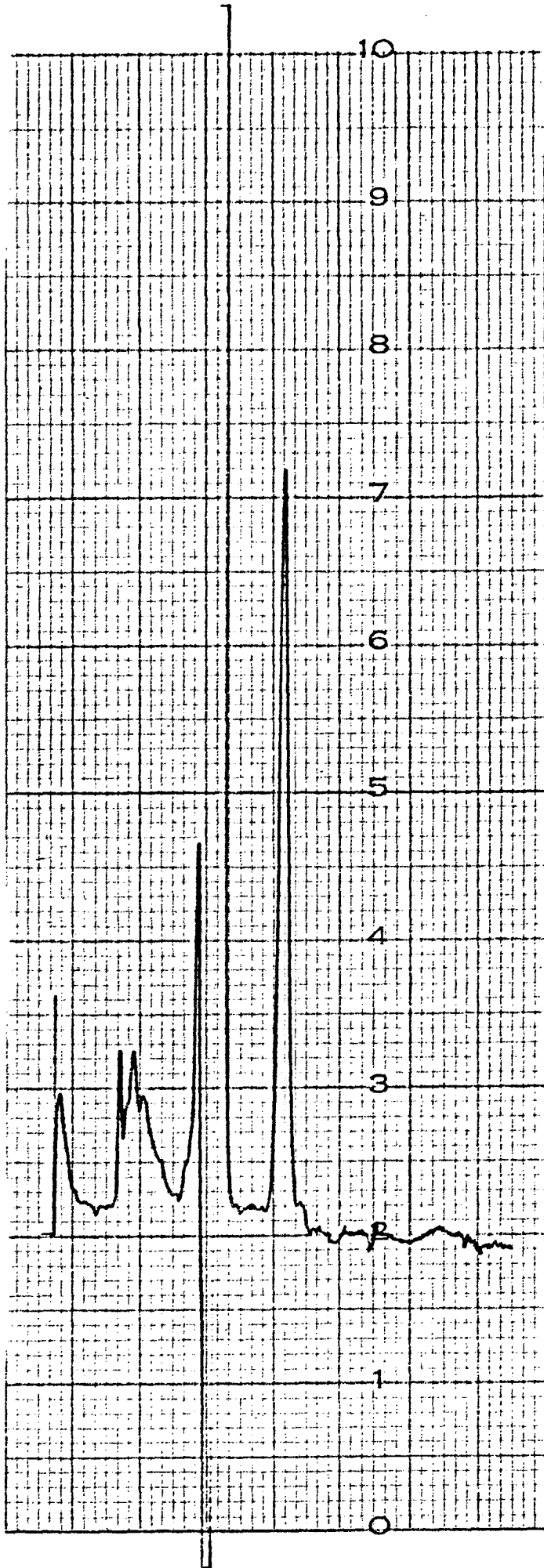
COURBE IV

Injection : 1 μ l d'extrait n° 3
de vitamine D₃



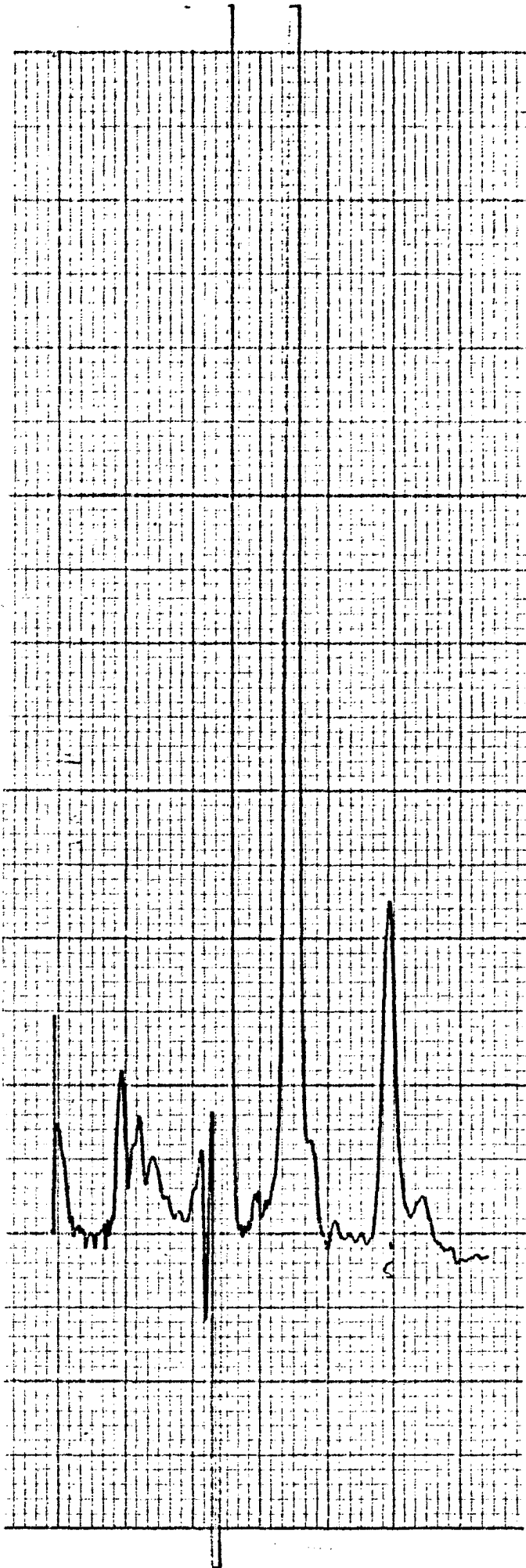
COURBE V

Injection : 1 μ l d'extract n° 5
de vitamine D₃



COURBE VI

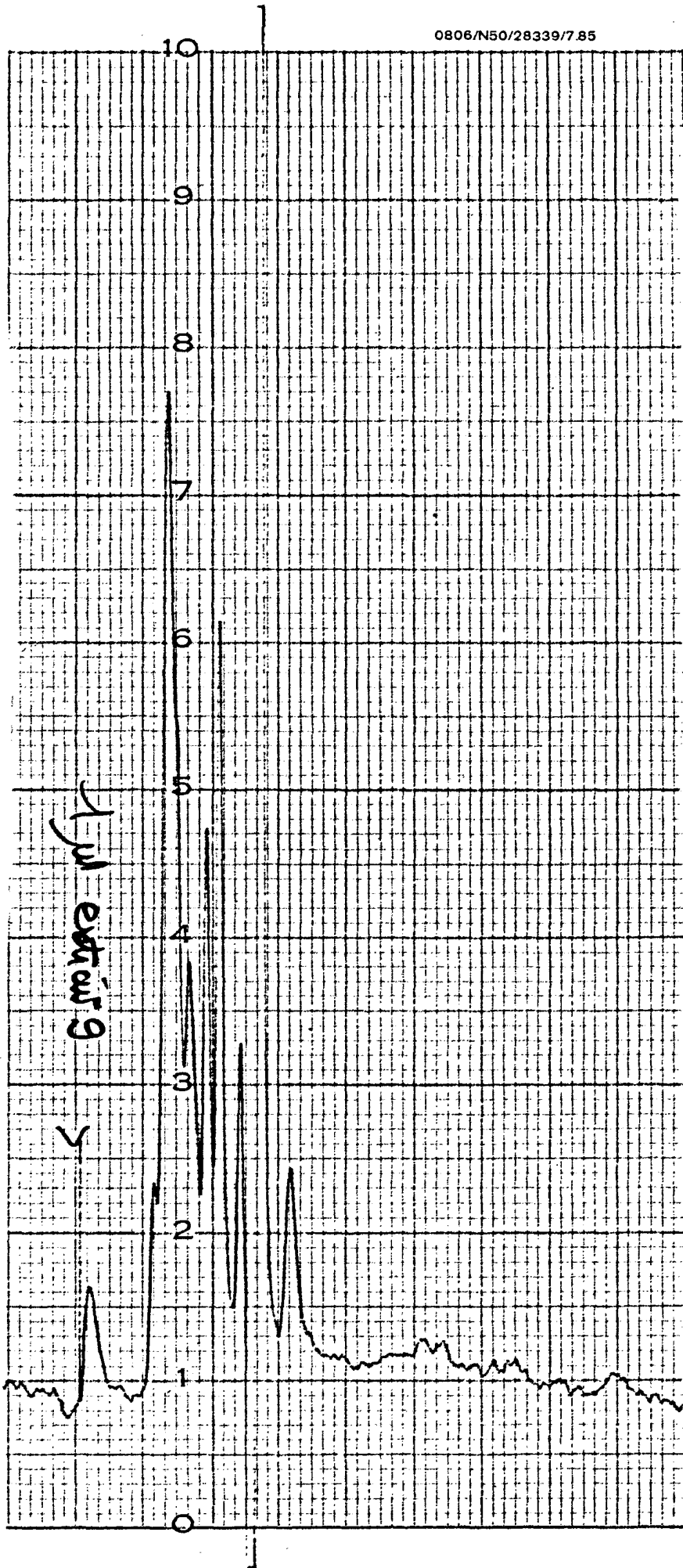
Injection : 1 μ l d'éthanol



COURBE VII

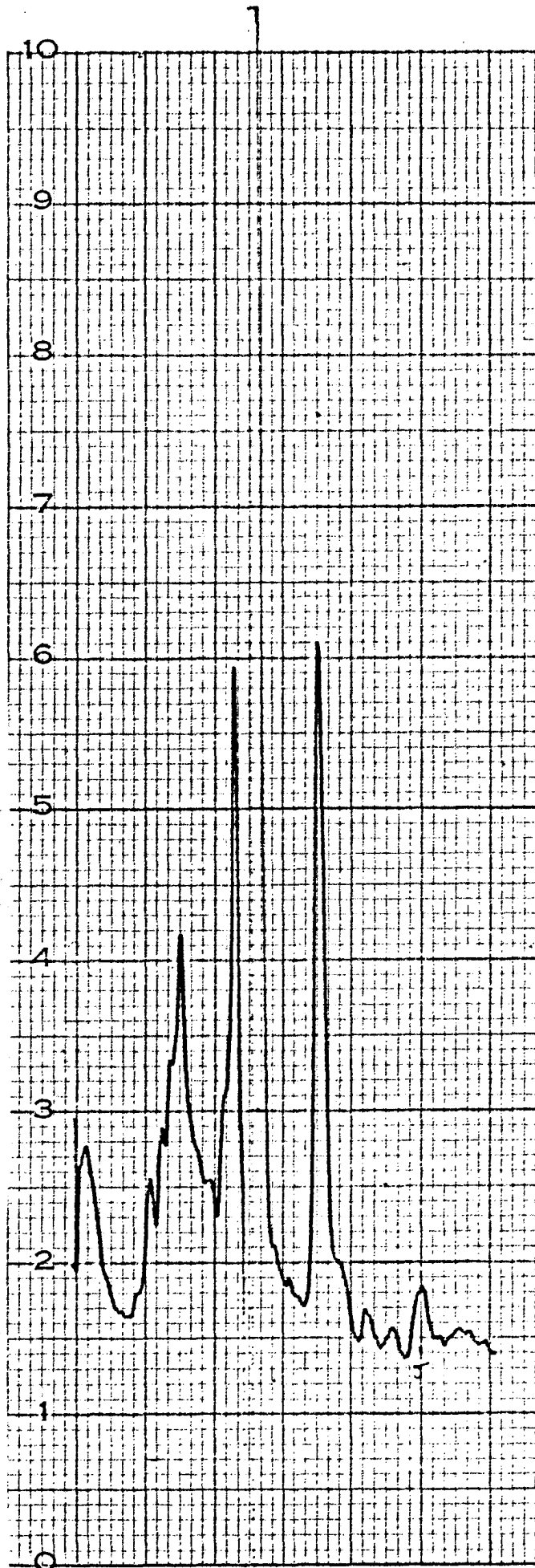
Injection : 1 μ l de solution étalon
de vitamine D₃
4.10⁻⁵ MUI/l

0806/N50/28339/7.85



Courbe VII Bis

Injection : 1 µl d'ex-
trait n° 9

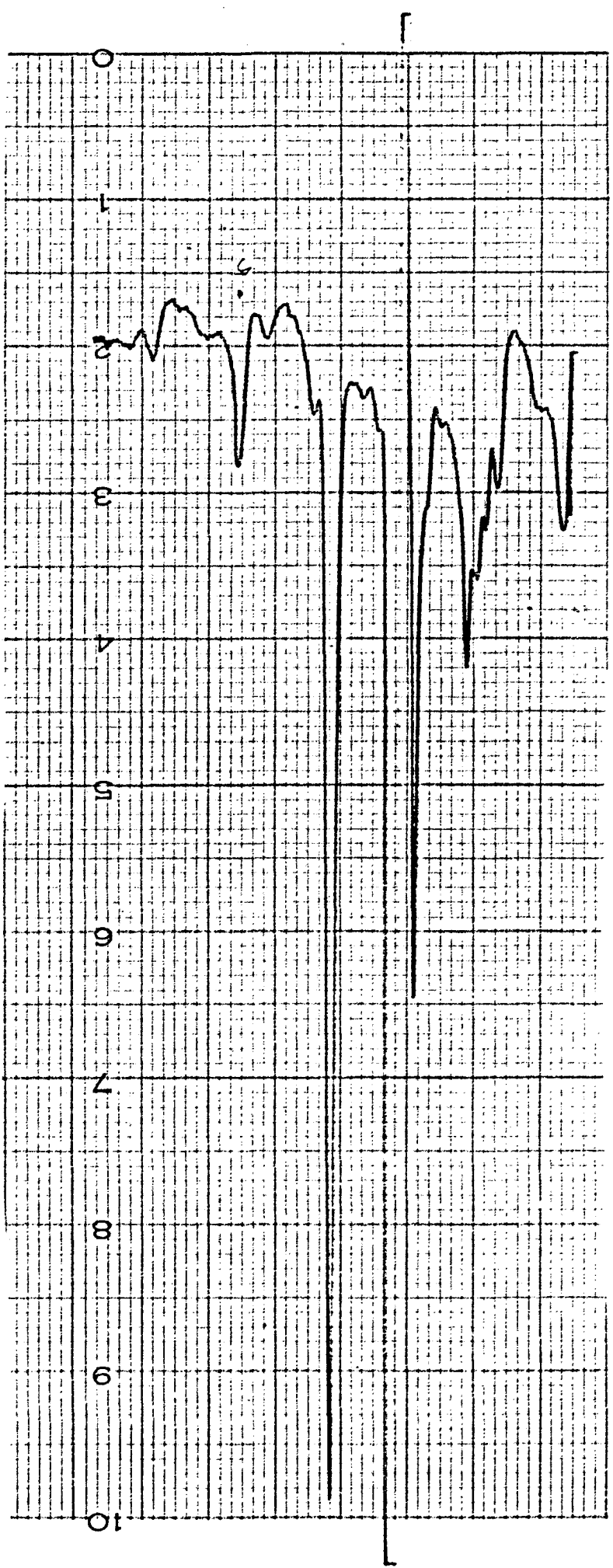


COURBE VIII

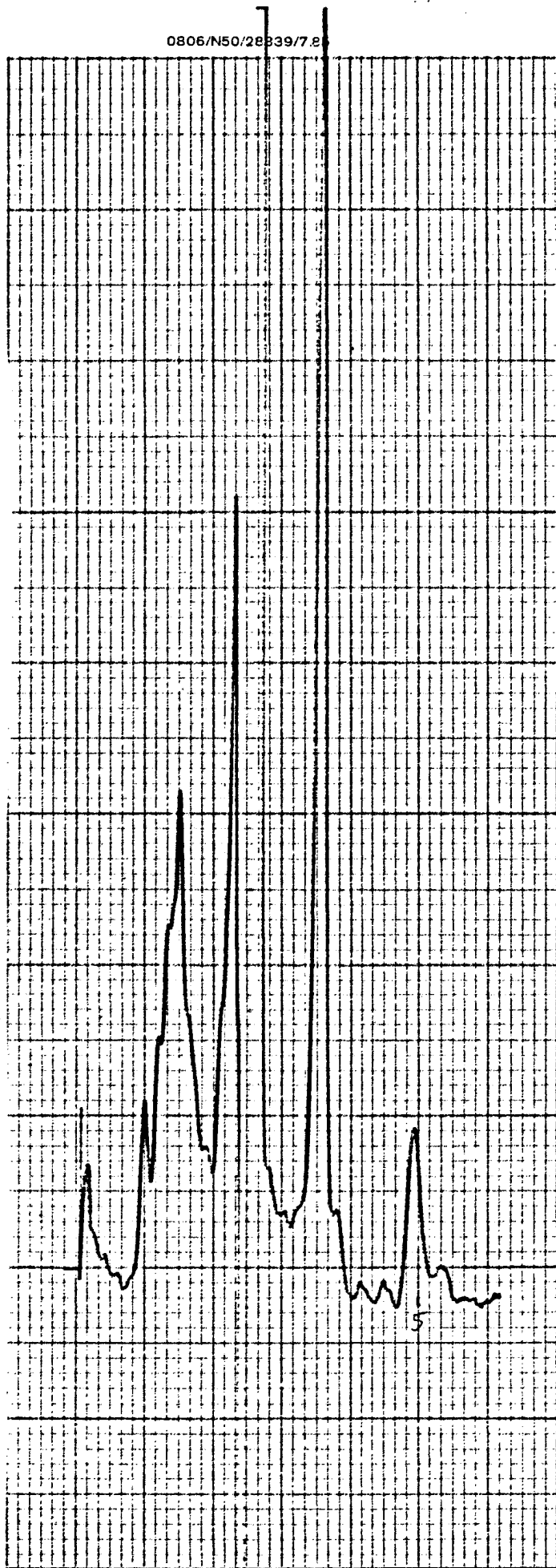
Injection : 1 μ l d'extrait n° 11
de vitamine D₃

Injection : 1 ml d'extrait n° 13
de vitamine D₃

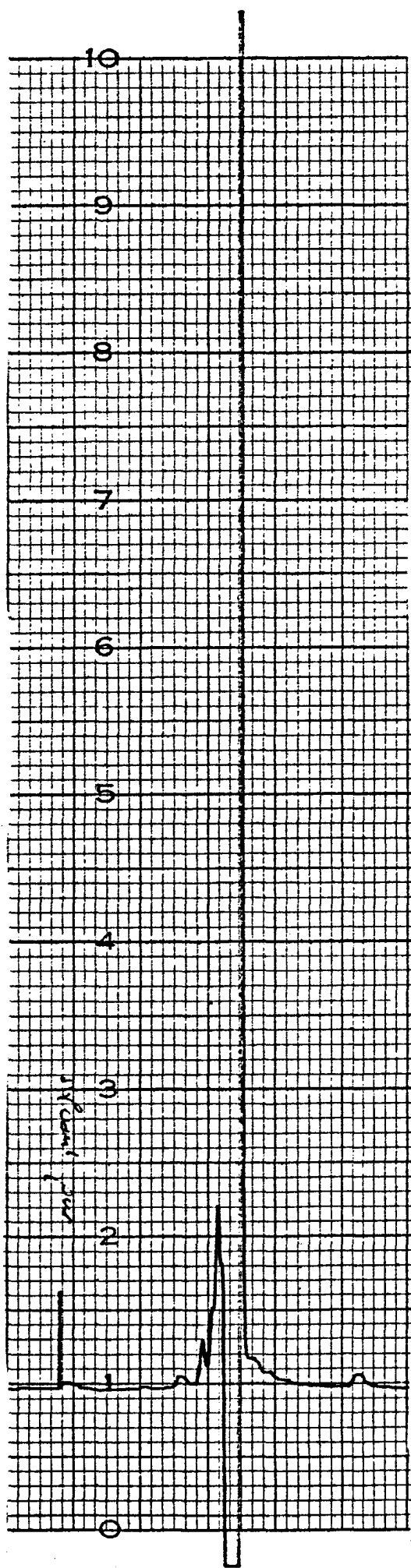
COURBE IX



0806/N50/28339/7.2

COURBE X

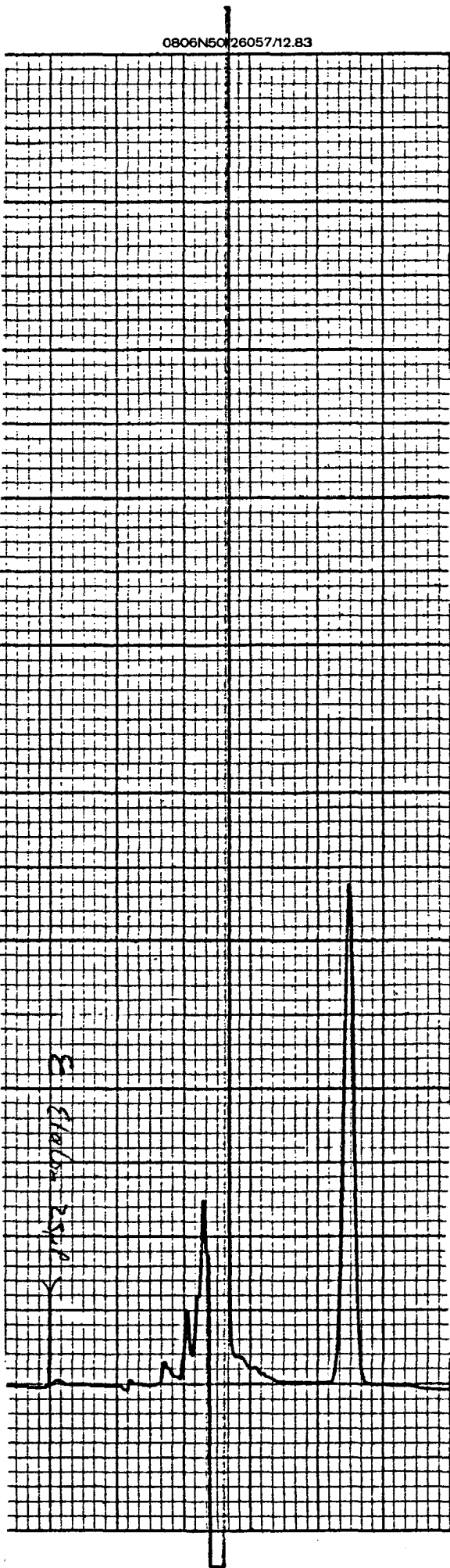
Injection : 1 μ l d'extract n° 14
de vitamine D₃



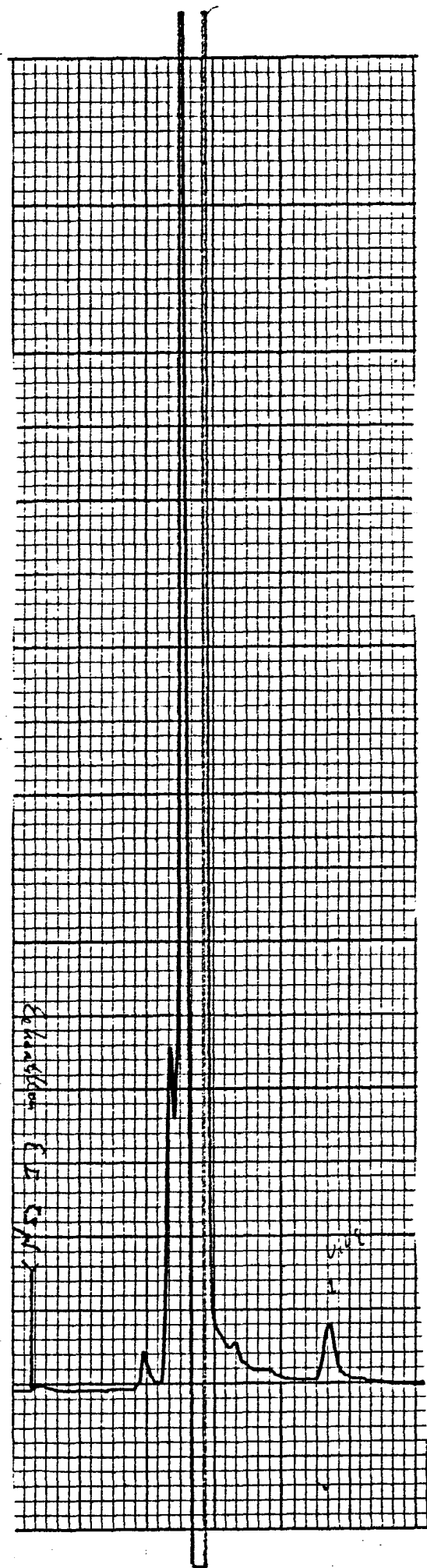
COURBE I

Injection : 10 μ l d'heptane

0806N50/26057/12.83

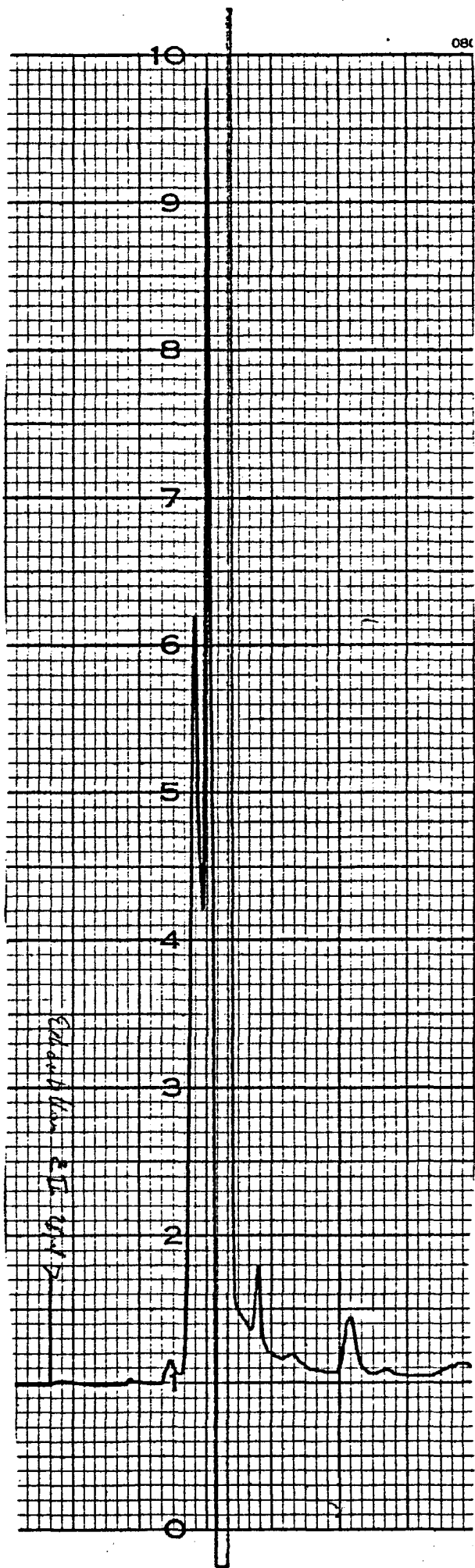
COURBE II

Injection : 25 μ l de la solution étalon
de concentration 0,992 mg/l
d' α tocophérol



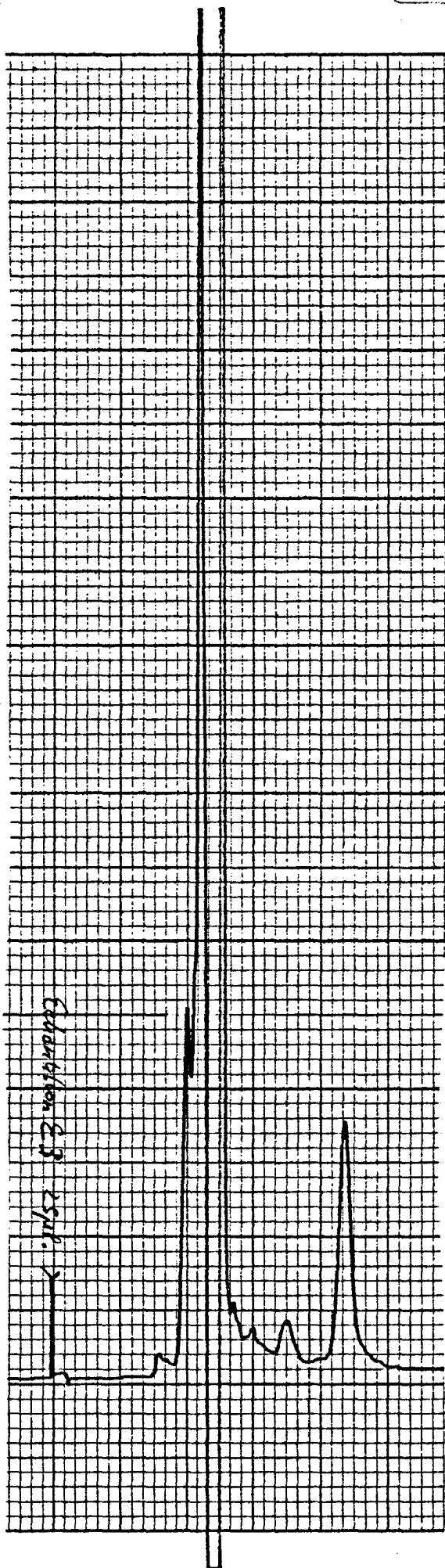
COURBE III

Injection : 25 μ l d'extrait n° 1



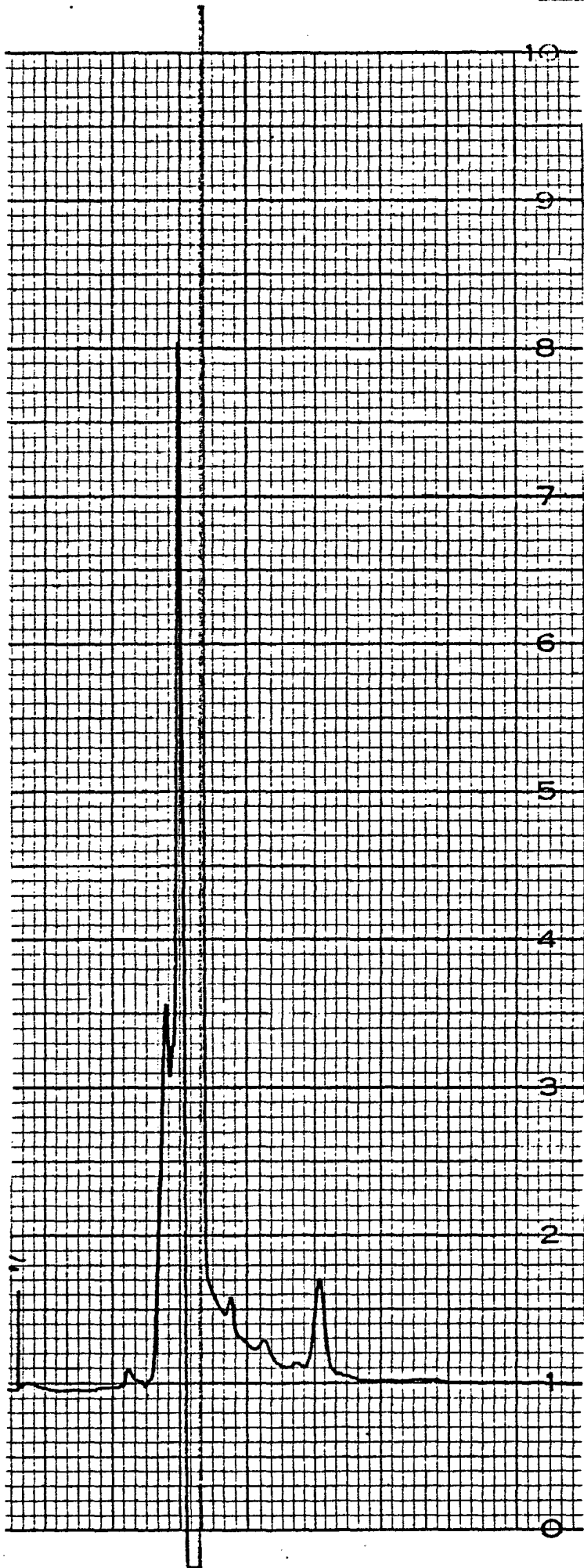
COURBE IV

Injection : 25 µl d'extrait n° 2



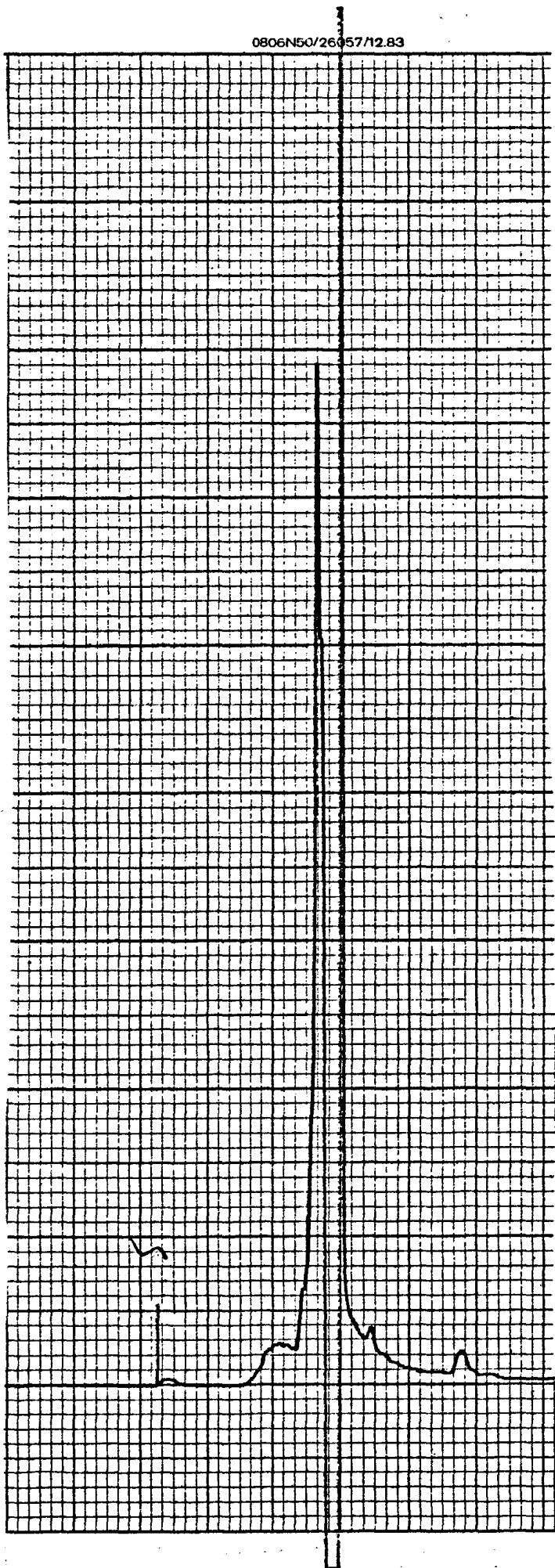
COURBE V

Injection : 10 µl d'extrait n° 3



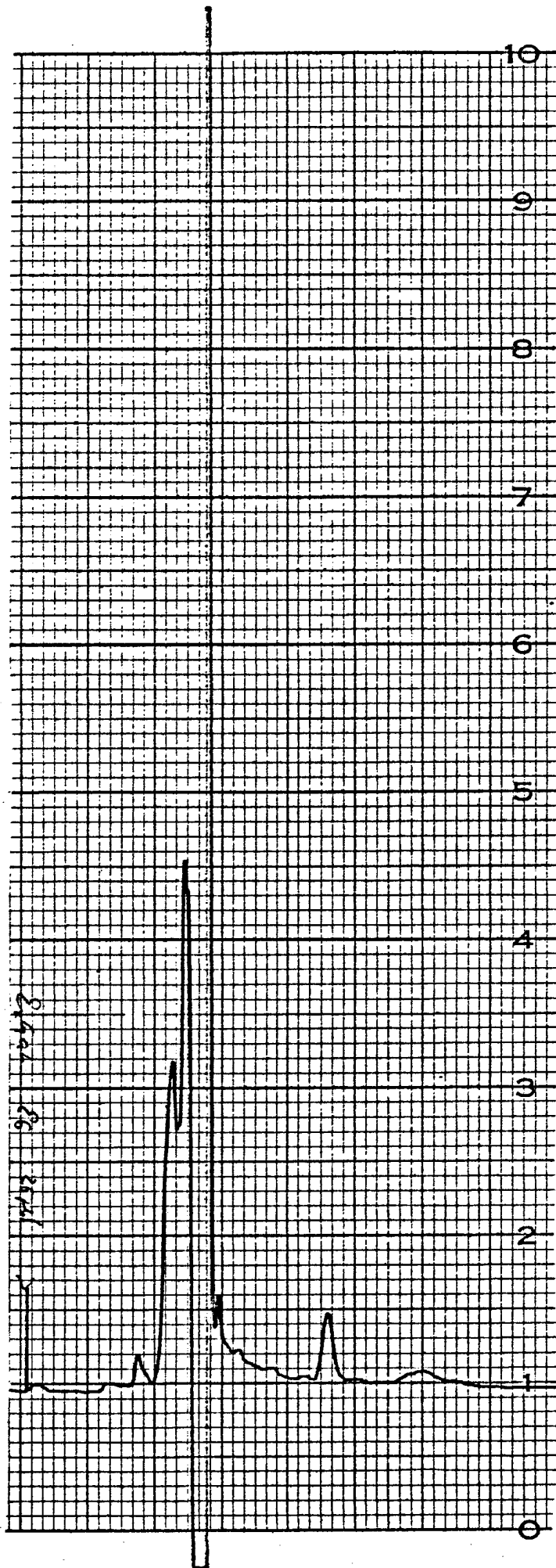
COURBE VI

Injection : 10 μ l d'extrait n° 4



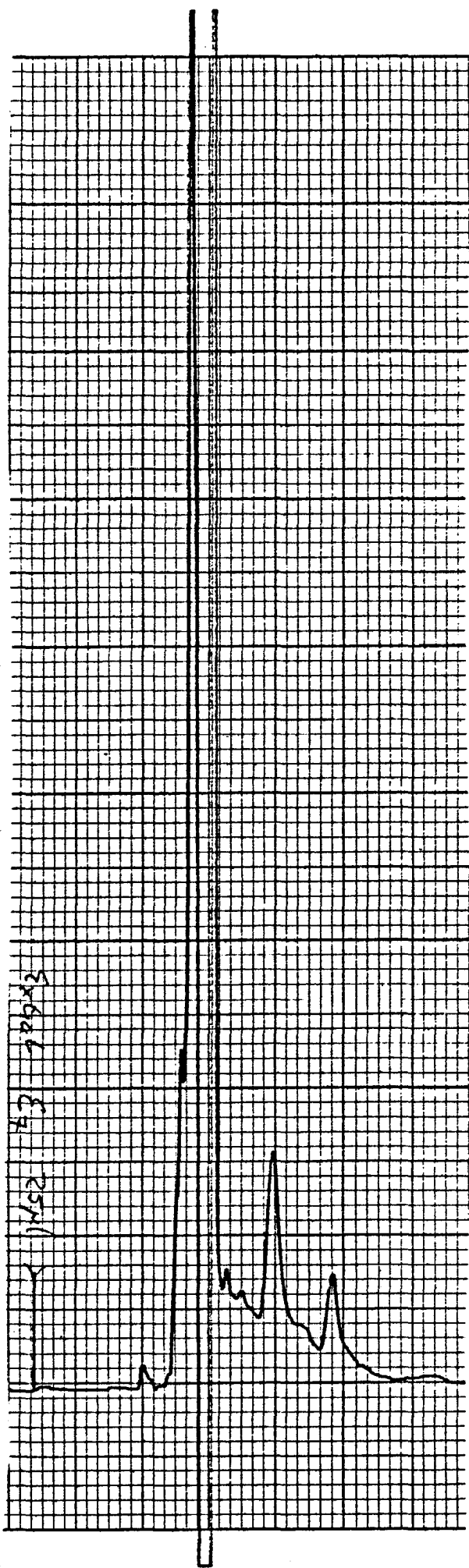
COURBE VII

Injection : 25 μ l d'extrait n° 5



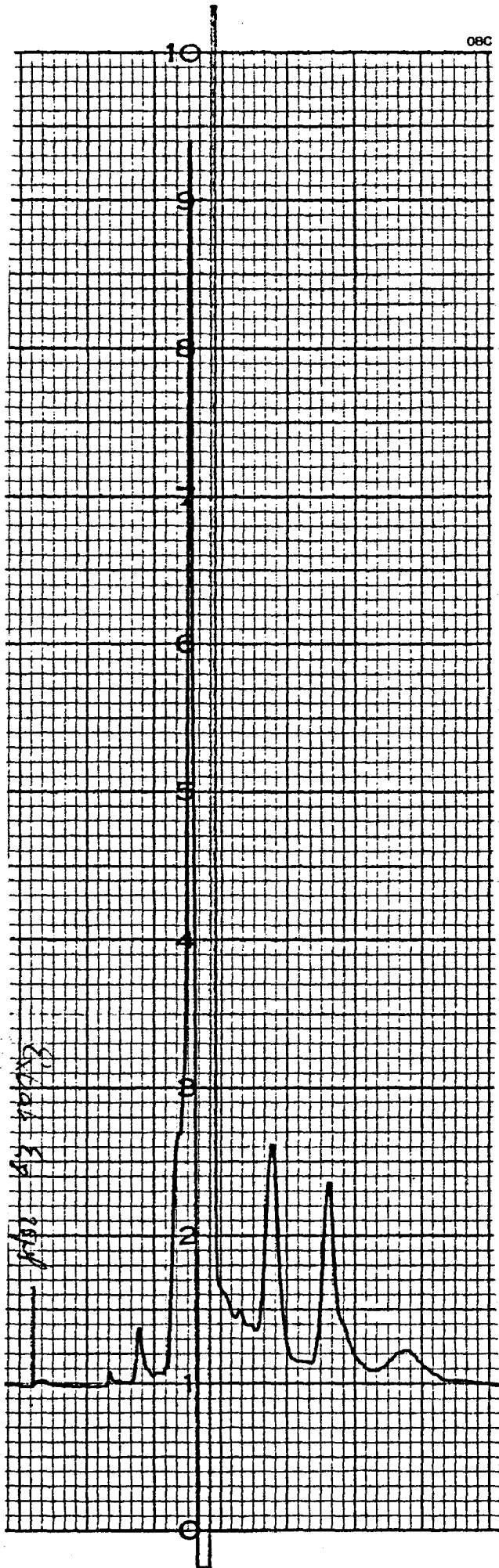
COURBE VIII

Injection : 25 μ l d'extract n° 6



COURBE IX

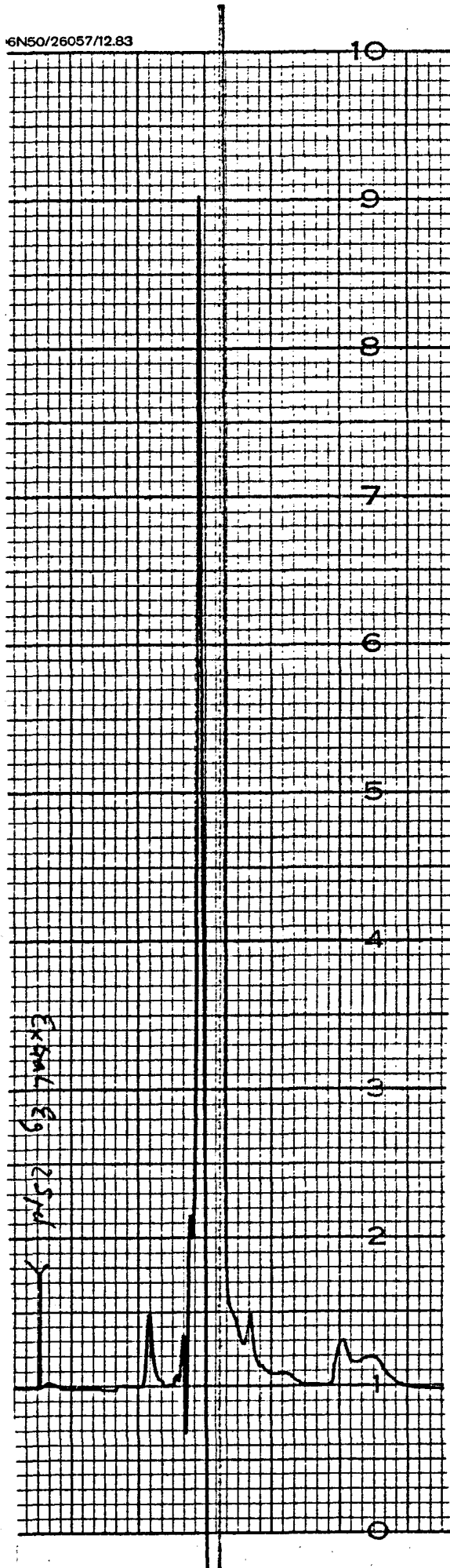
Injection : 25 μ l d'extrait n° 7

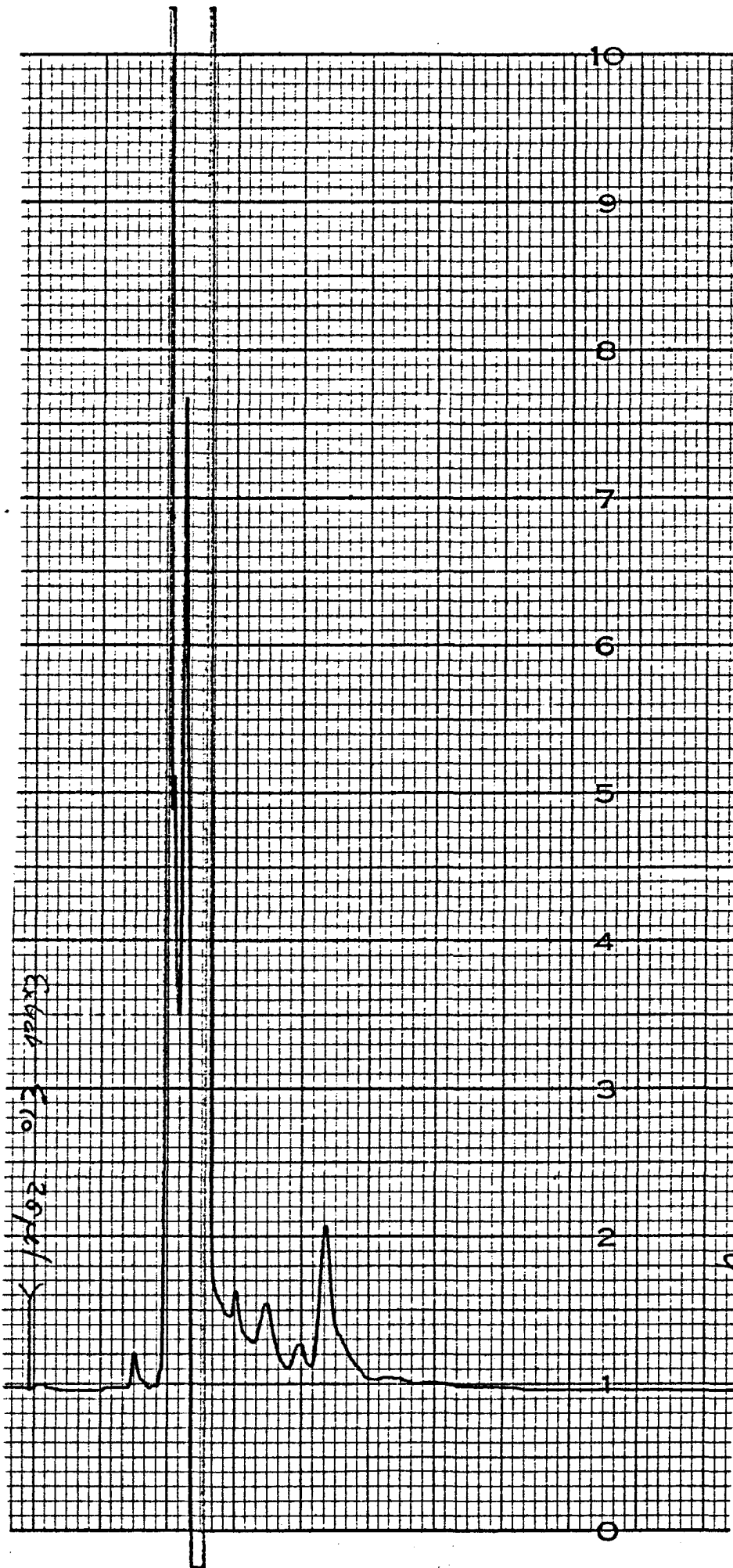


COURBE X

Injection : 25 μ l d'extrait n° 8

6N50/26057/12.83

COURBE XIInjection : 25 µl d'extrait n° 9



COURBE XII

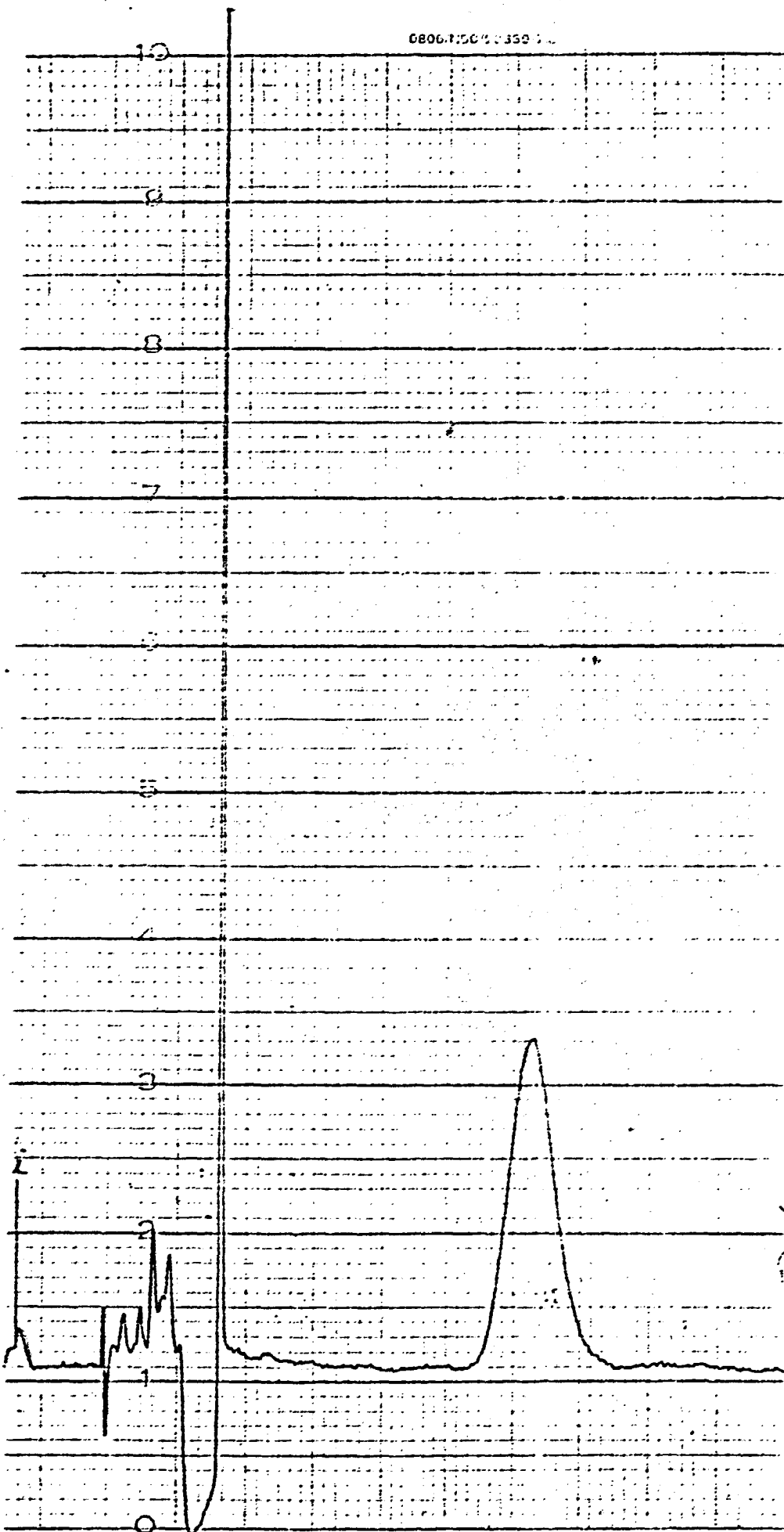
Injection : 25 μ l d'extrait n° 10

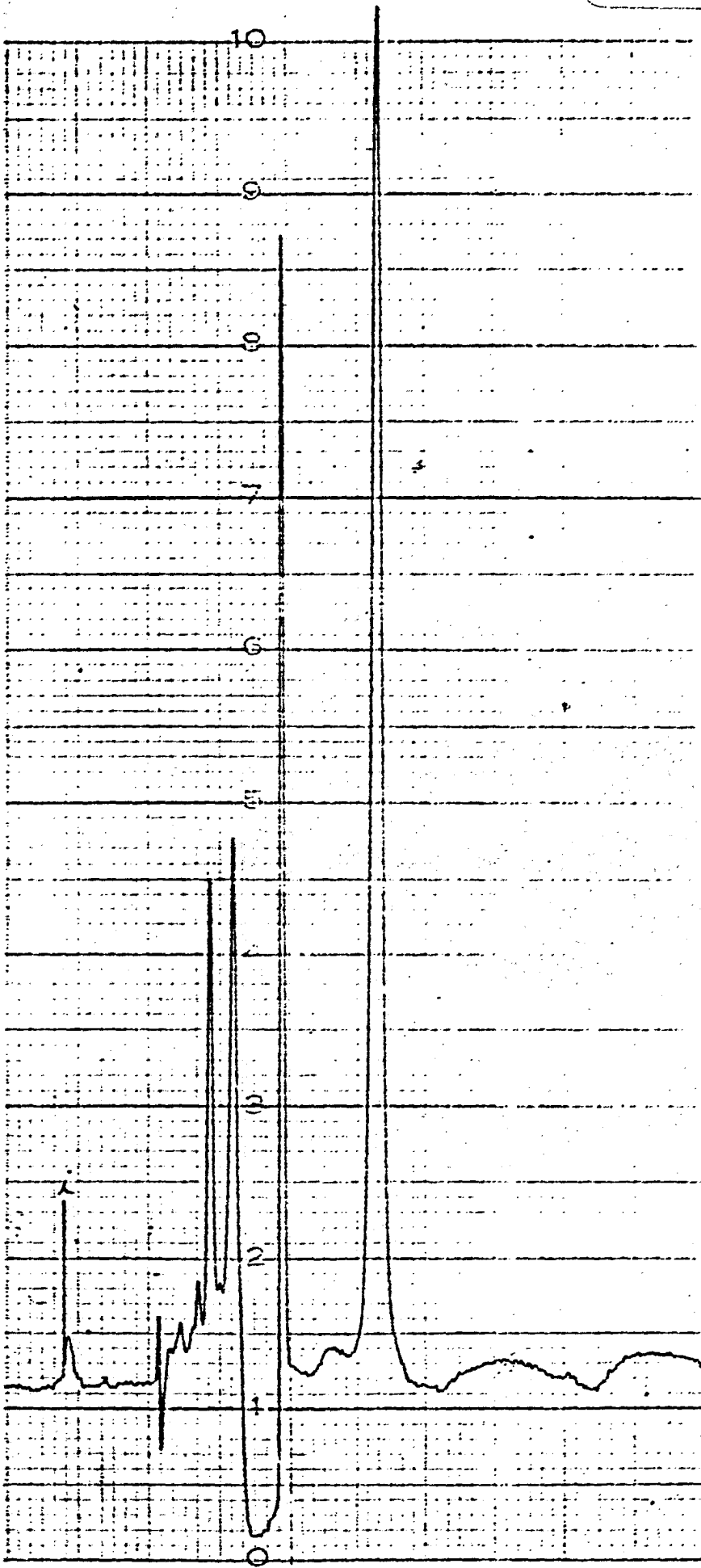
Extrait n° 10
20 μ l

080615000359

COURBE XIII

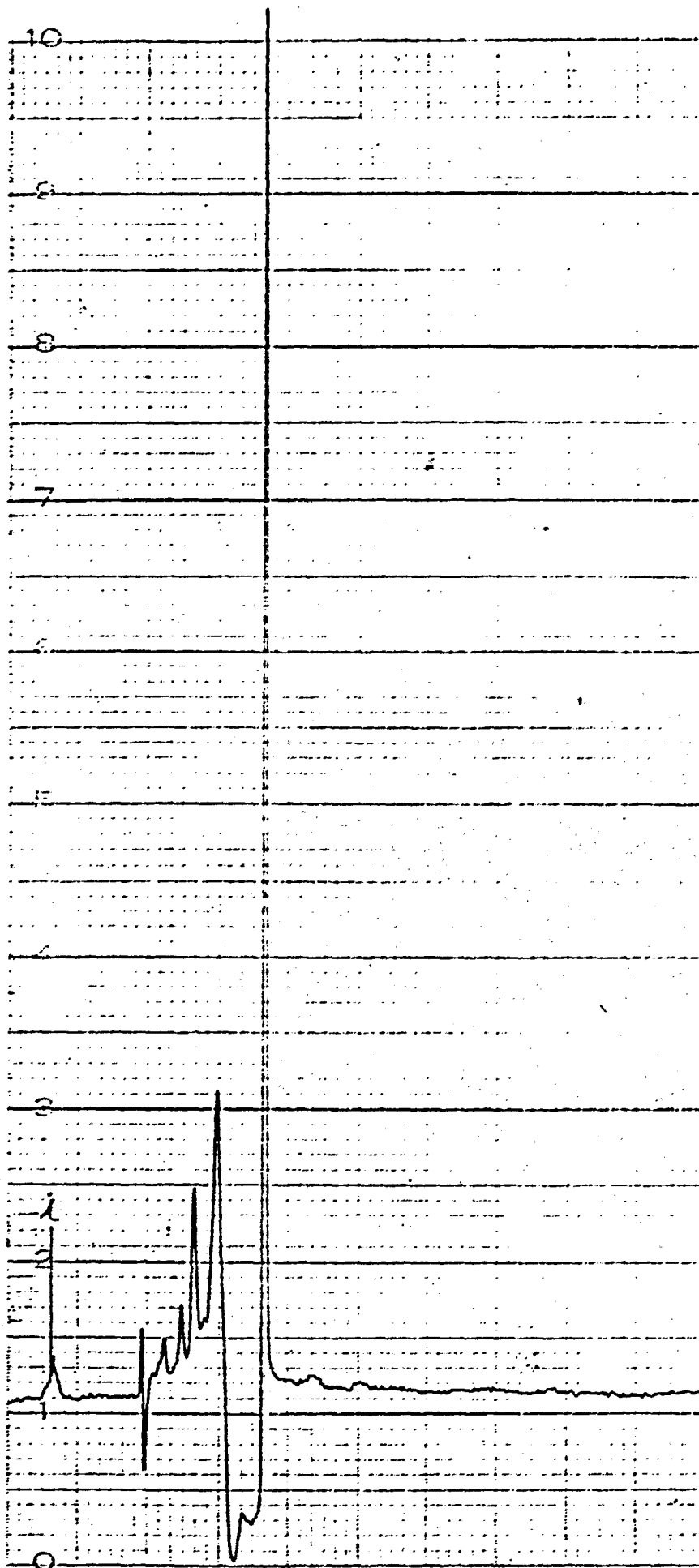
Injection : 10 μ l de la solution étalon
d'acétate α tocophérol de
concentration 6,92 mg/100 ml
d'heptane





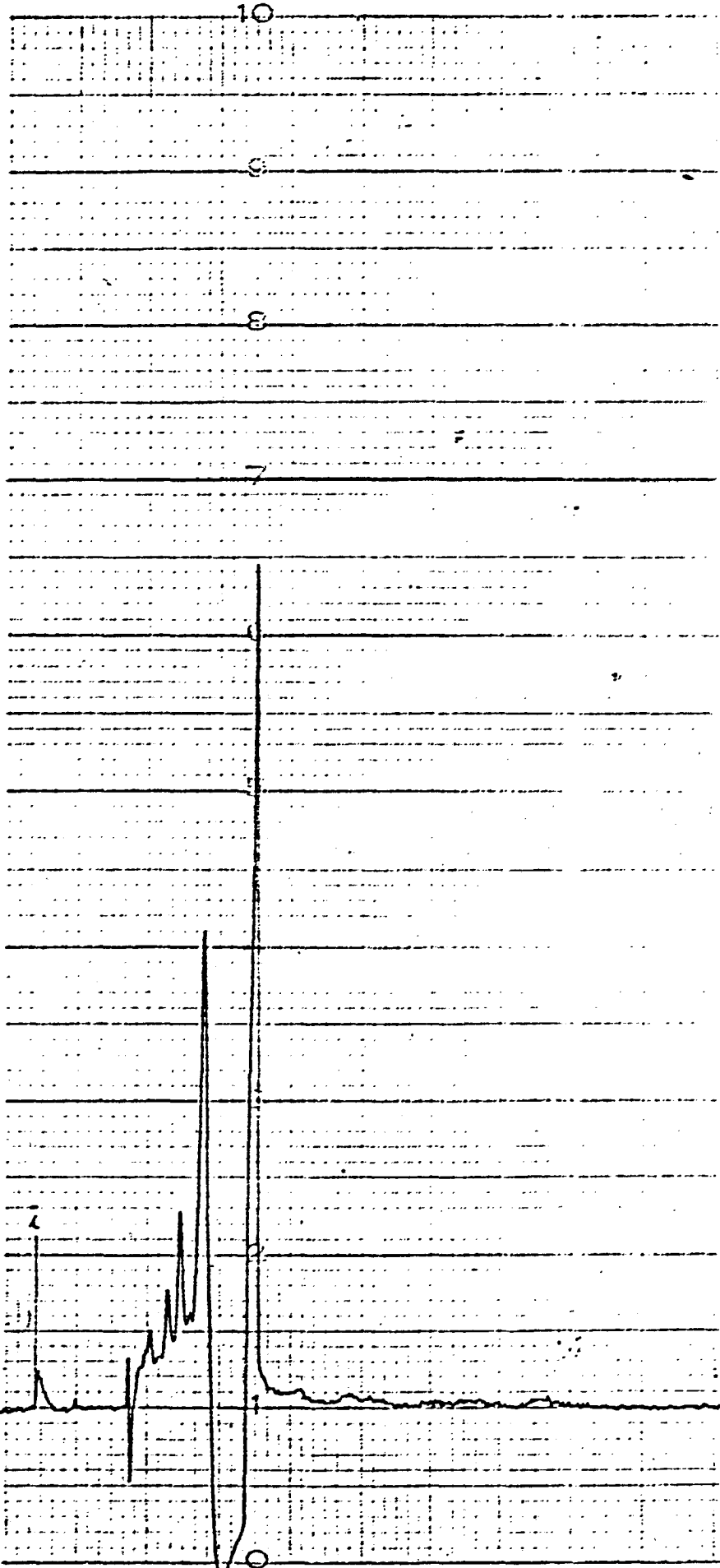
COURBE XIV

Injection : 10 µl d'extrait n° 11



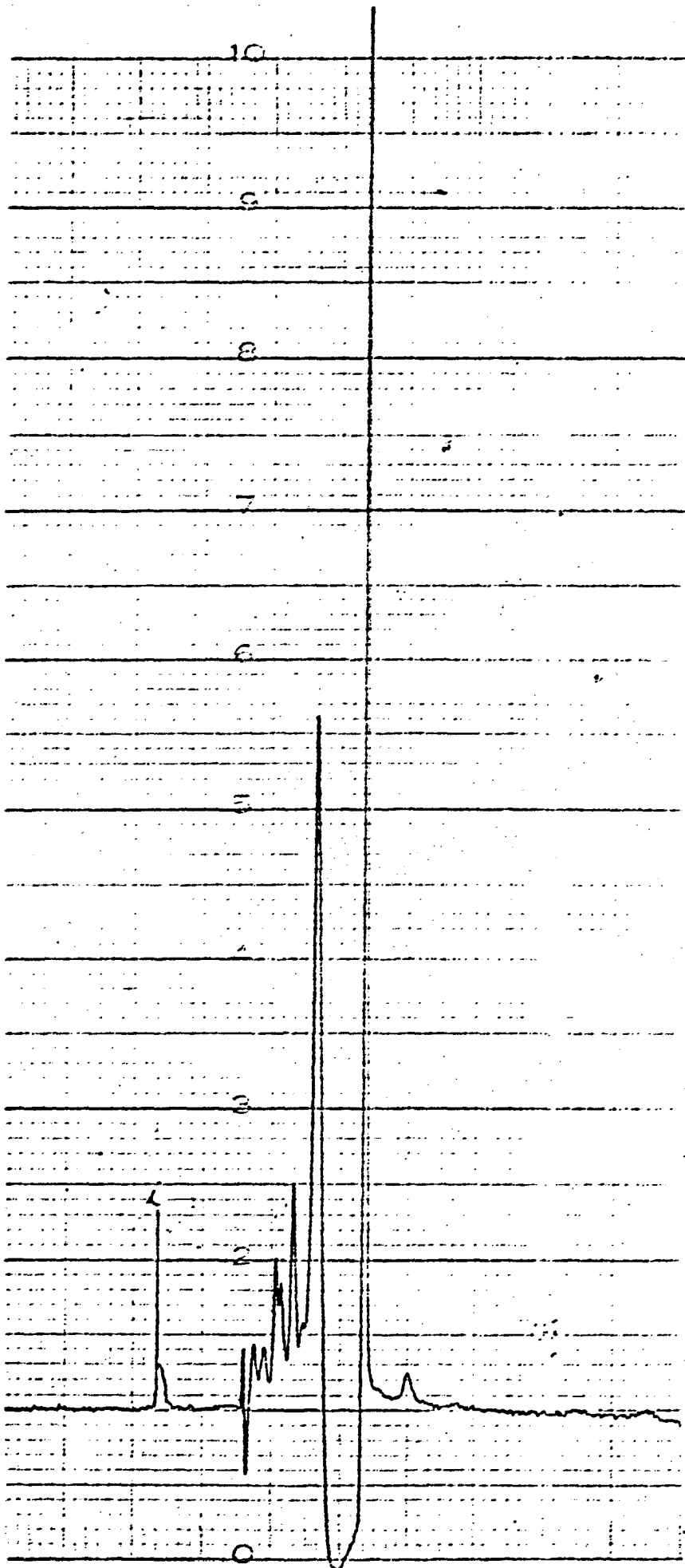
COURBE XV

Injection : 10 μ l d'extrait n° 13



COURBE XVI

Injection : 10 μl d'extrait n° 14



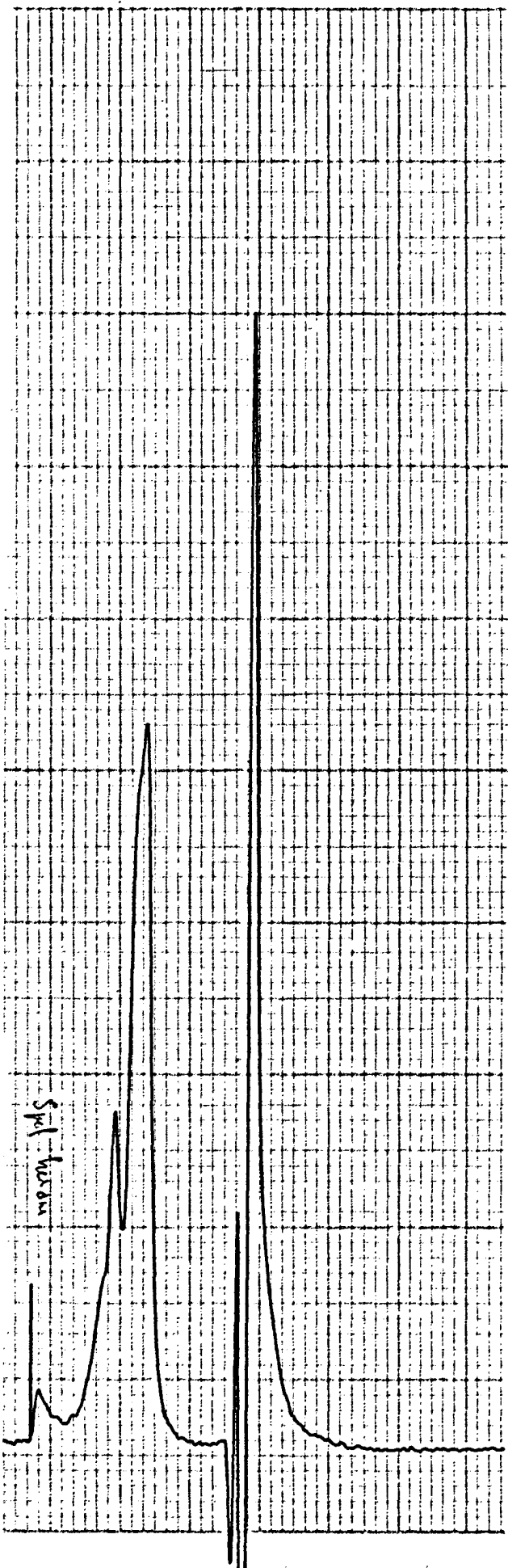
COURBE XVII

Injection : 10 μ l d'extrait Sargassum
fraîche

0806/N50/28339/7.85

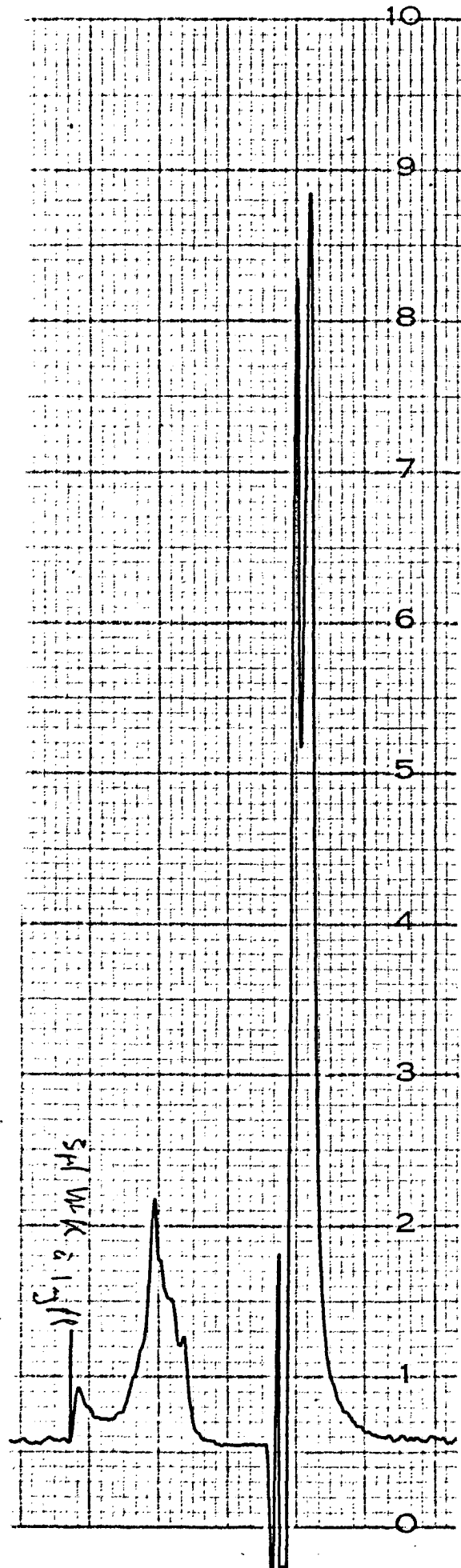
Courbe I

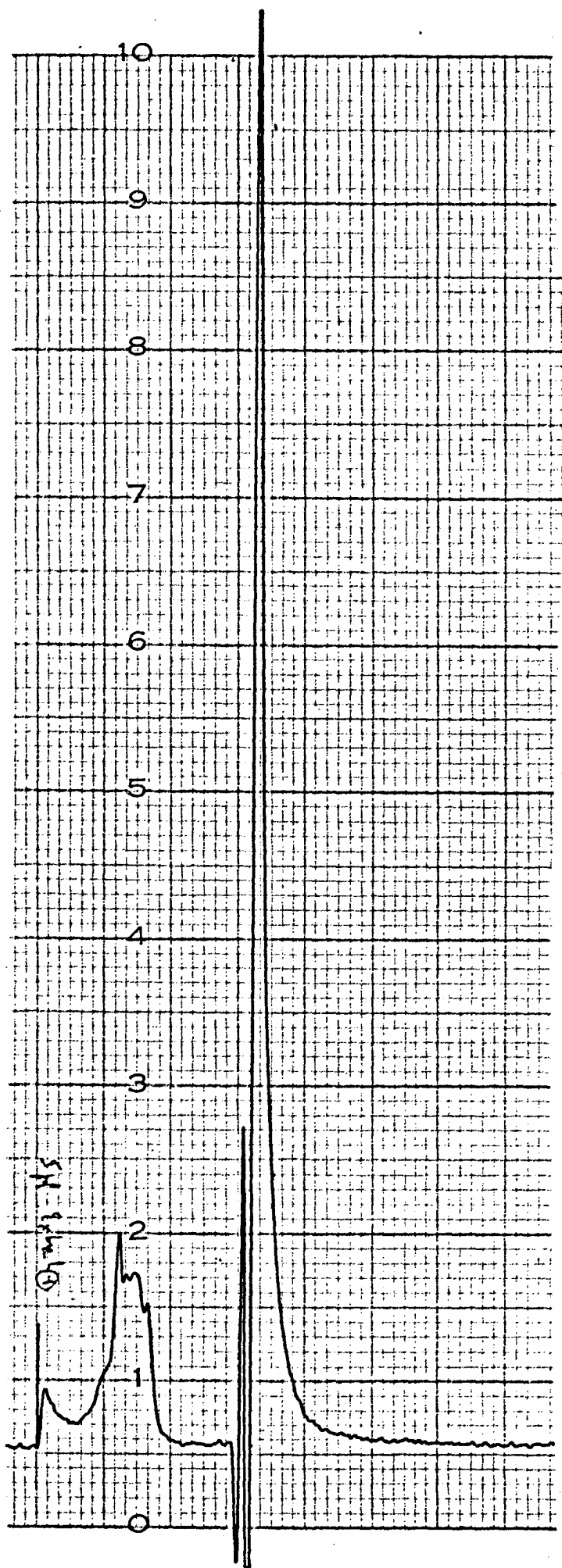
Injection de 5 μ l d'Hexane

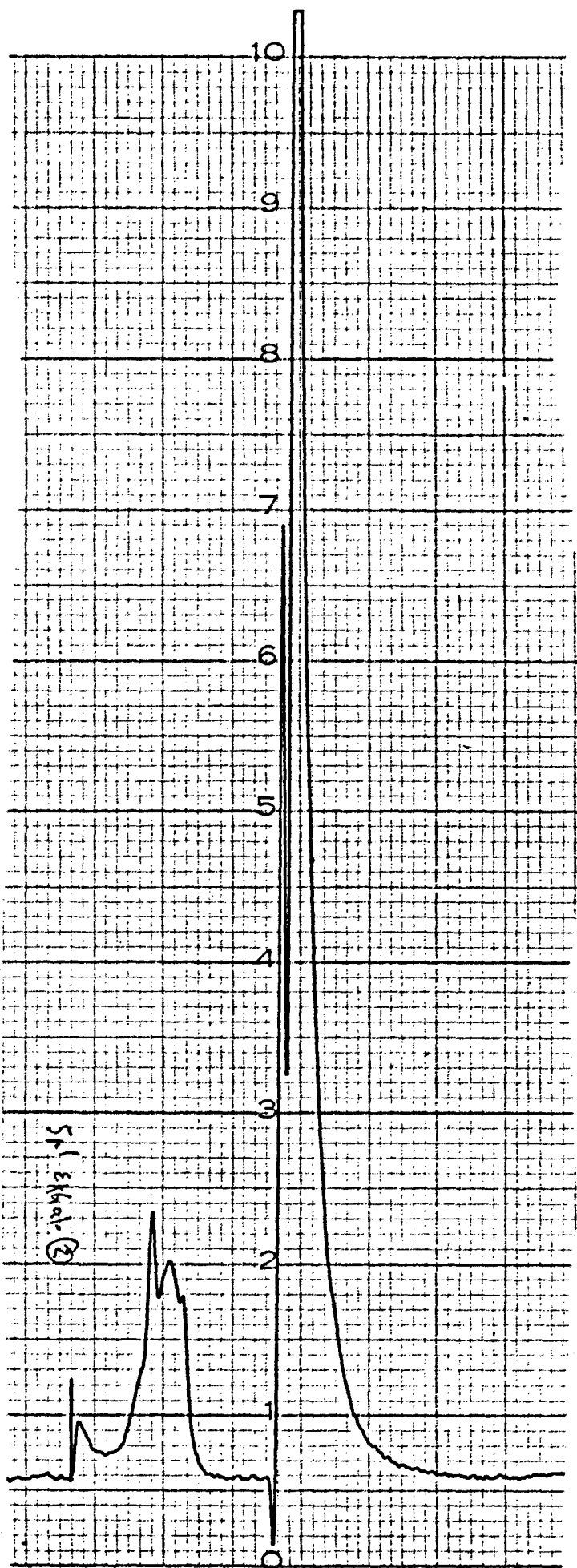


Courbe II

Injection de 5 μ l d'une solution étalon de Vitamine K₁ dosée à 1 mg/l



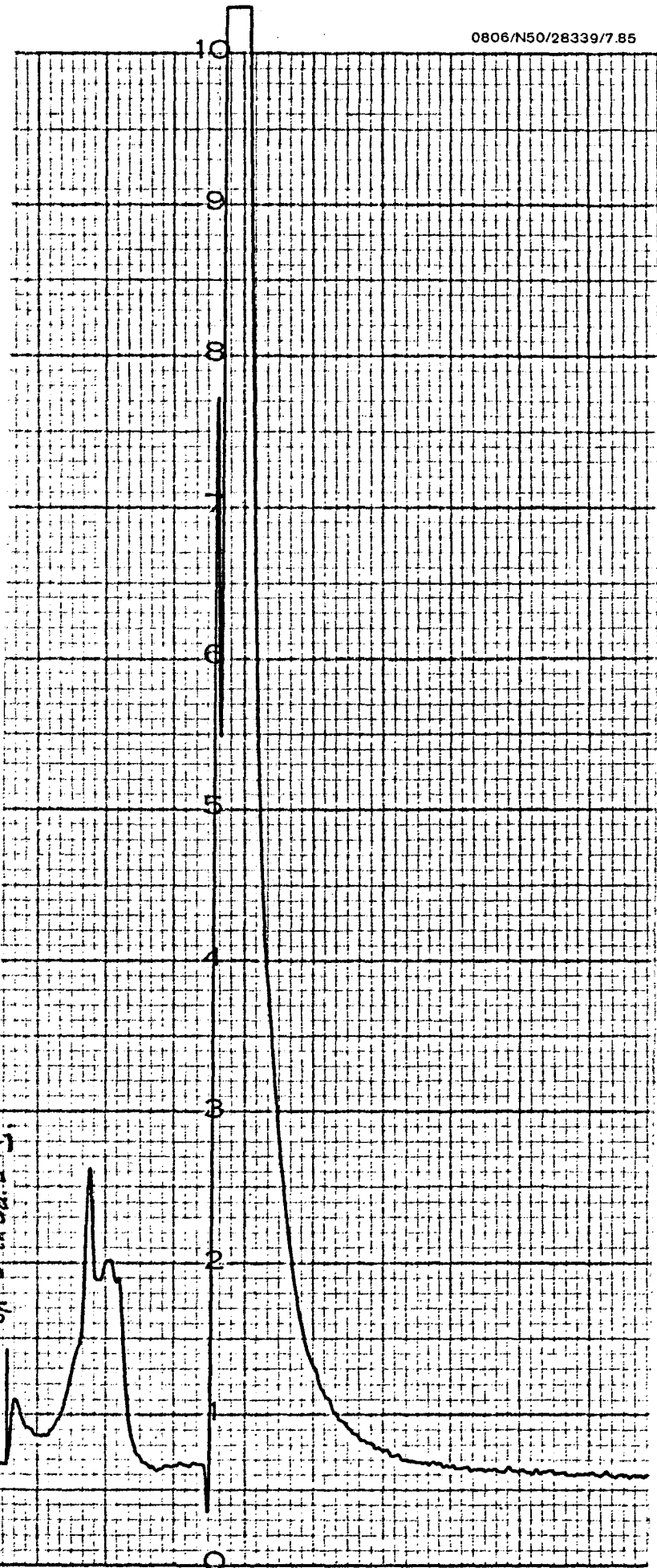
Courbe IIIInjection de 5 μ l de l'extrait n°1



Courbe IV

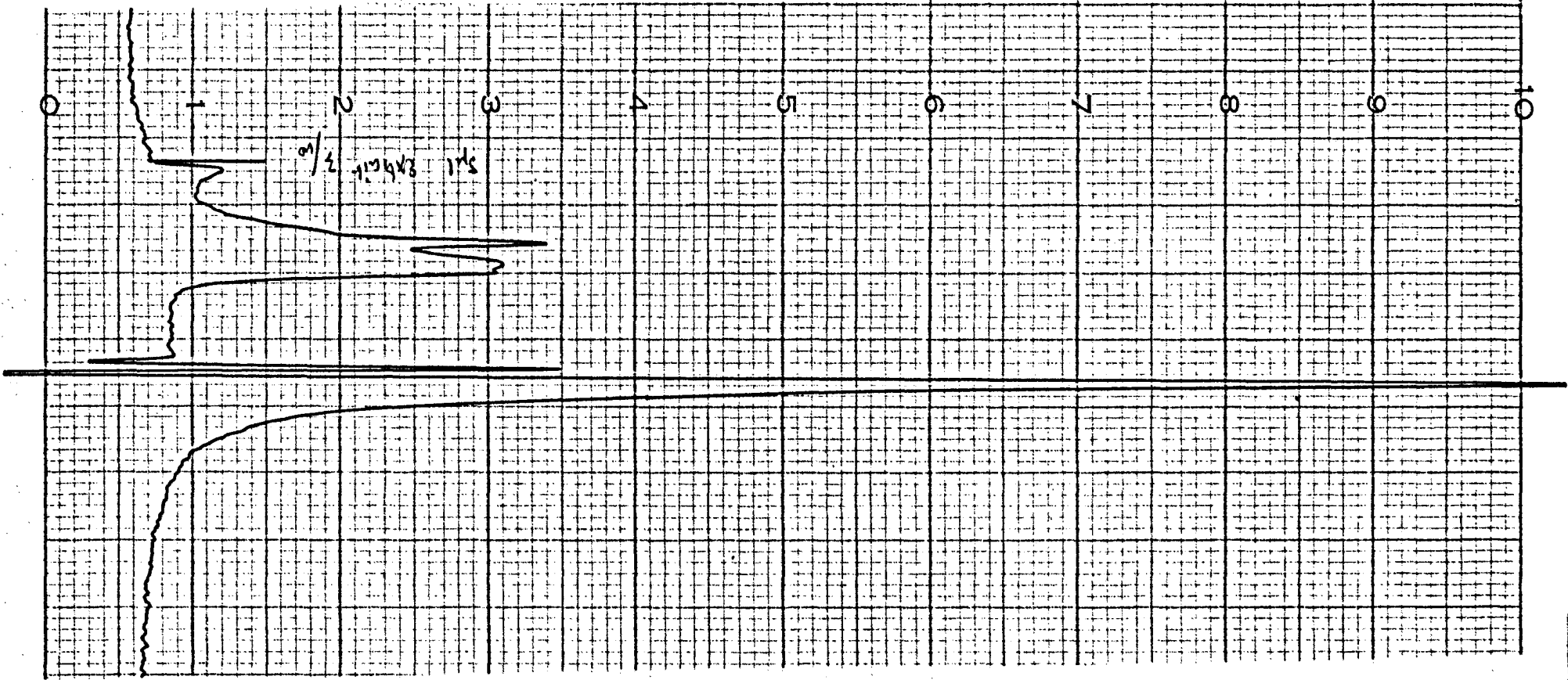
Injection de 5 μ l de l'extrait n°2

0806/N50/28339/7.85

Courbe VInjection de 5 μ l d'extrait n°3

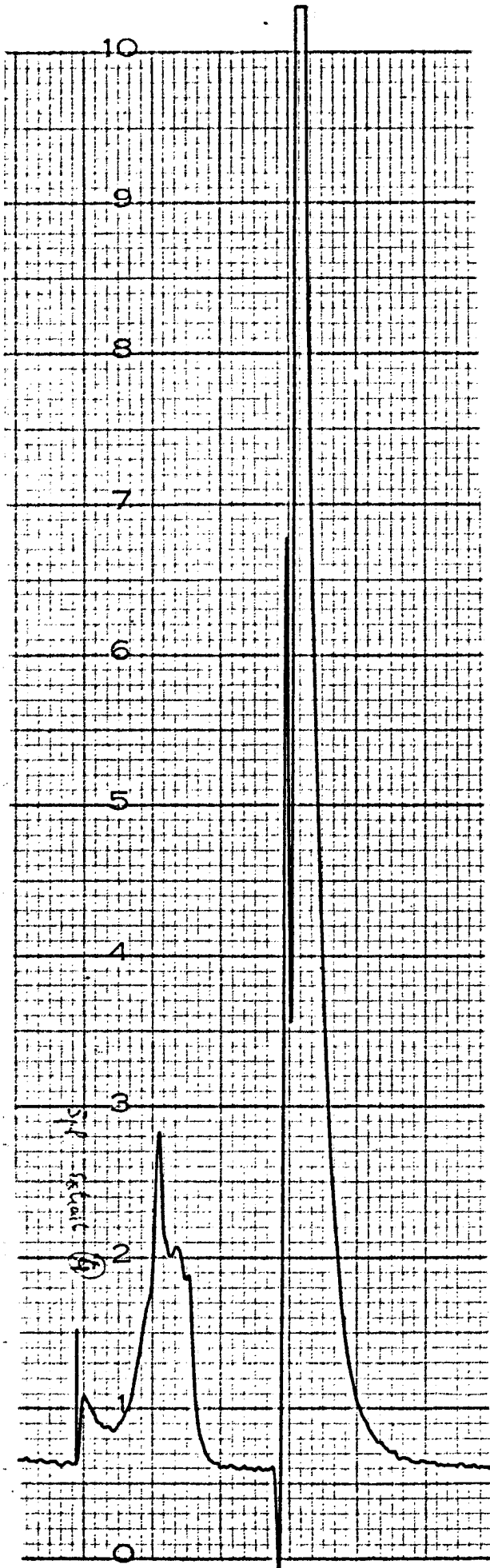
Courbe VI

Injection de (5 µl d'extrait n°3 dilué au 1/10



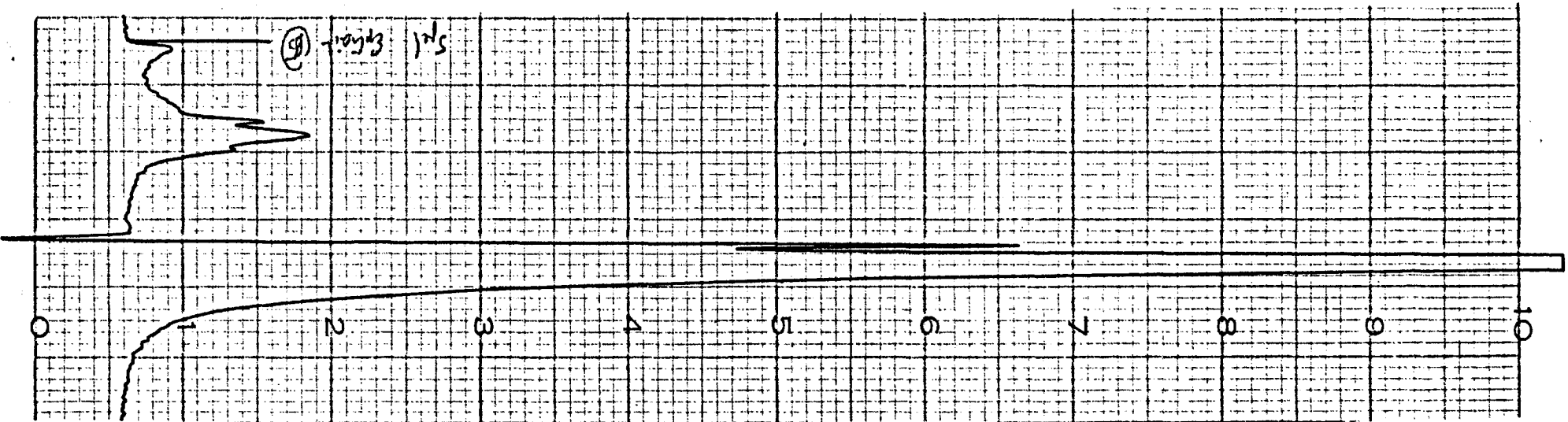
Courbe VII

Injection de 5 μ l d'extrait n°4

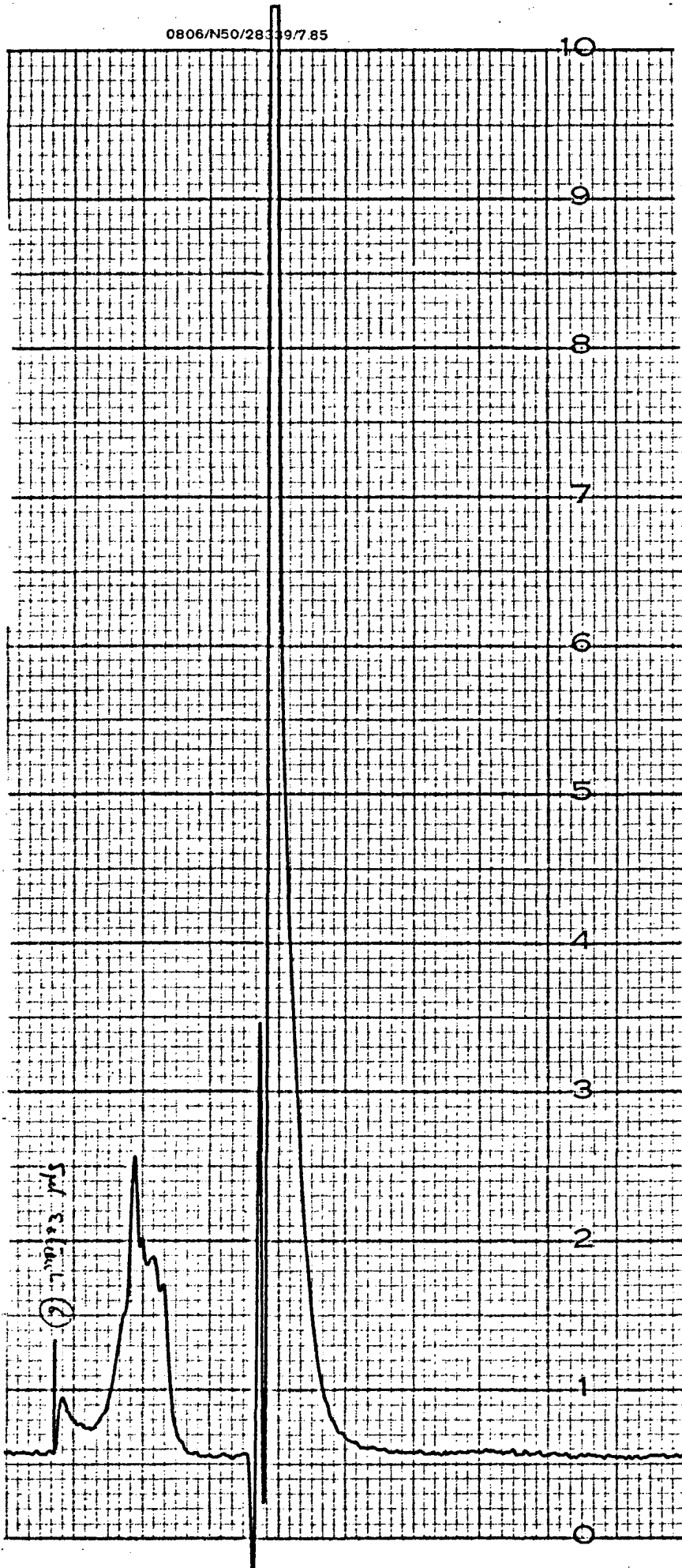


Courbe VIII

Injection de (5 μ l d'extract n°5



0806/N50/28399/7.85

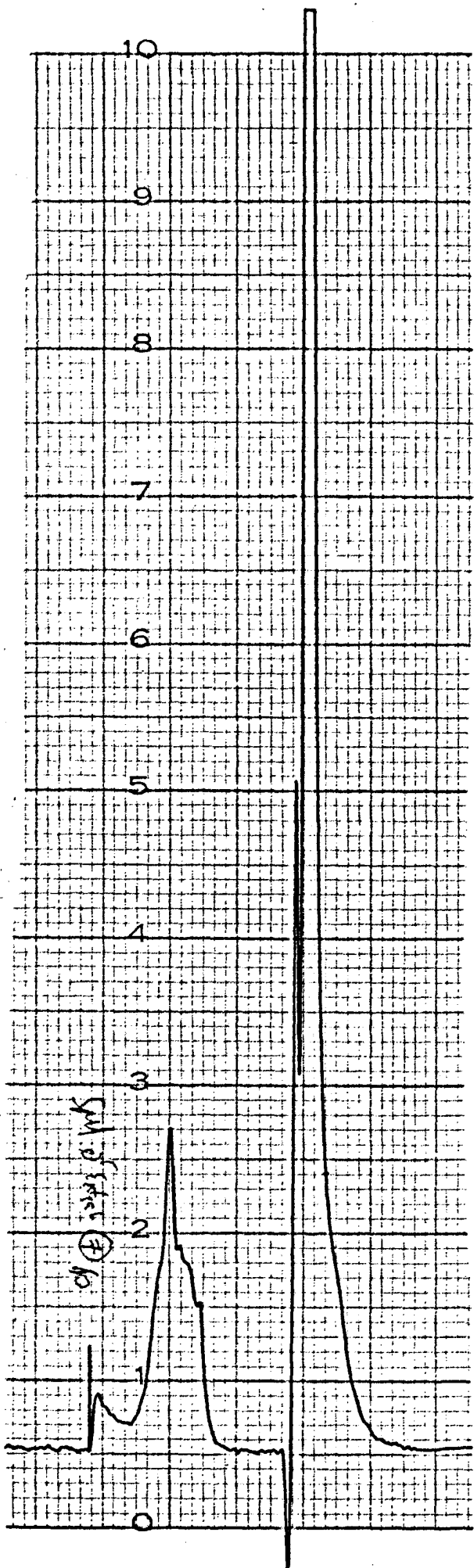


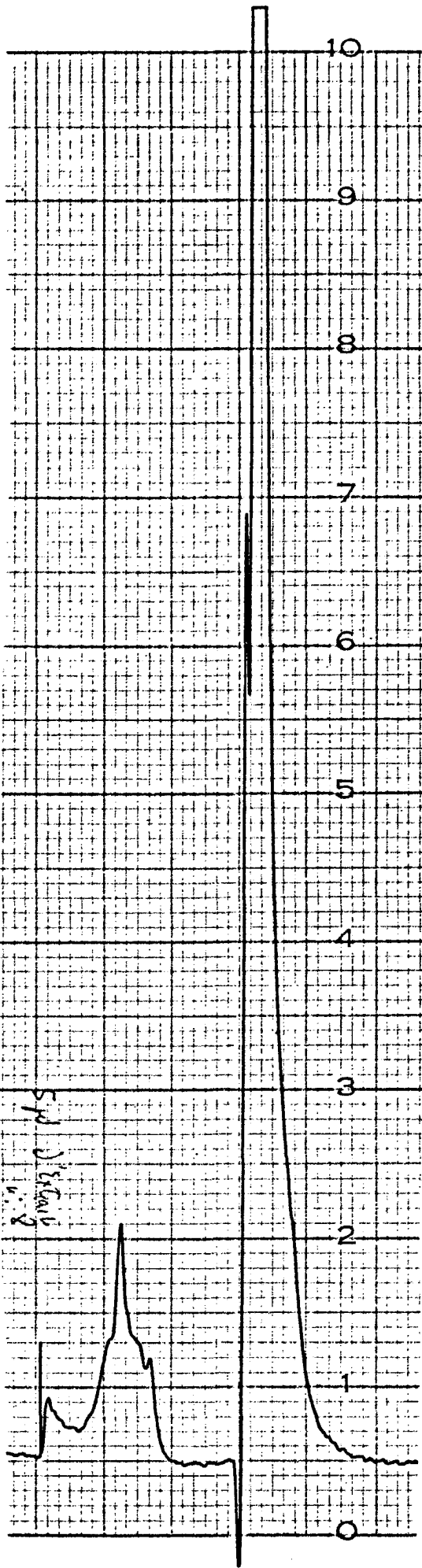
Courbe IX

Injection de 5 µl d'extract n°6

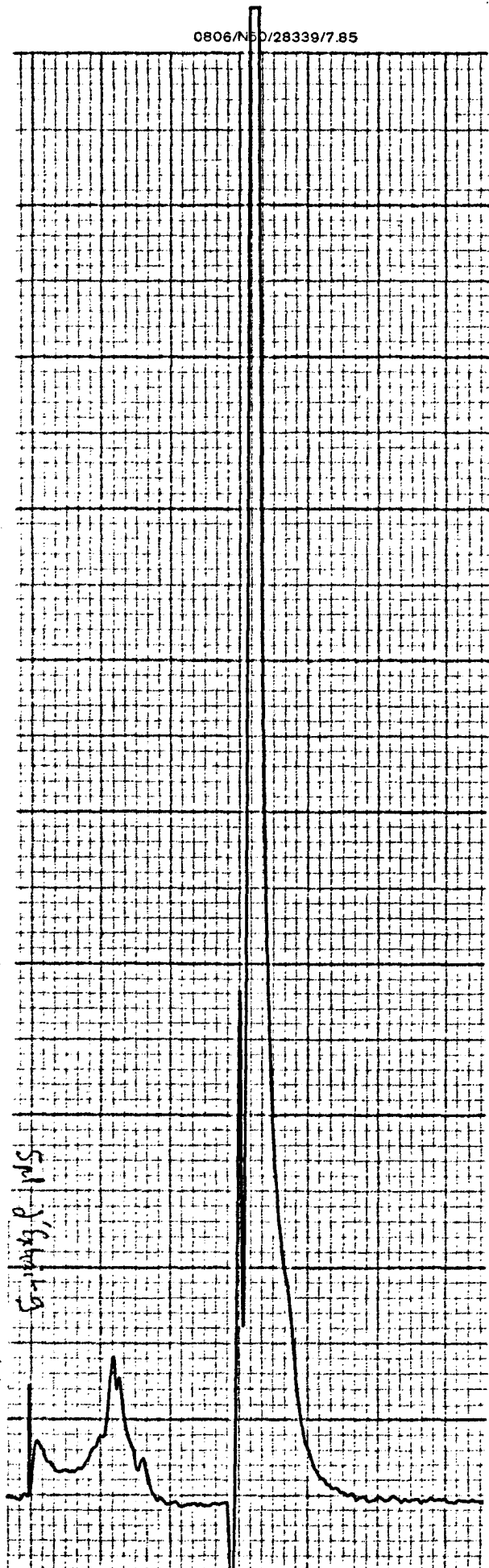
Courbe X

injection de 5 μ l d'extrait n°7
dilué au 1/10



Courbe XIInjection de 5 μ l d'extrait n°8

0806/NSD/28339/7.85

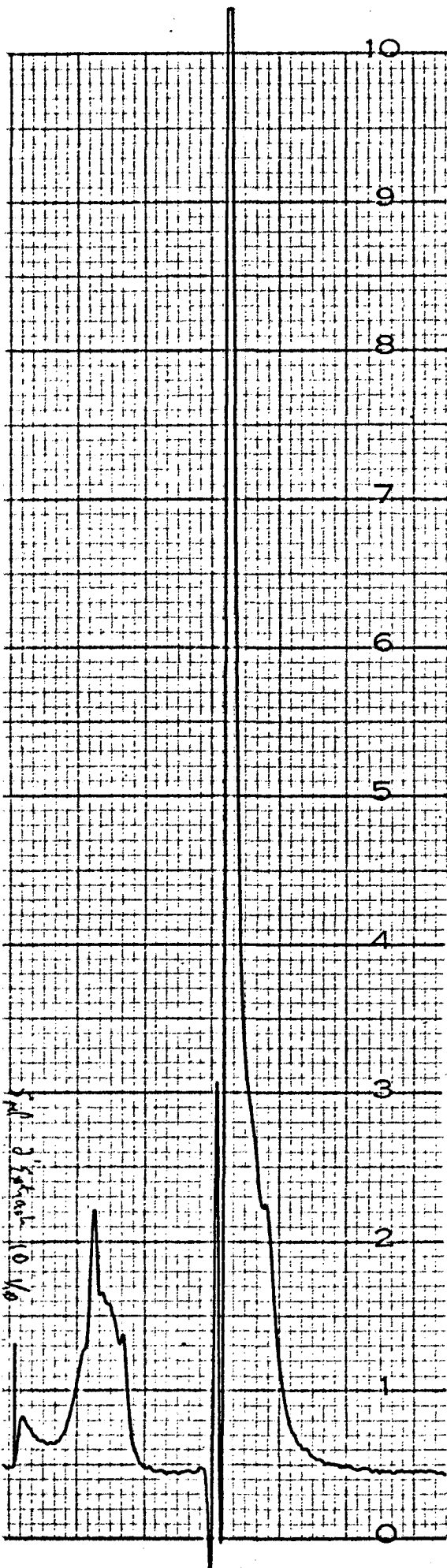


Courbe XII

Injection de 5 μ l d'extrait N°9

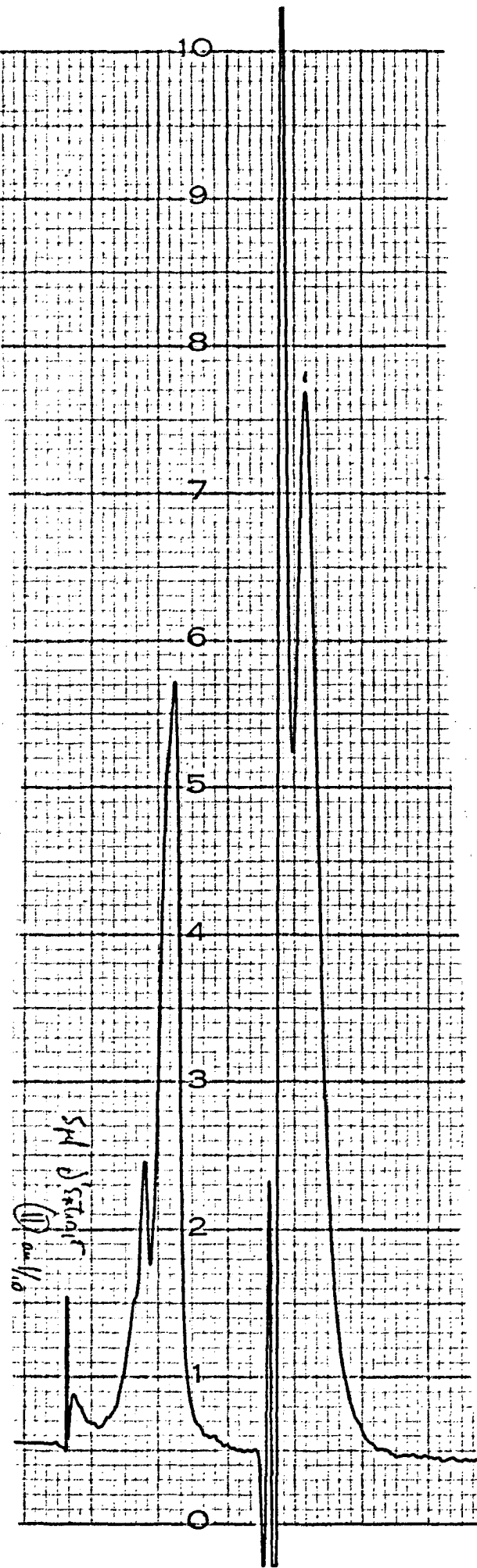
Courbe XIII

Injection de 5 μ l d'extrait n°10 dilué au
1/10



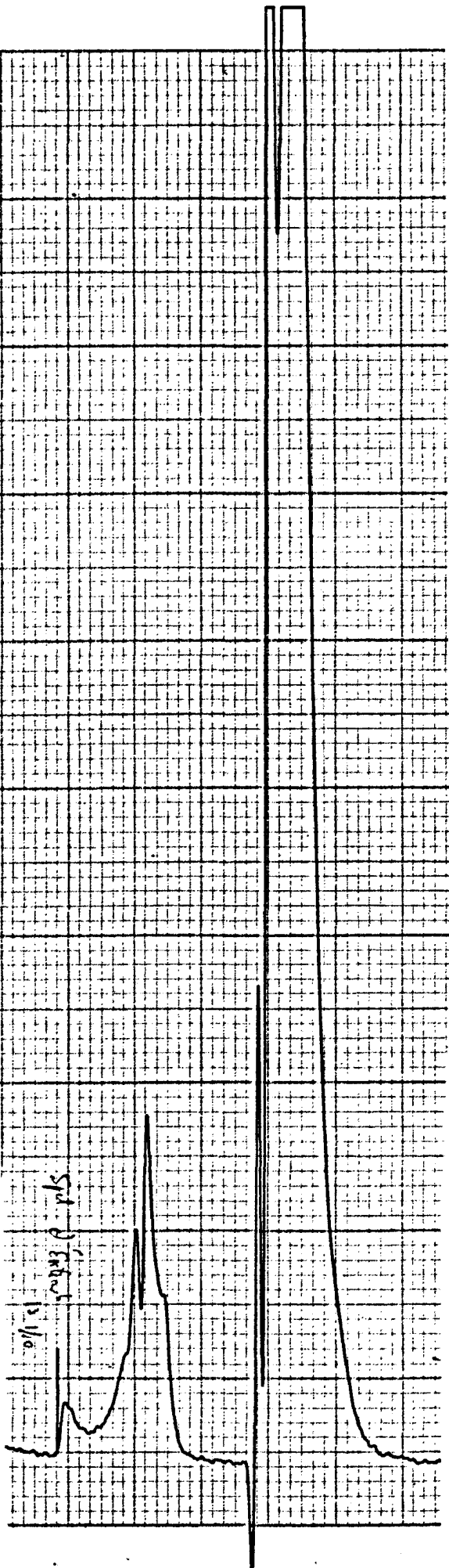
Courbe XIV

Injection de 5 μ l d'extrait N°11 dilué au
1/10



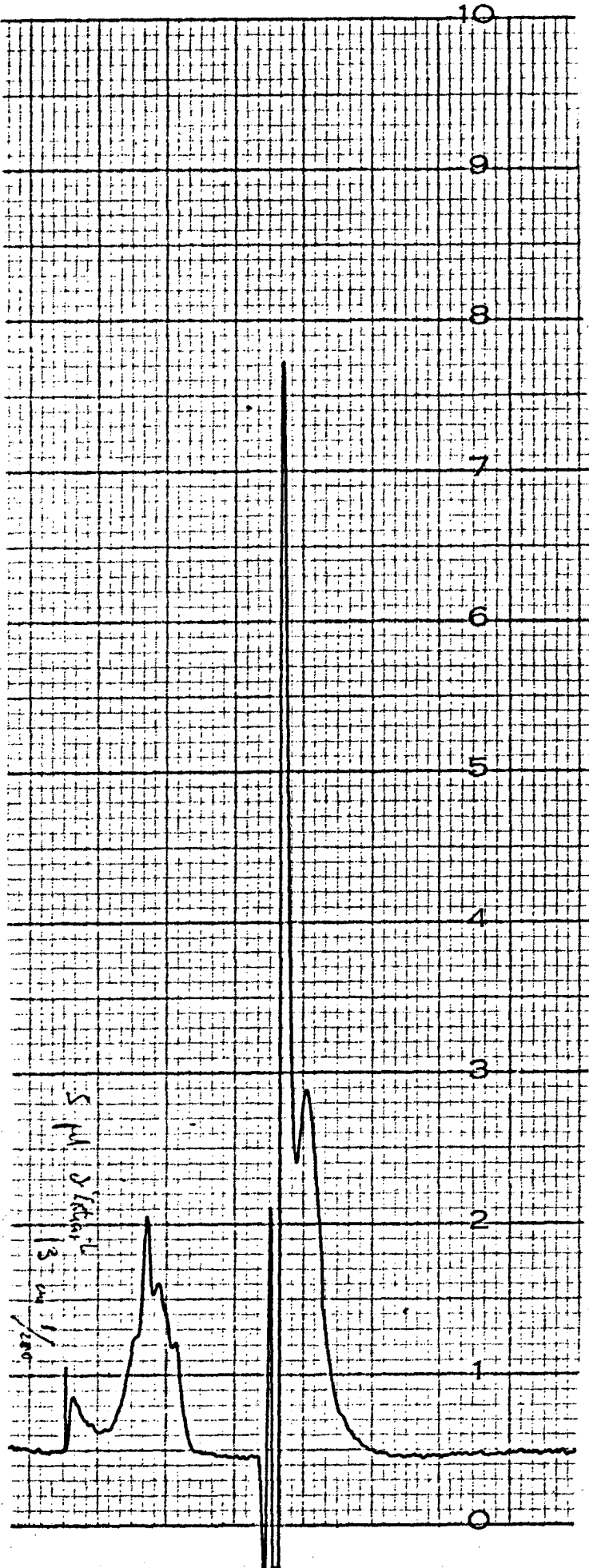
Courbe XV

Injection de 5 μ l d'extrait n°13 dilué au
1/10

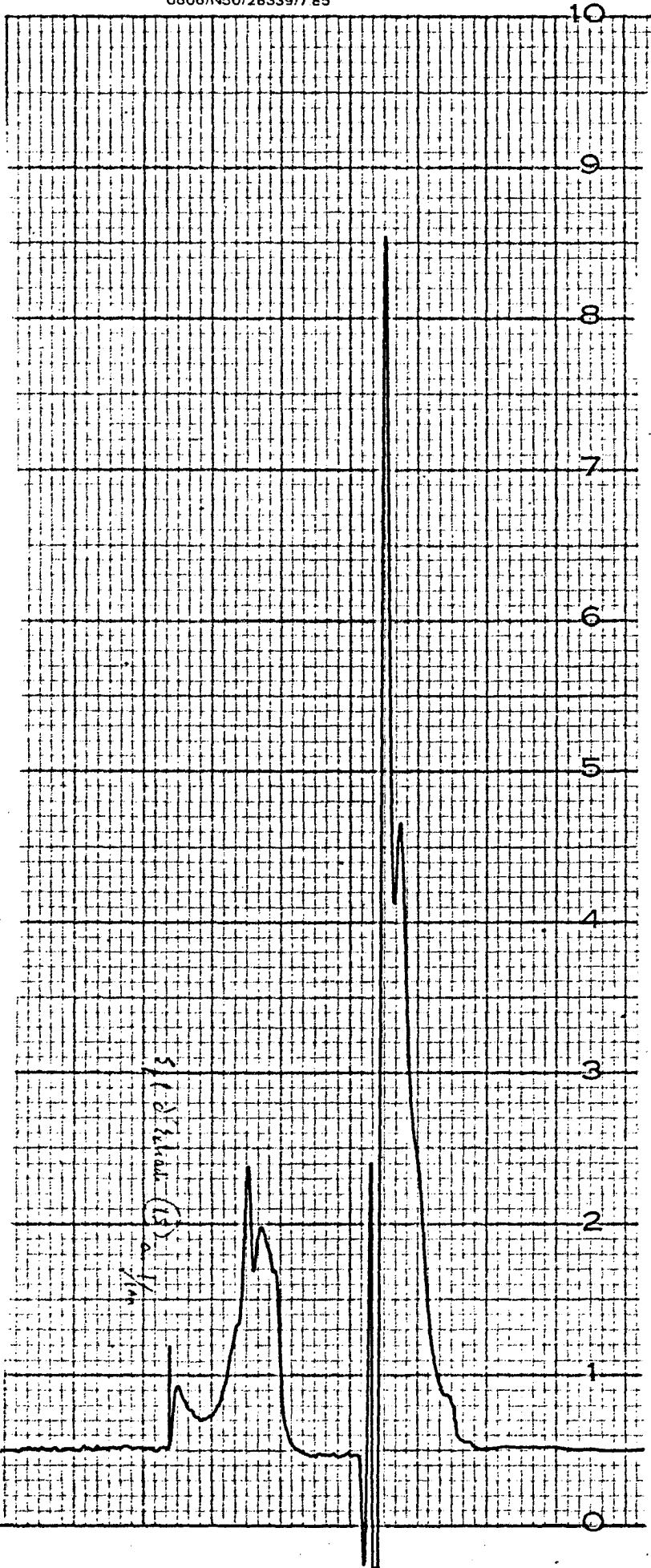


Courbe XVI

Injection de 5 μ l d'extrait n°13 dilué au
1/200

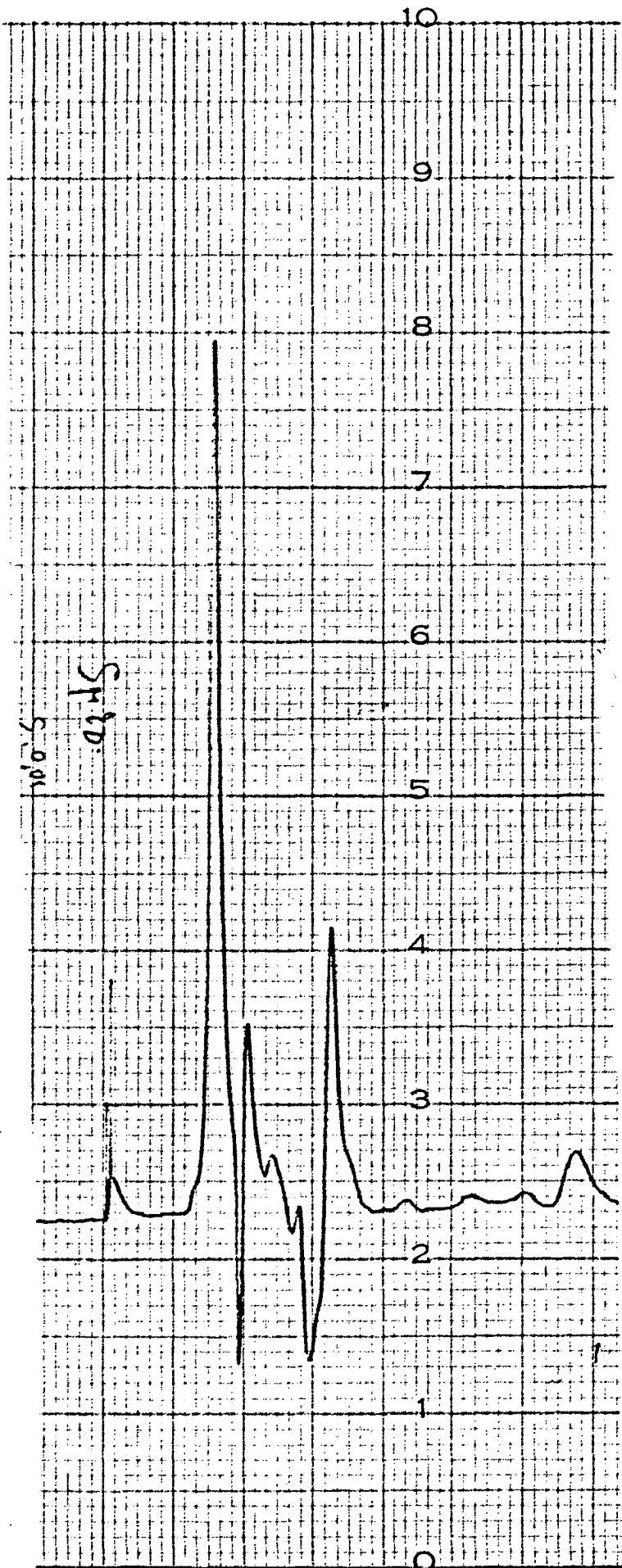


0806/N50/26339/7 85



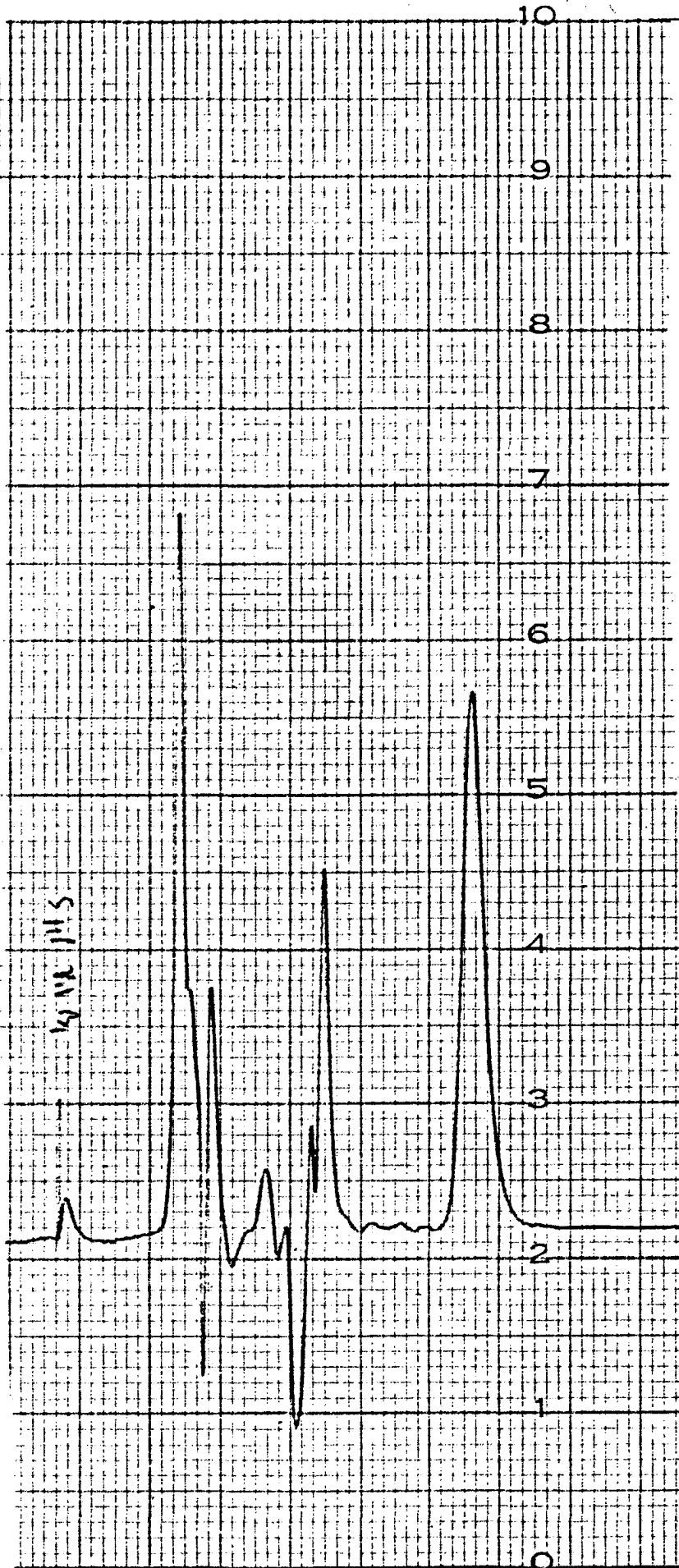
Courbe XVII

Injection de 5 µl d'extract n°15 dilué au 1/100



Courbe I

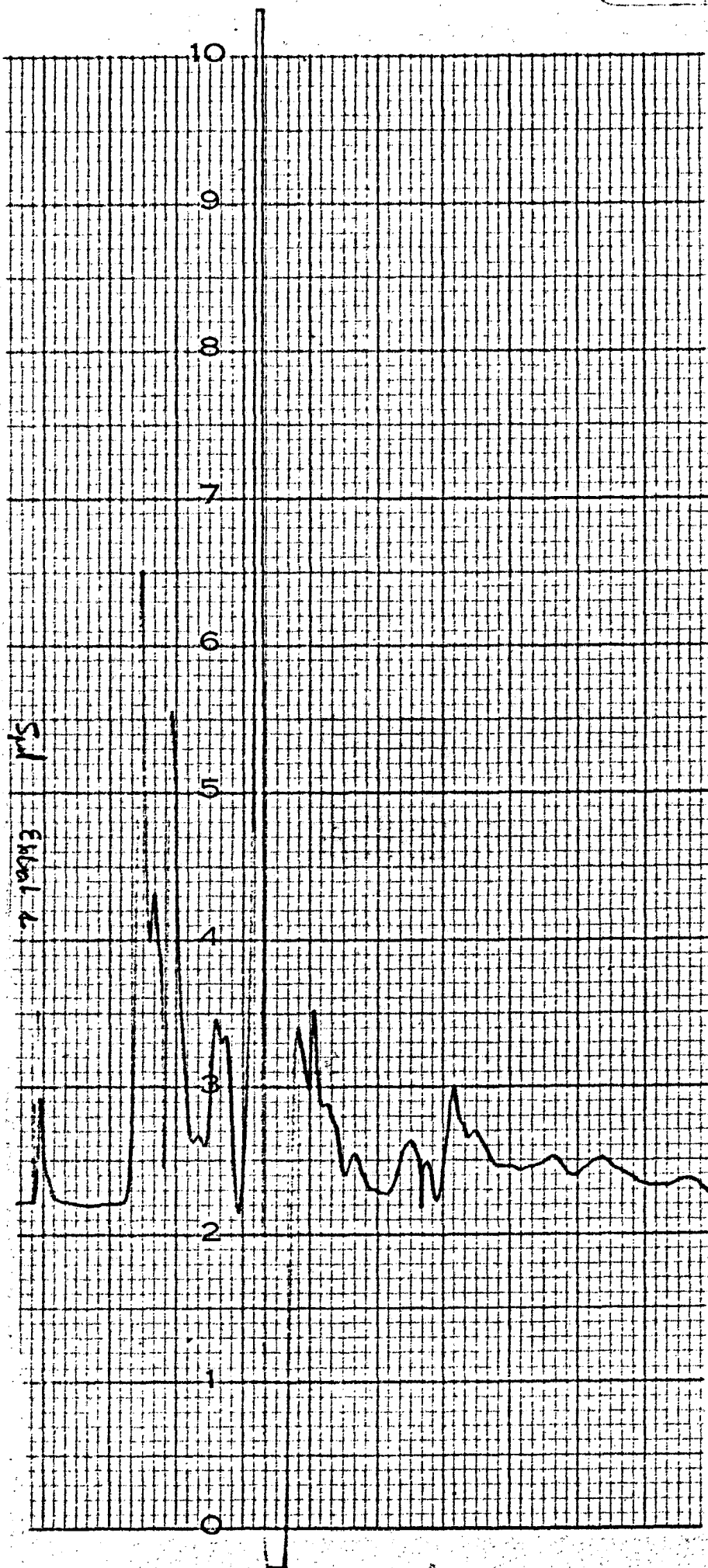
Injection de 10 μ l d'eau distillée



Courbe II

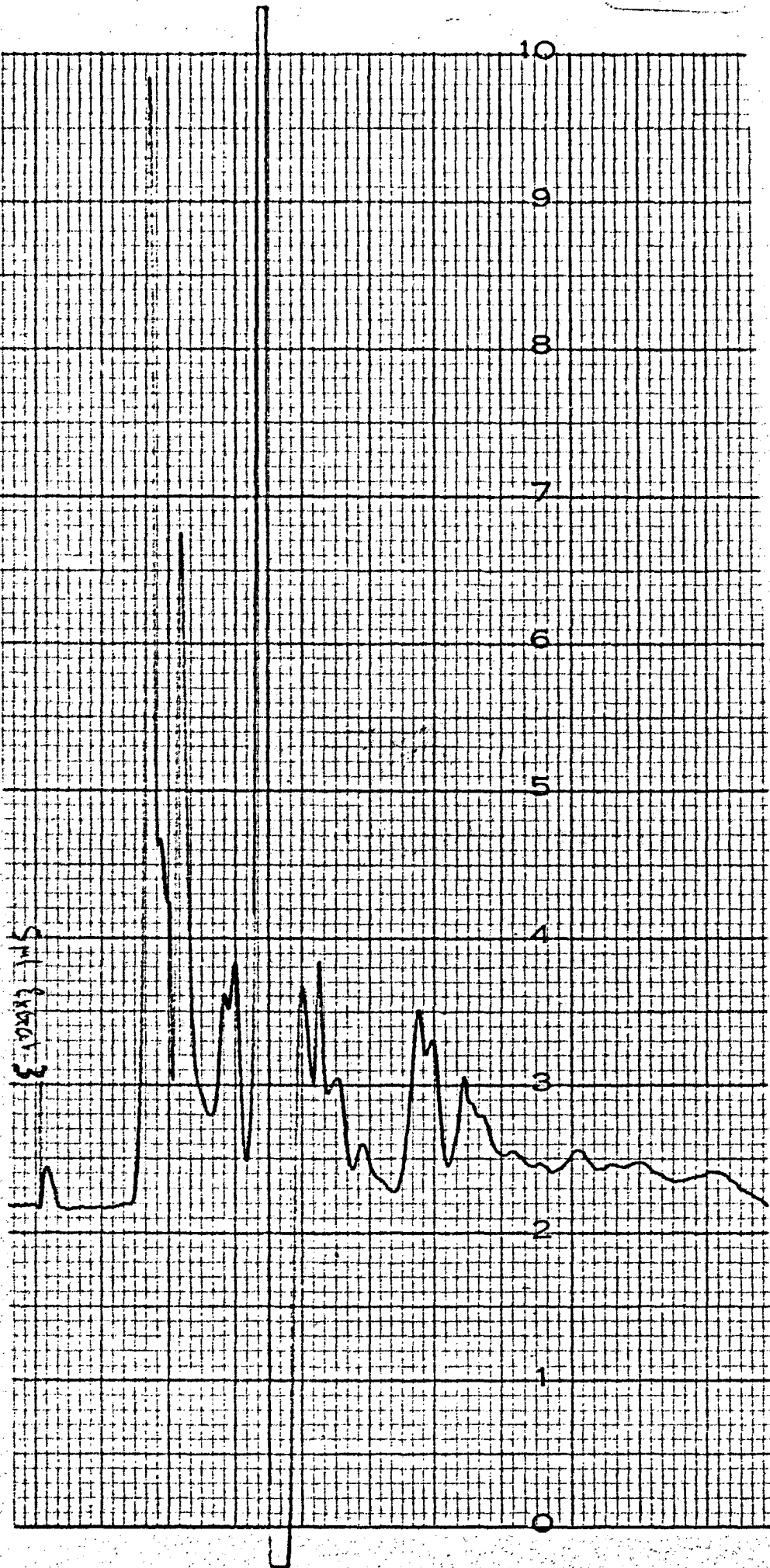
Injection de 5 μ l de solution étalon
de vitamine B₁ dosée à 10 mg/l.

A 5,9 cm de rétention, on observe
un pic supplémentaire par rapport
à la courbe n°I

Courbe III

Injection de 5 μ l de l'extrait n°1

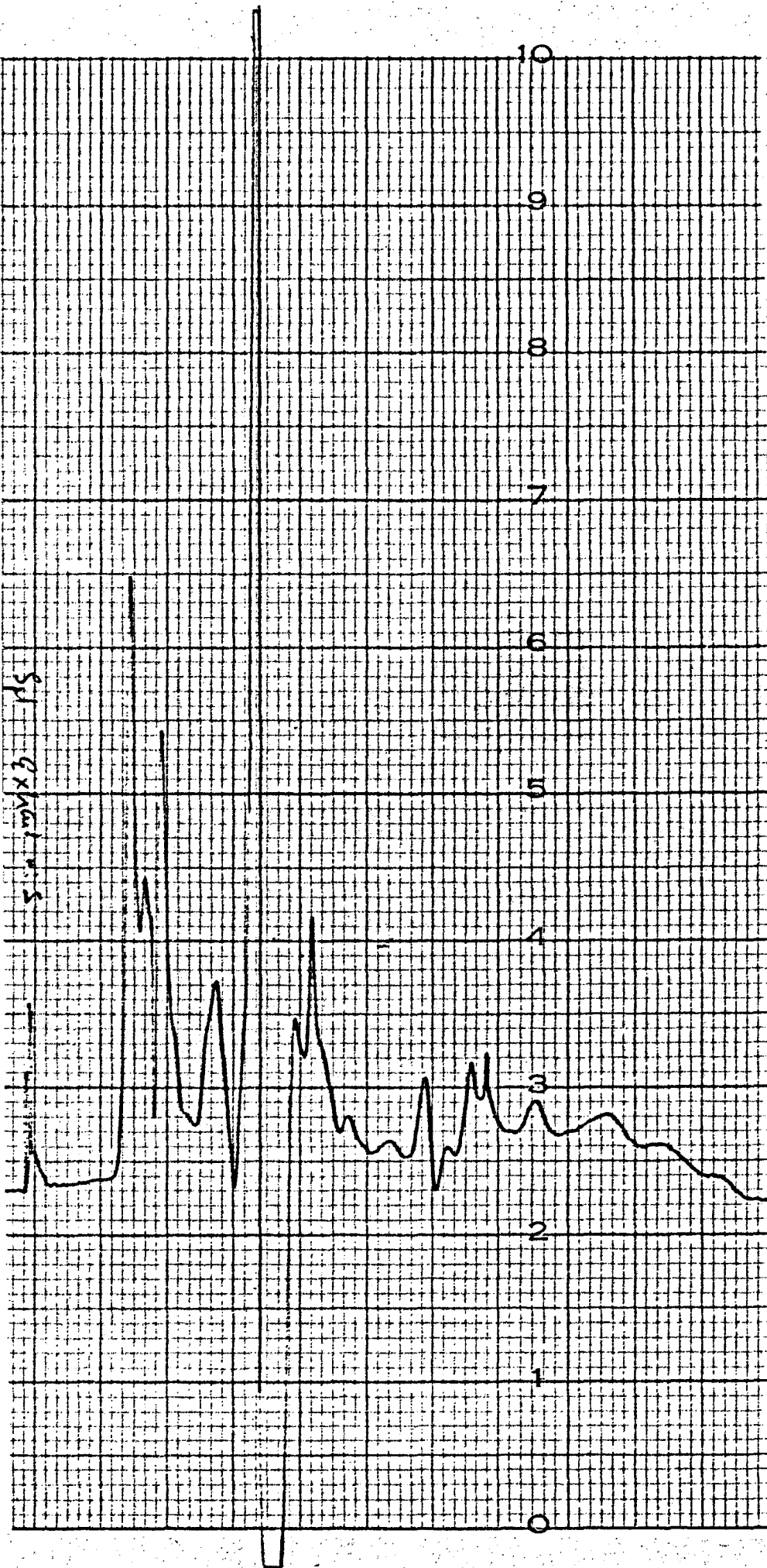
Pas de pic correspondant à 5,9 cm
de rétention.



Courbe IV

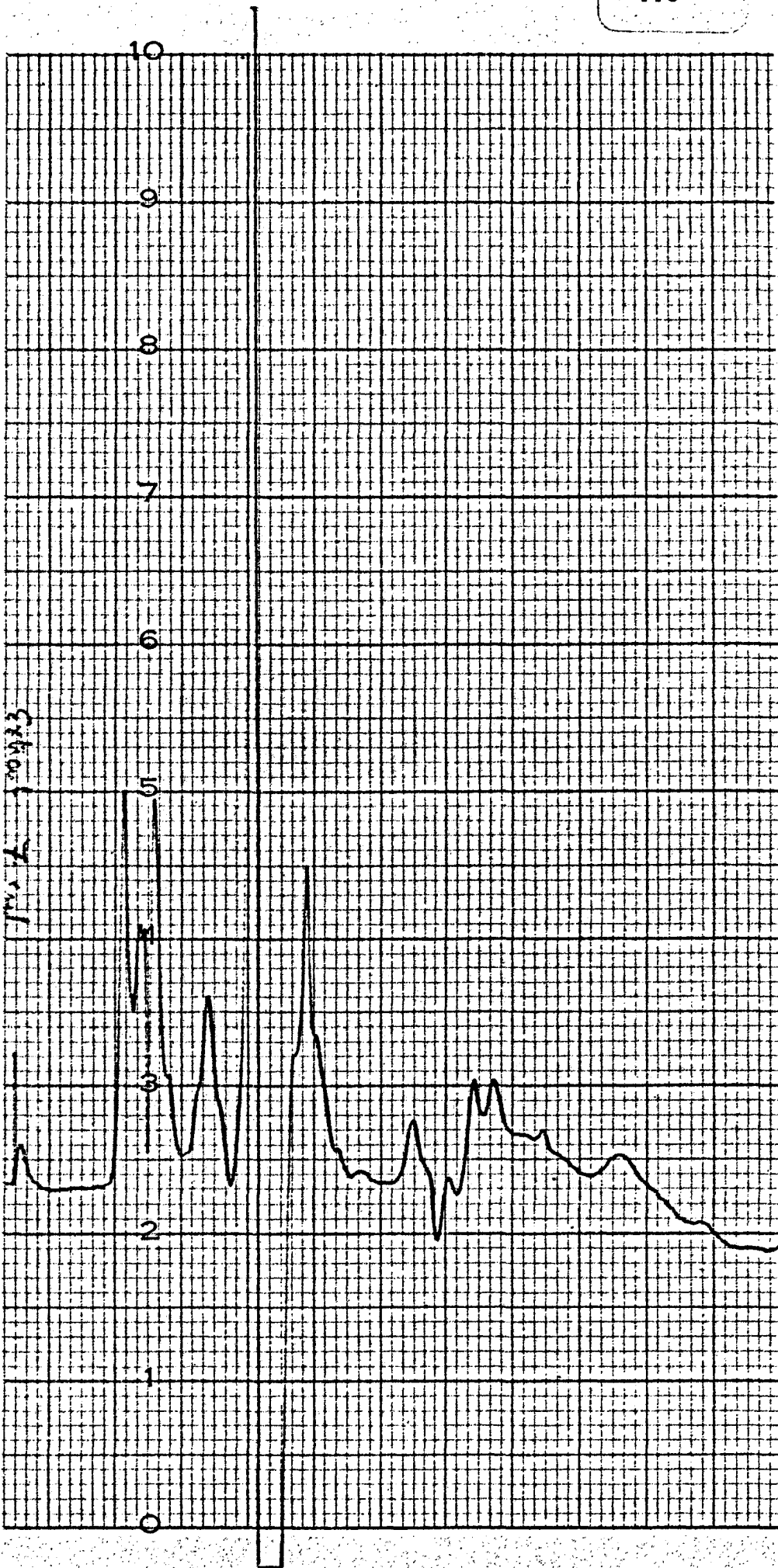
Injection de 5 μ l de l'extract n°3

A 5,9 cm de rétention, pas de pic correspondant.

Courbe V

Injection de 5 μ l de l'extrait n°5

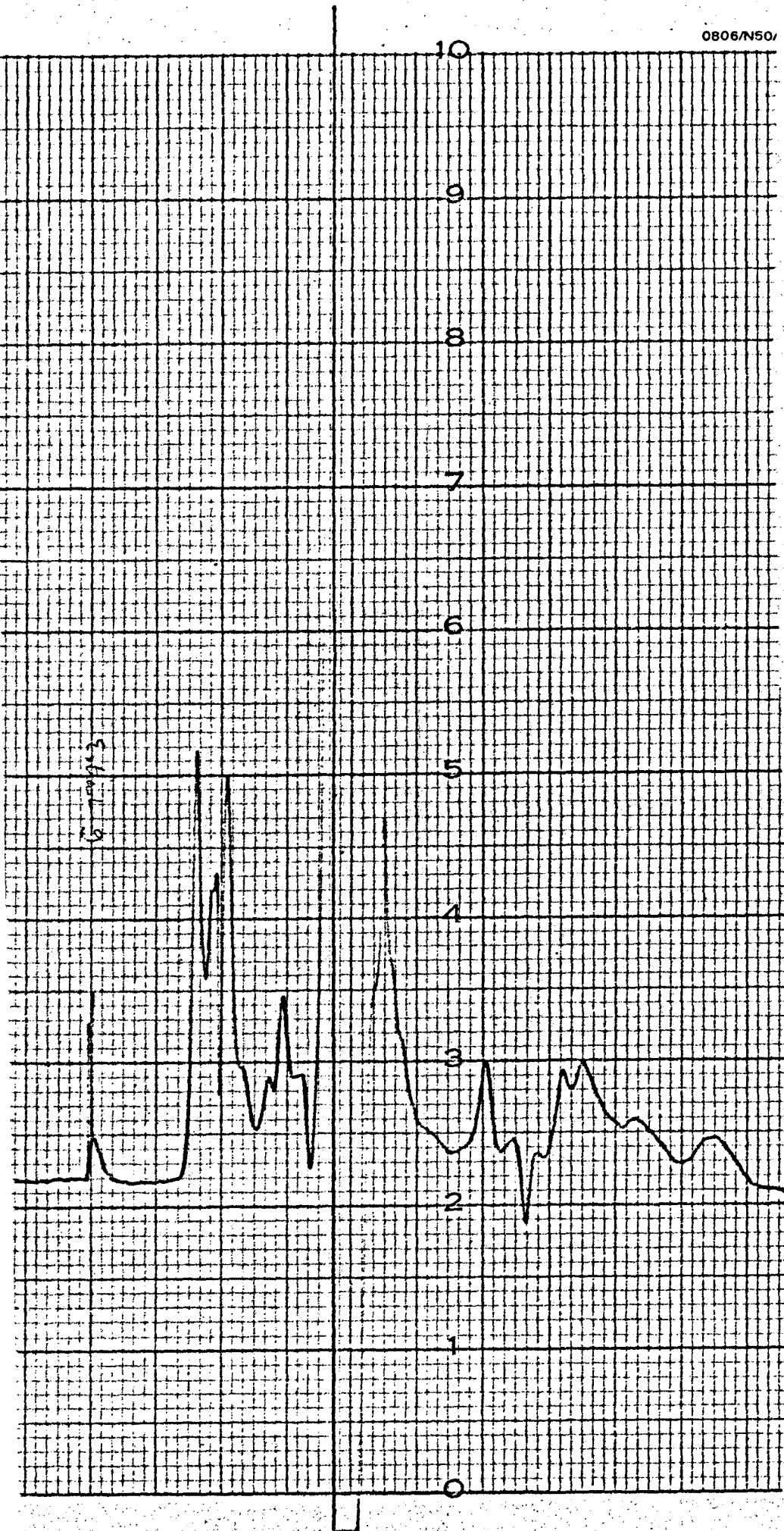
A 5,9 cm de rétention, pas de pic correspondant.

Courbe VI

Injection de 5 μ l de l'extrait n°7

A 5,9 cm de rétention, pas de pic correspondant.

0806/N50/

Courbe VII

Injection de 5 μ l de l'extrait n°2

A 5,9 cm de rétention, pas de pi correspondant.

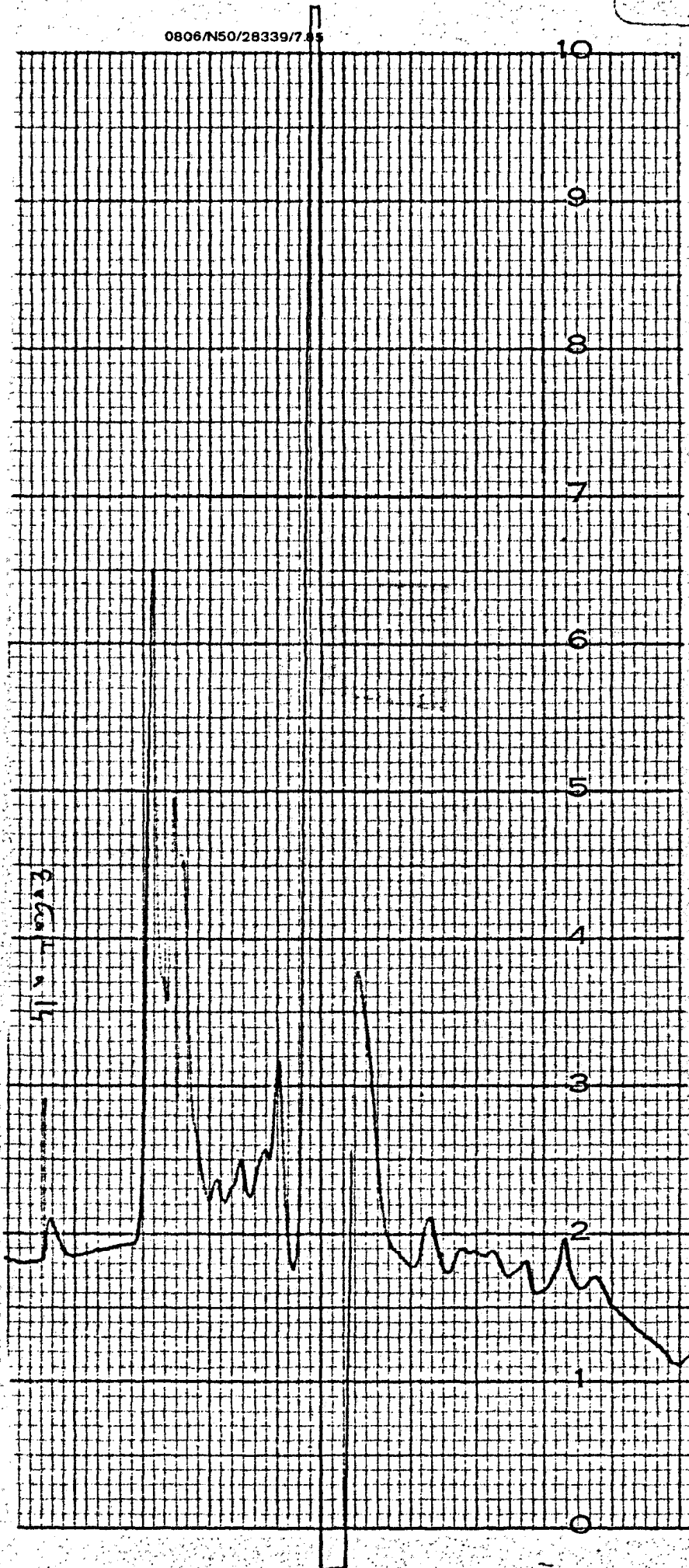


Courbe VIII

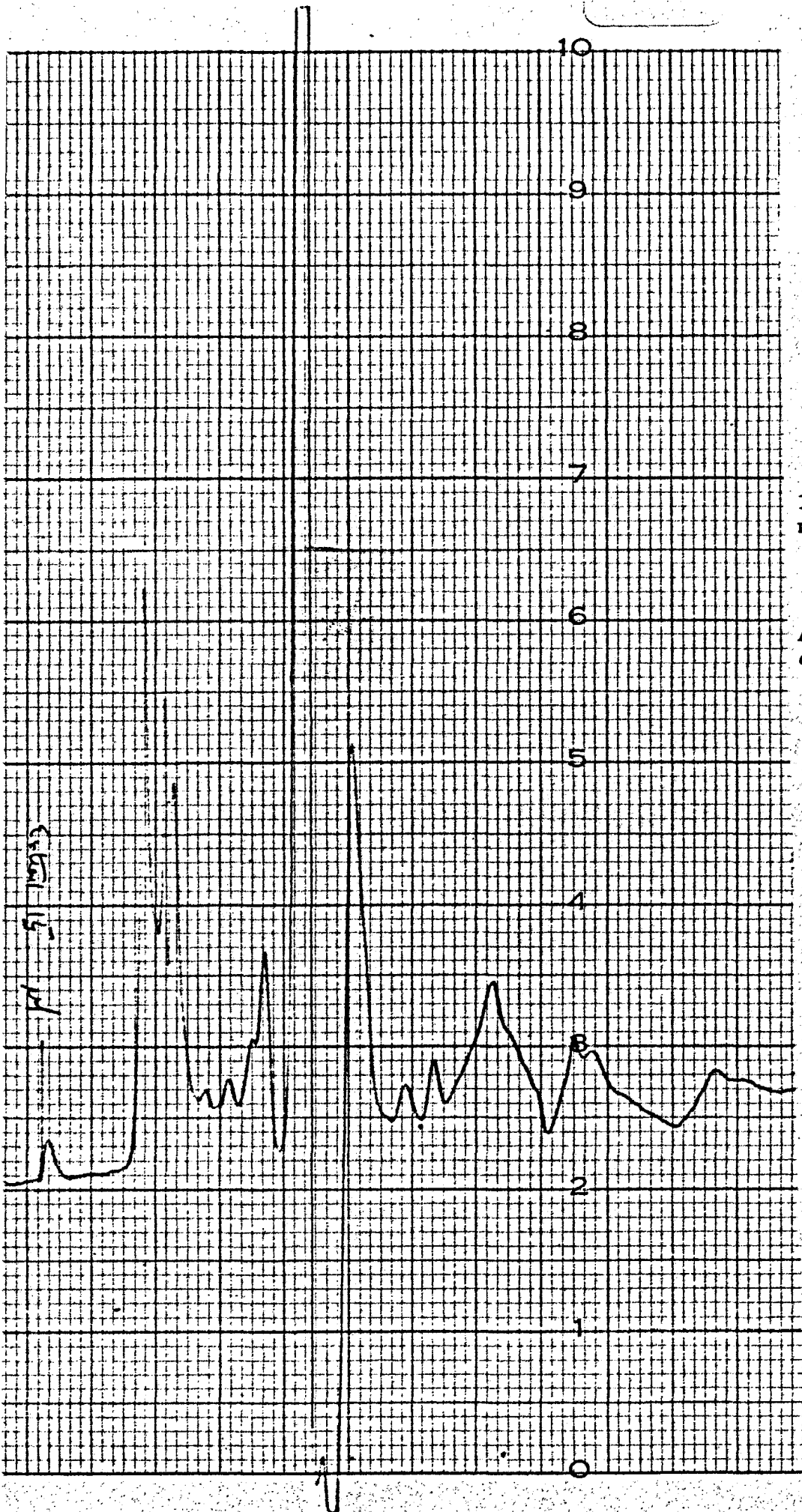
Injection de 5 μ l de l'extrait n°12

A 5,9 cm de rétention, pas de pic correspondant.

0806/N50/28339/7.85

Courbe IXInjection de 5 μ l de l'extrait N°1

A 5,9 cm de rétention, pas de pic correspondant.

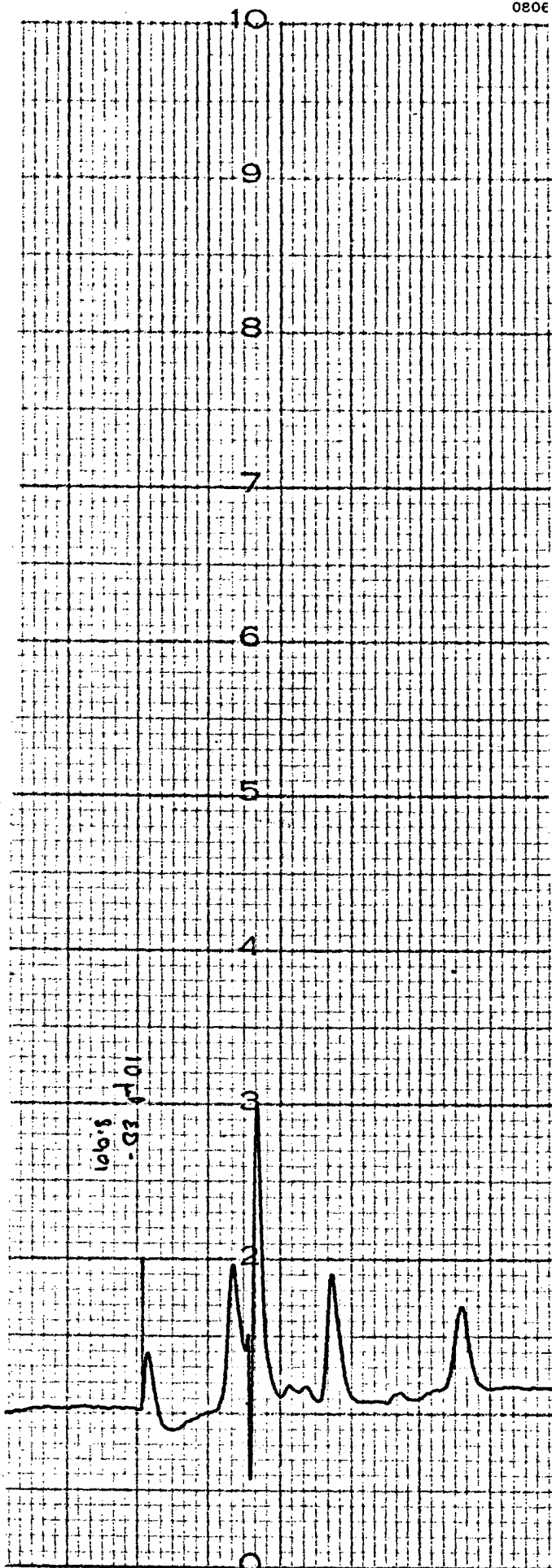


Courbe X

Injection de 5 μ l de l'extrait n°15.

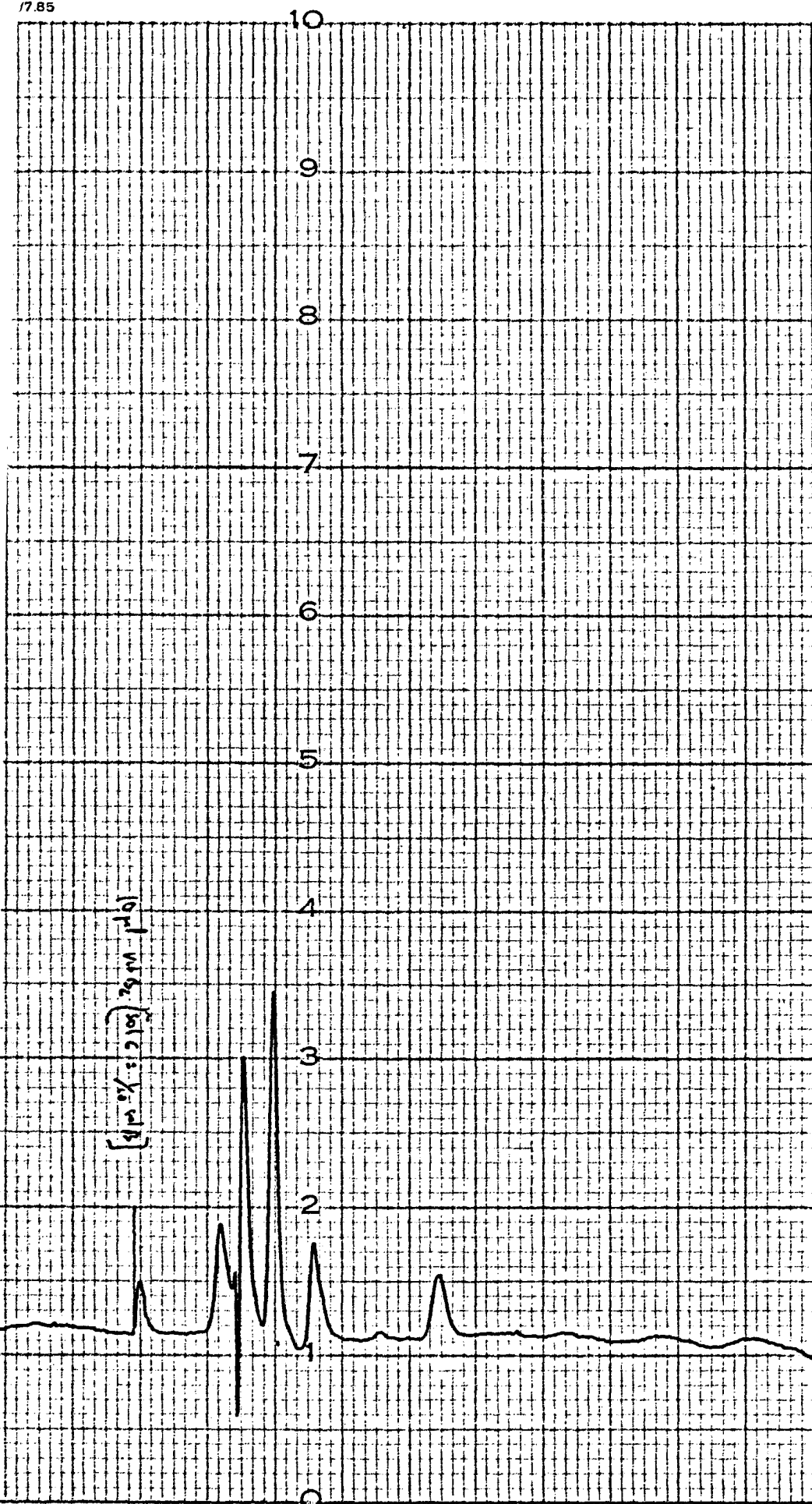
A 5,9 cm de rétention, pas de pic correspondant.

080E

Courbe I

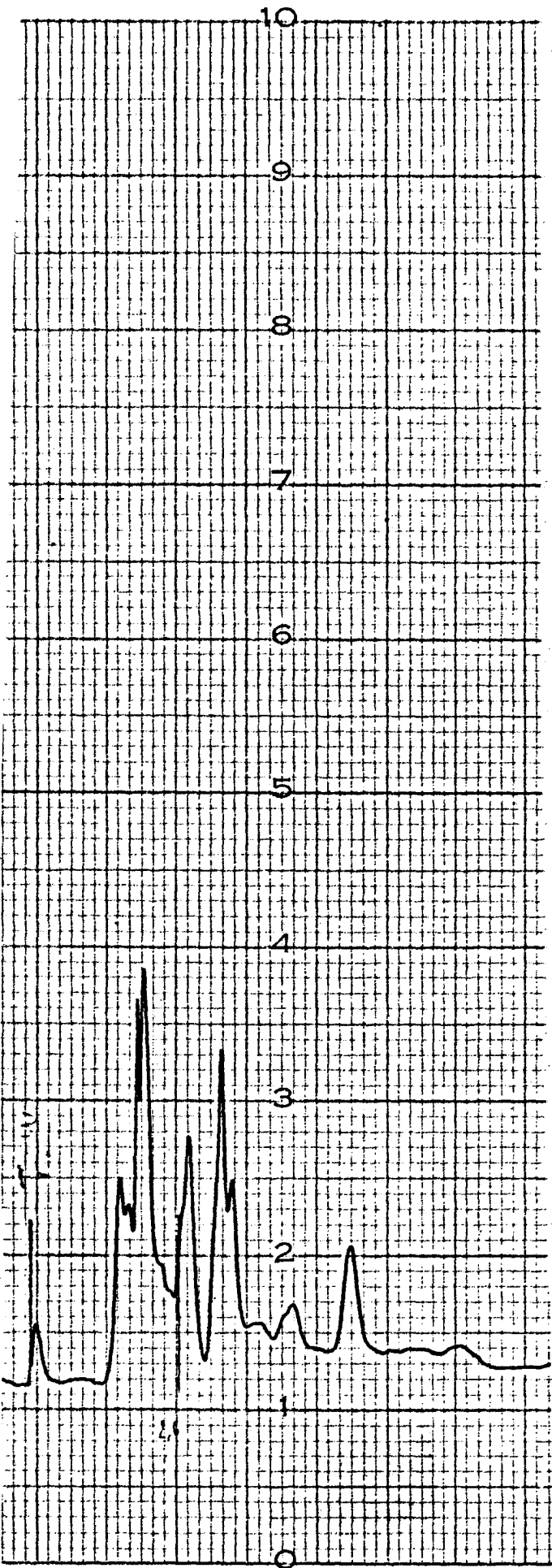
Injectinn de 10 µl d'eau
distillée.

17.85

Courbe II

injection de 10 μ l d'une solution
de vitamine B₂ à 1 mg/l.

On observe , à 2,1 cm de rétention
un pic supplémentaire correspondant
à la vitamine B₂

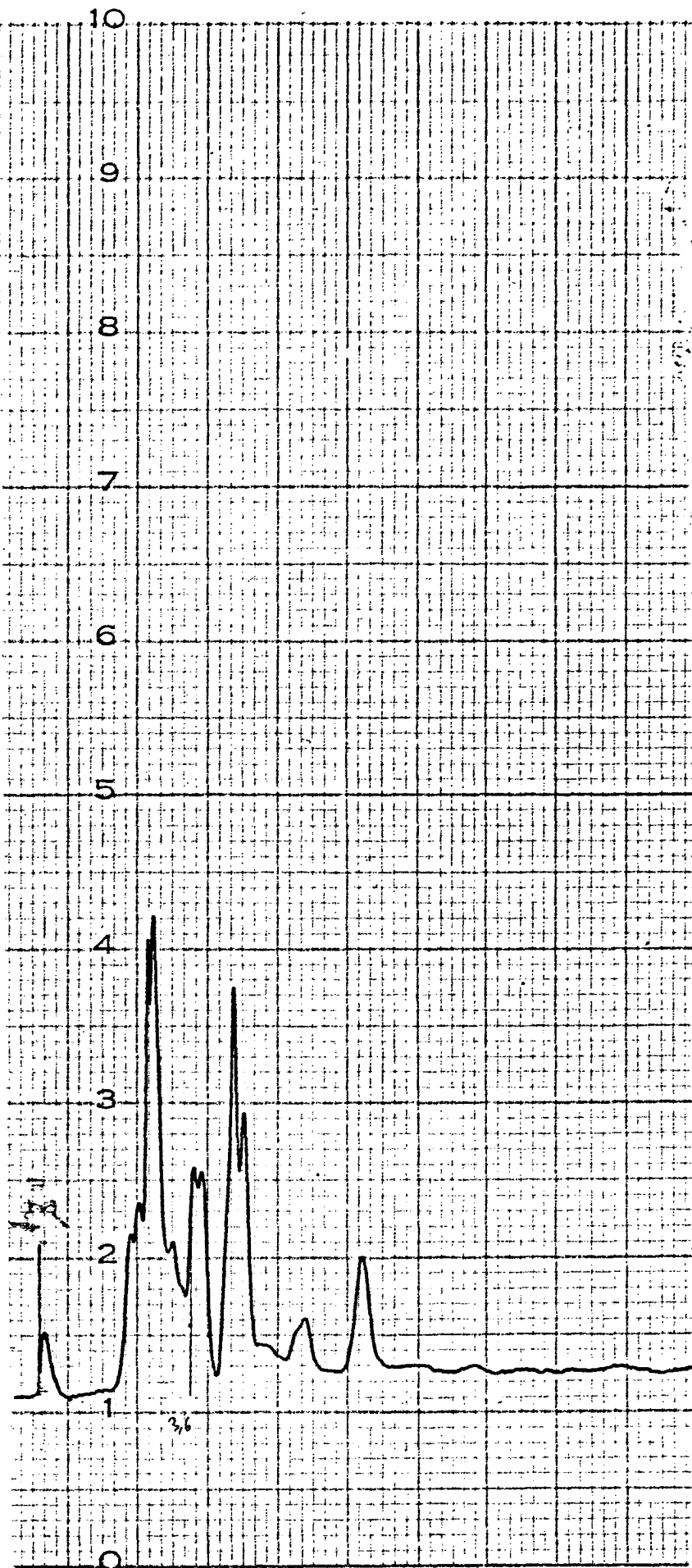


Courbe III

Injection de 10 μ l de l'extrait n° 1
On observe, malgré la mauvaise résolution
un pic à 2,1 cm de rétention, pic d'une
hauteur de 2,6 cm

0806/N50/28339/7.85

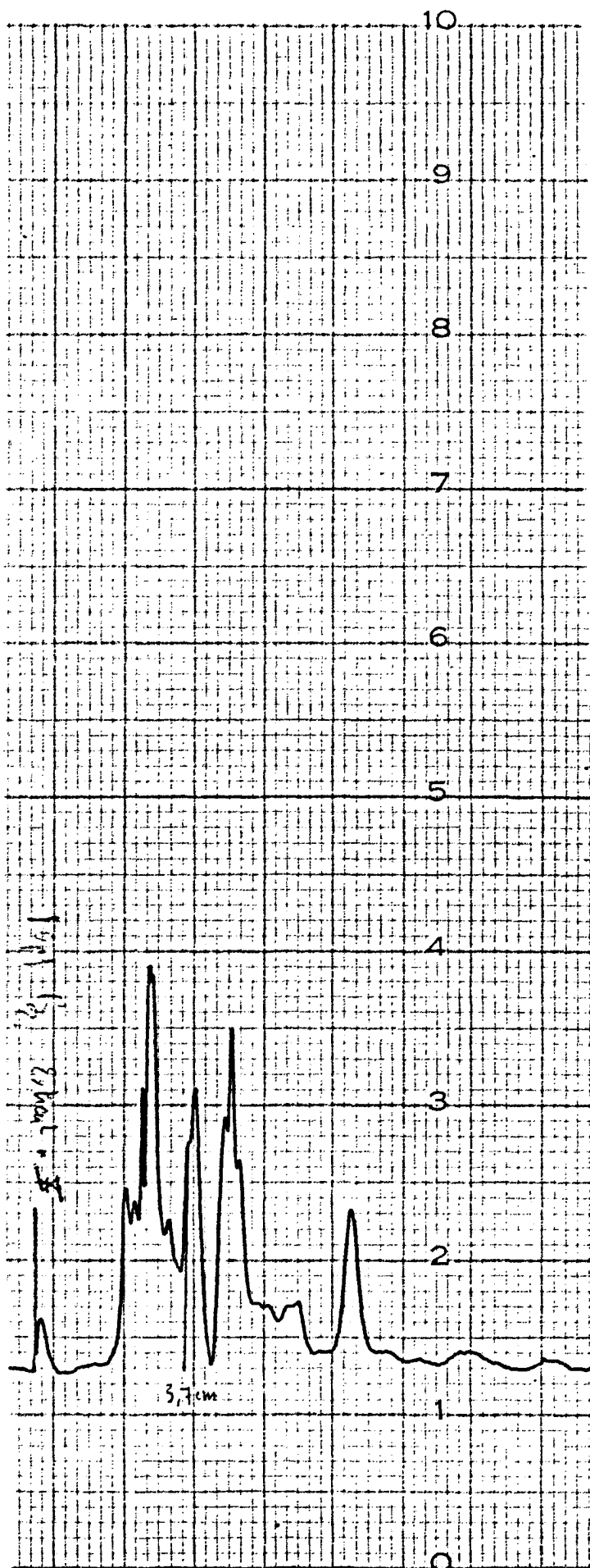
Courbe n° IVInjection de 10 μ l de l'extrait n°3On observe à 2,1 cm de rétention un pic
d'une hauteur de 4 cm.



Courbe V

Injection de 10 μ l de l'extrait n°4

On observe à 2,1 cm de rétention un pic d'une hauteur de 3,6 cm.

Courbe VI

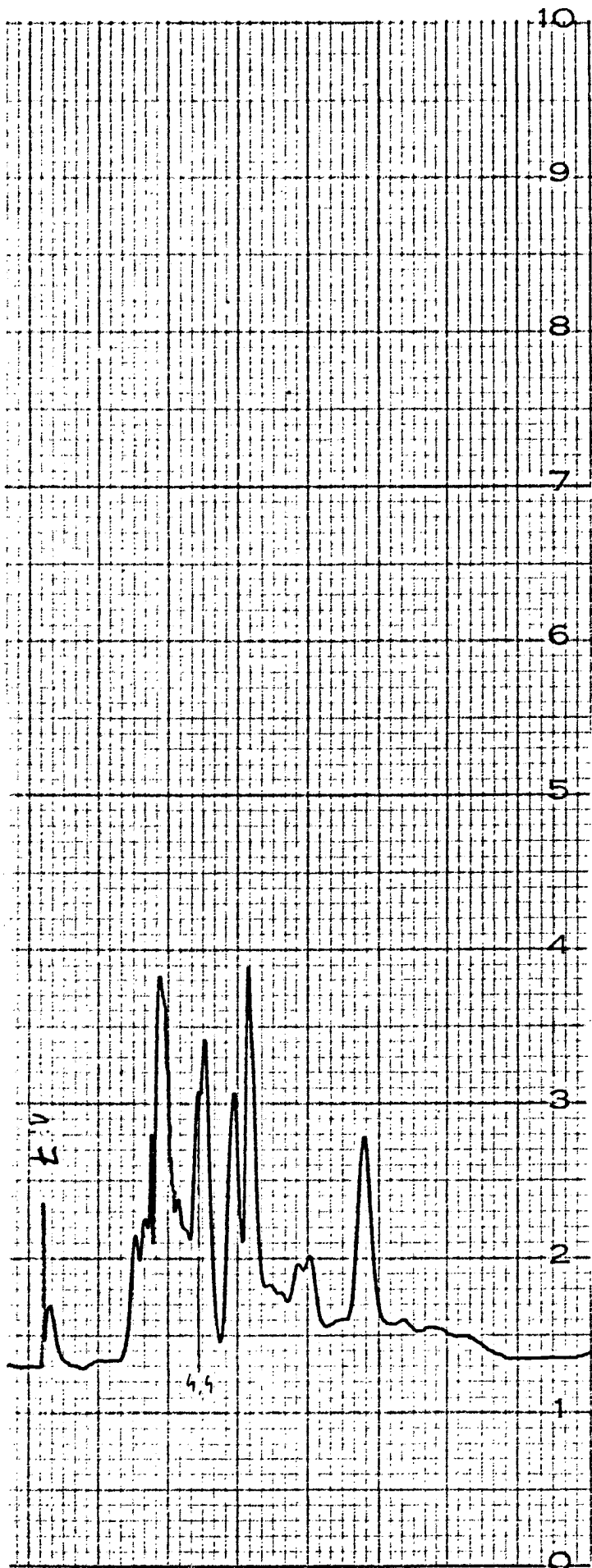
Injection de 10 μ l de l'extrait n°5

On observe à 2,1 cm de rétention, mal résolu du pic suivant, un pic d'une hauteur de 3,7 cm

Courbe VII

Injection de 10 μ l de l'extrait n°7

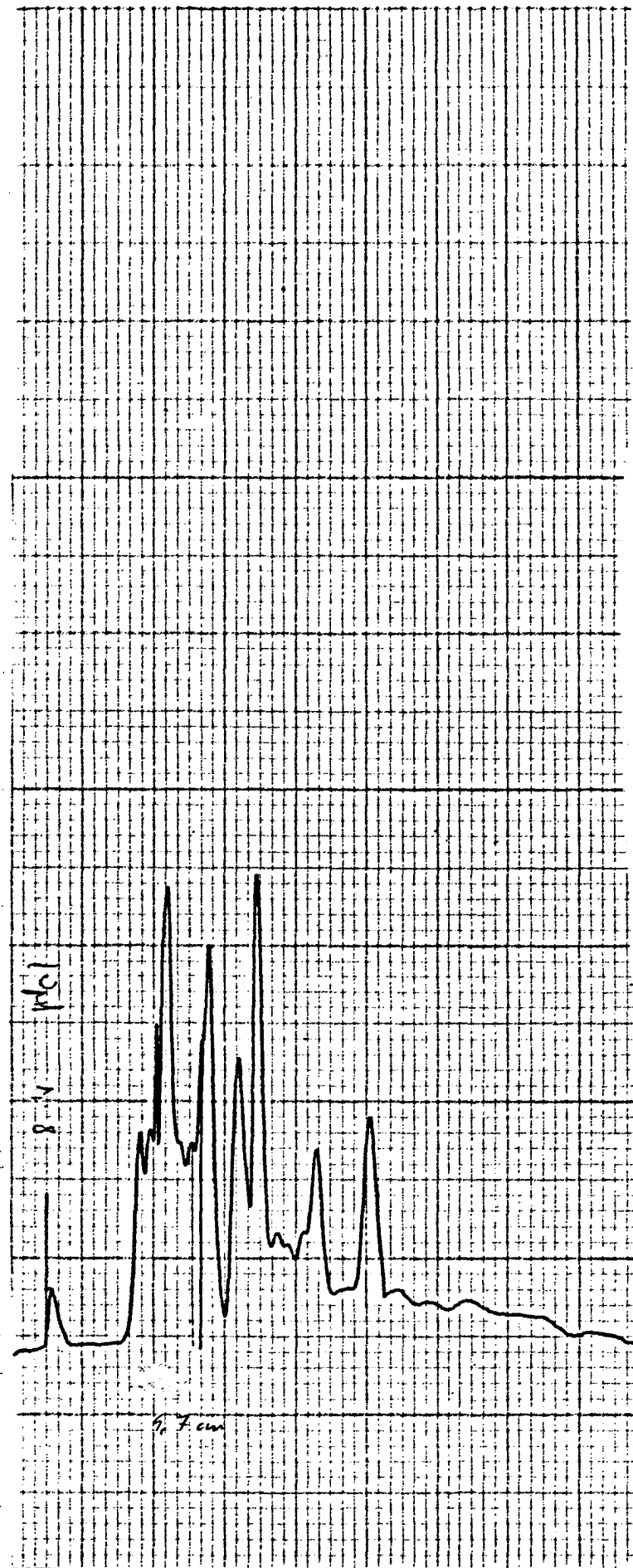
On observe , se détachant mal du pic suivant, un pic de 4,4 cm de hauteur à une rétention de 2,1 cm.



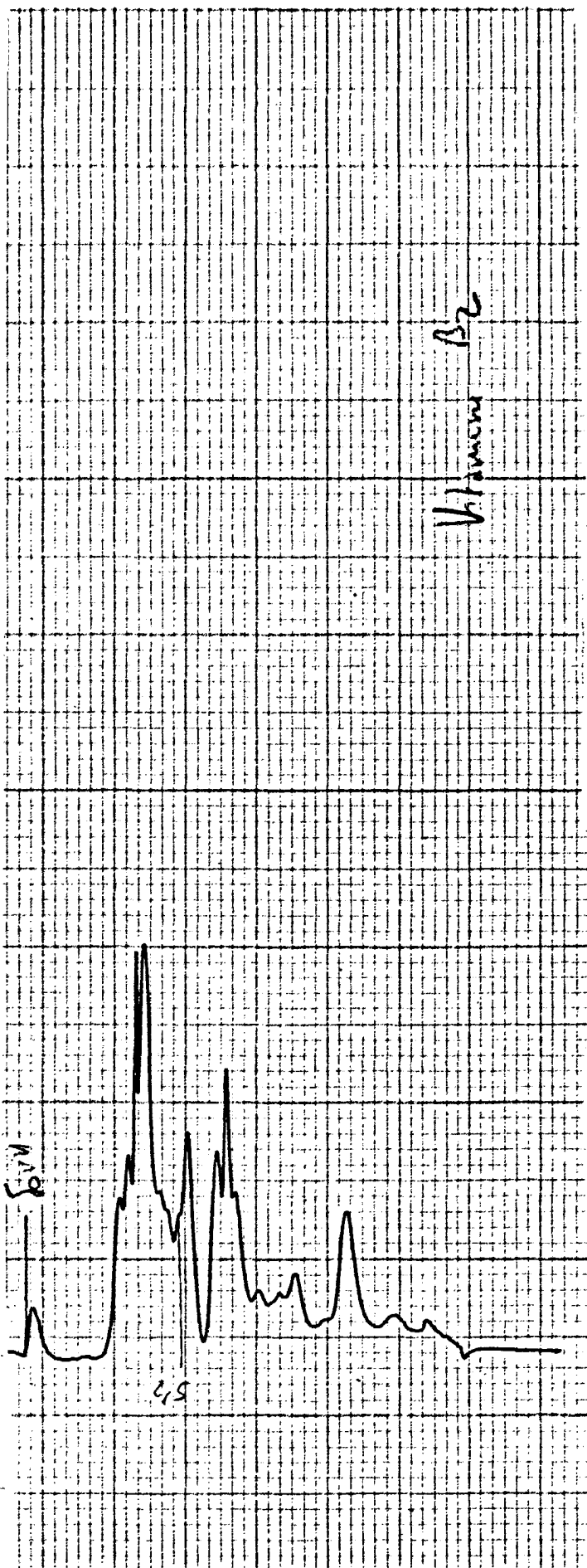
0806/N50/28339/7.85

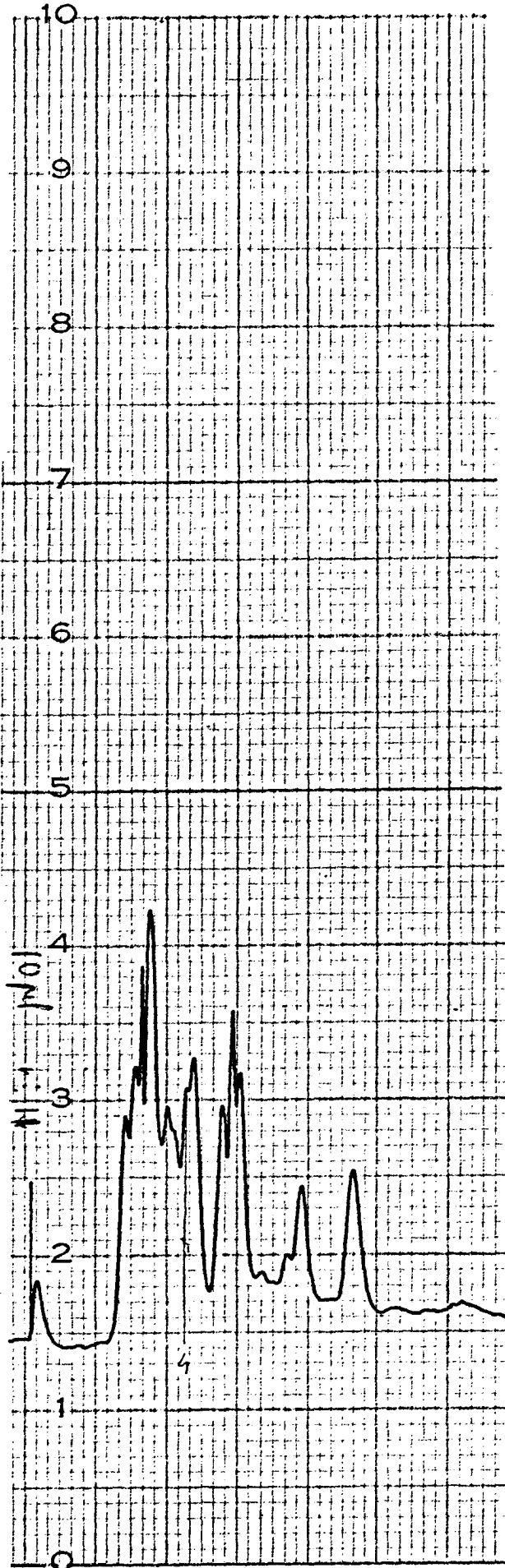
Courbe n°VIIIInjection de 10 μ l de l'extrait n°8

On observe à 2,1 cm de rétention, un pic de 4,7 cm de hauteur, presque confondu avec le suivant.



0806/N50/28339/7.85

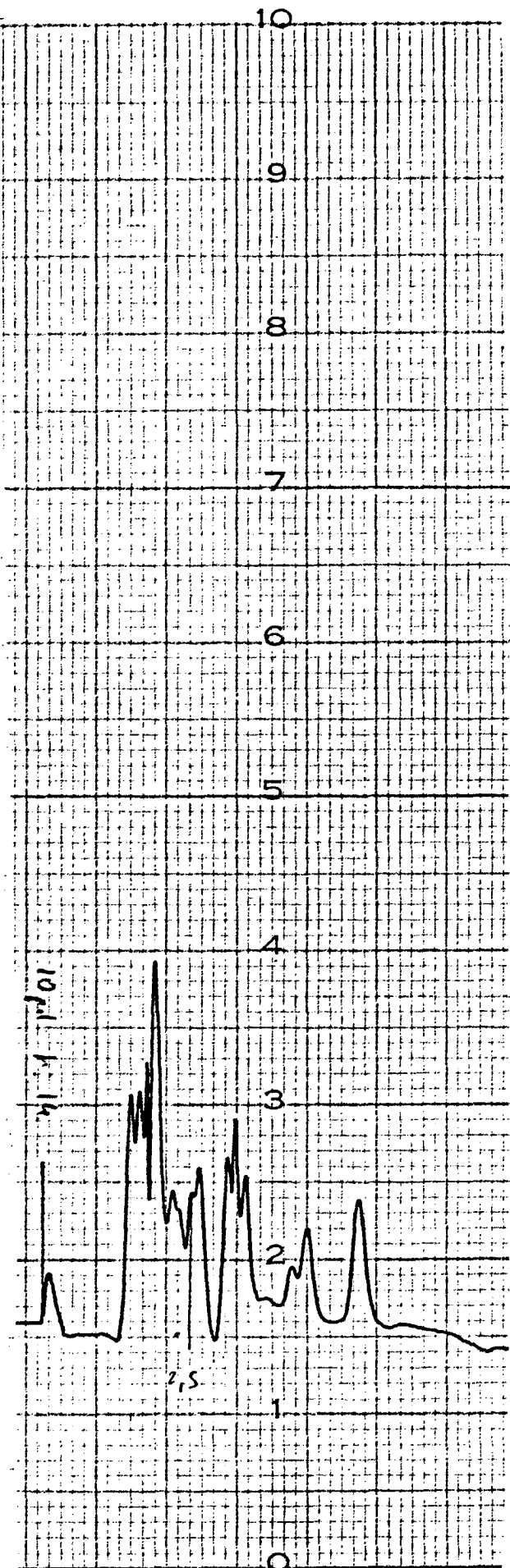
Courbe IXInjection de 10 μ l de l'extrait n°9On observe, à 2,1 cm de rétention un pic
de 2,5 cm de hauteur.



Courbe X

Injection de 10 μ l de l'extrait n° 11

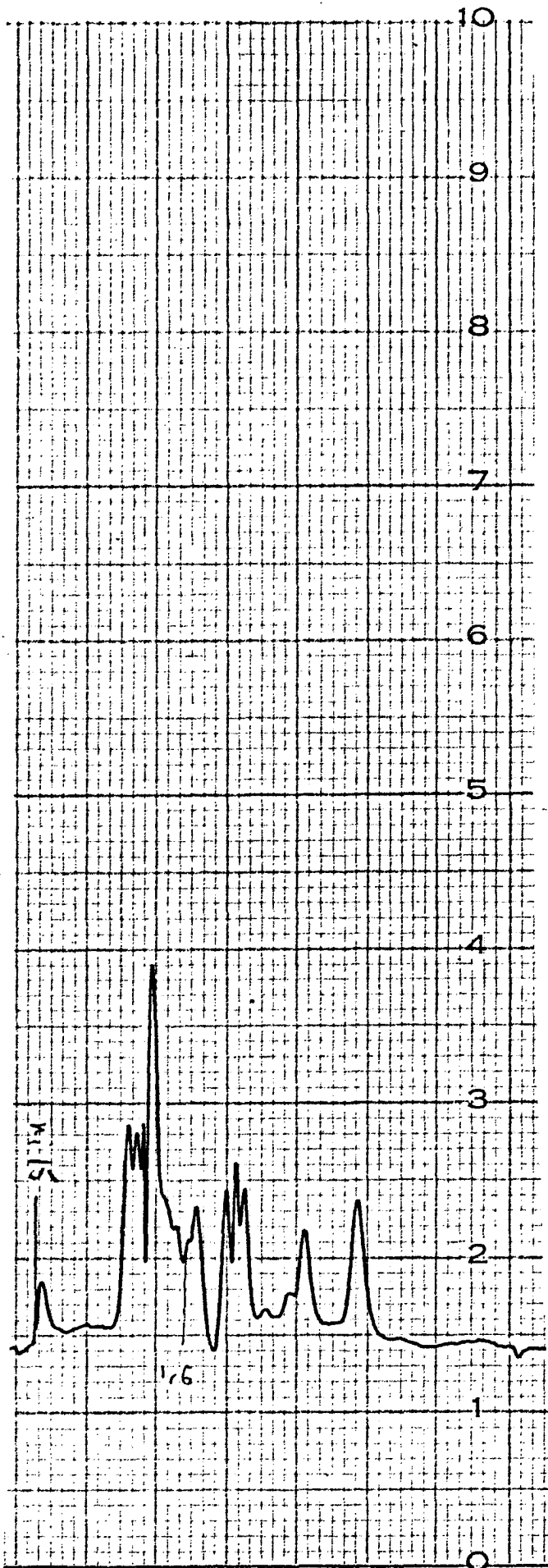
On observe, à 2,1 cm de rétention
un pic d'une hauteur de 4 cm.



Courbe XI

Injection de 10 μ l de l'extrait n°14

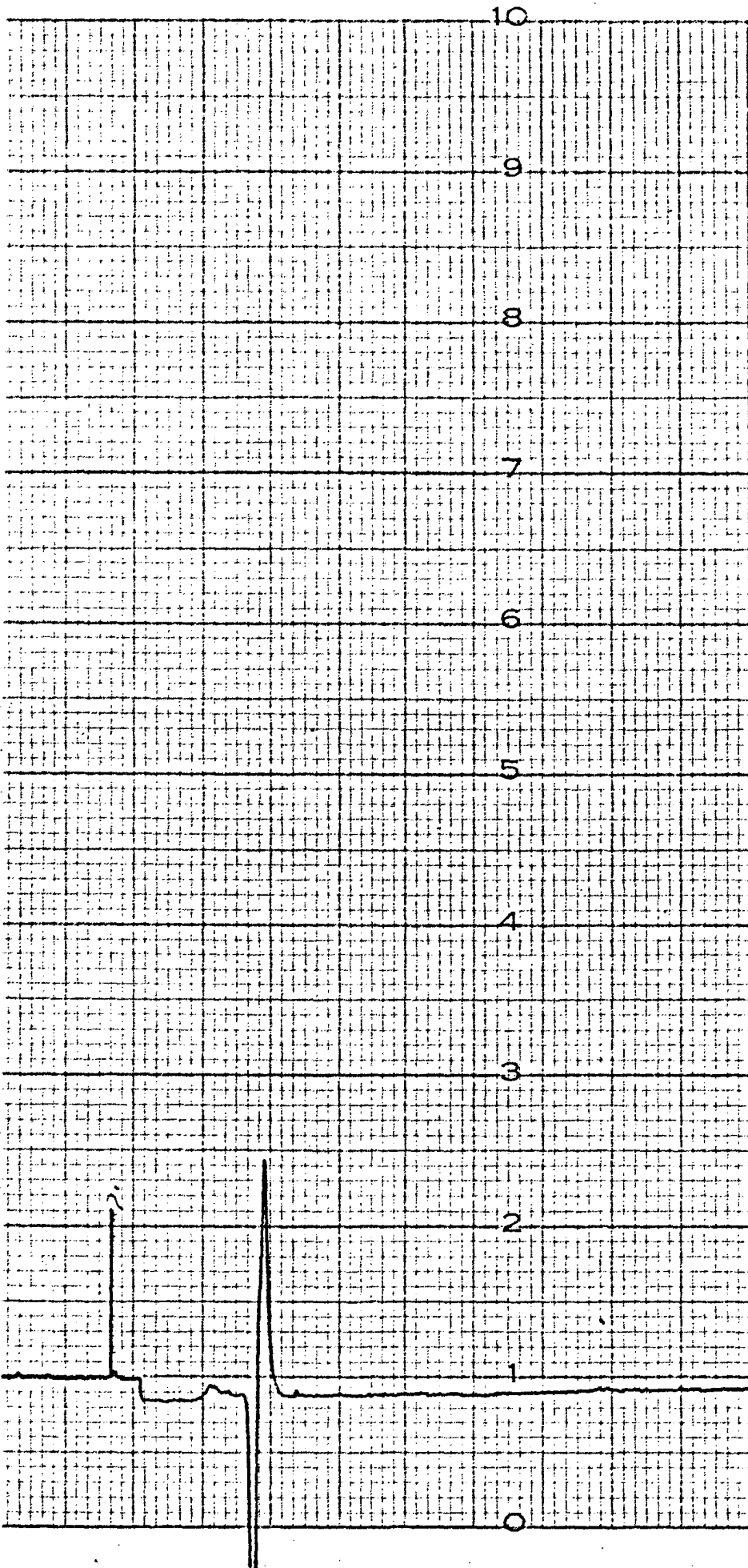
On observe, à 2,1 cm de rétention
un pic de 2,5 cm de hauteur.



Courbe XII

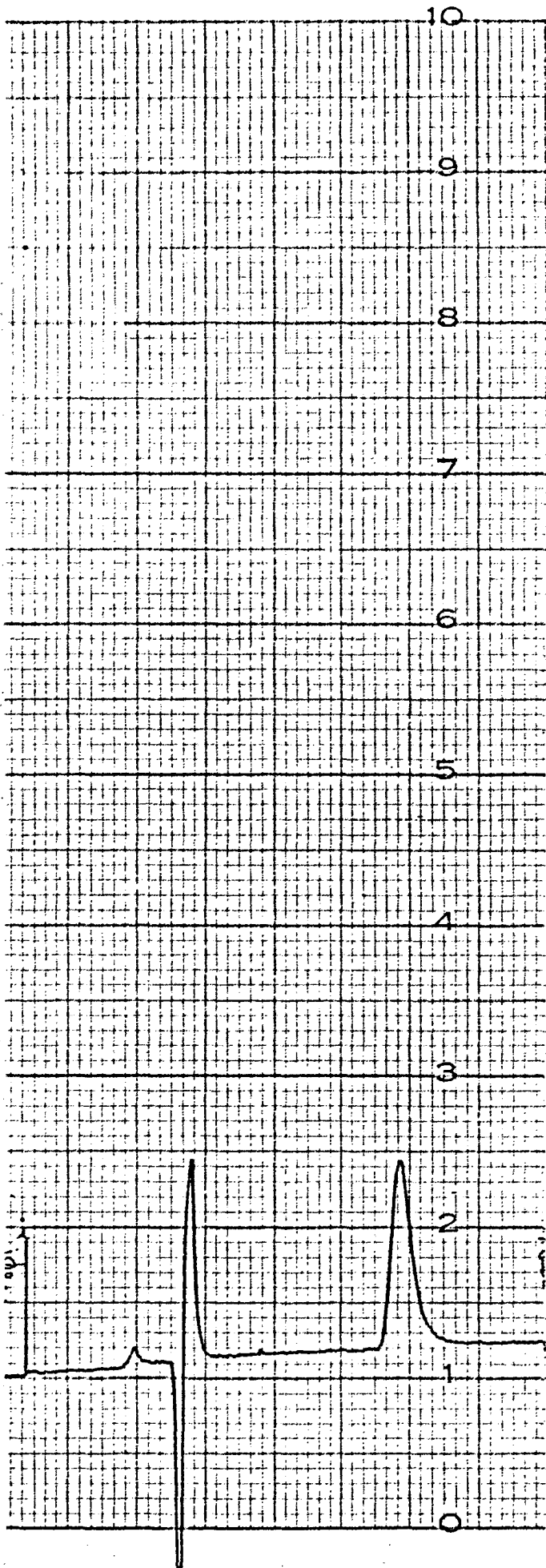
Injection de 10 μ l de l'extract n°15

On observe à 2,1 cm de rétention, un pic de 1,6 cm de hauteur.



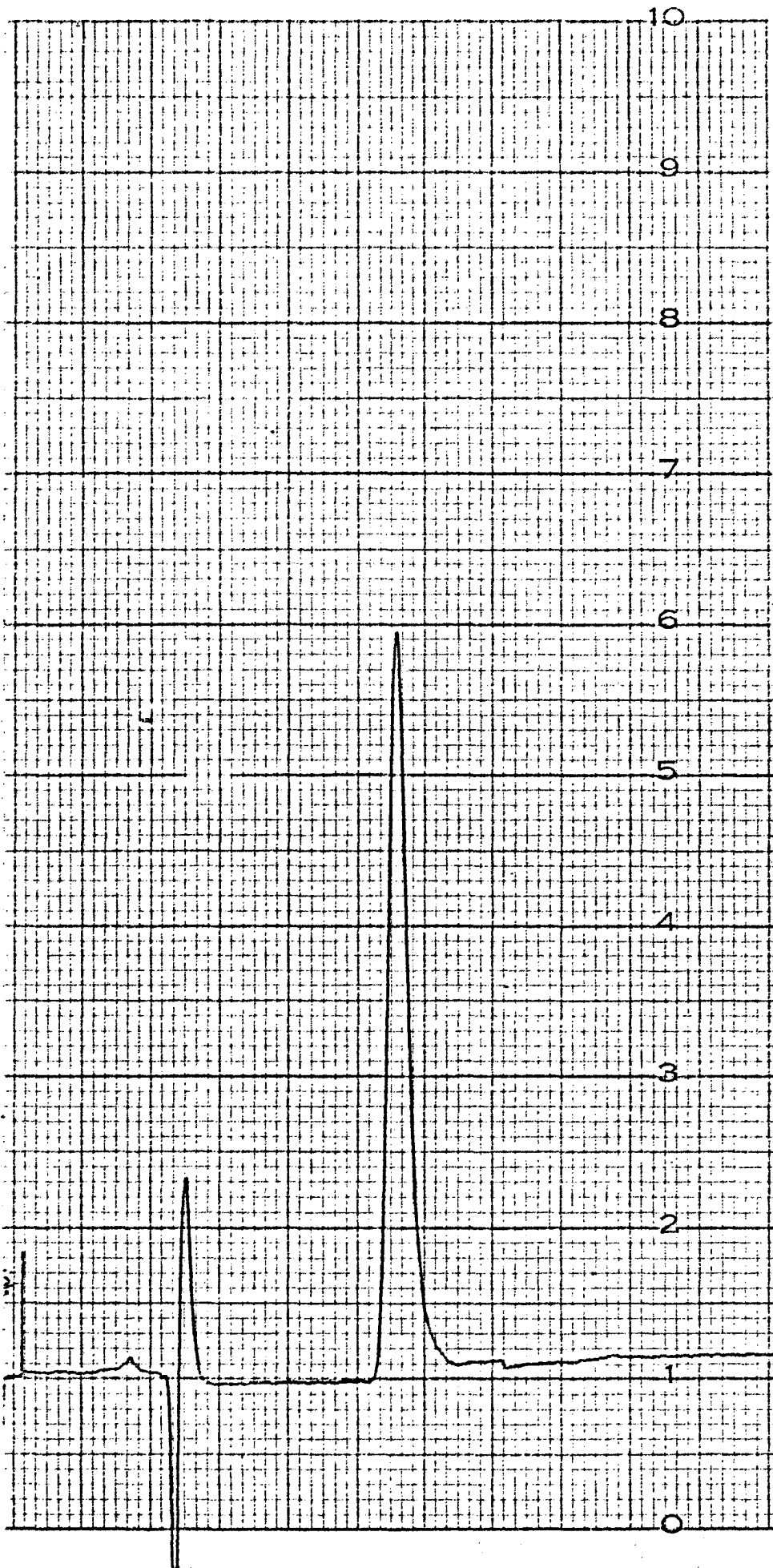
COURBE I

Injection : 10 μL H_2O



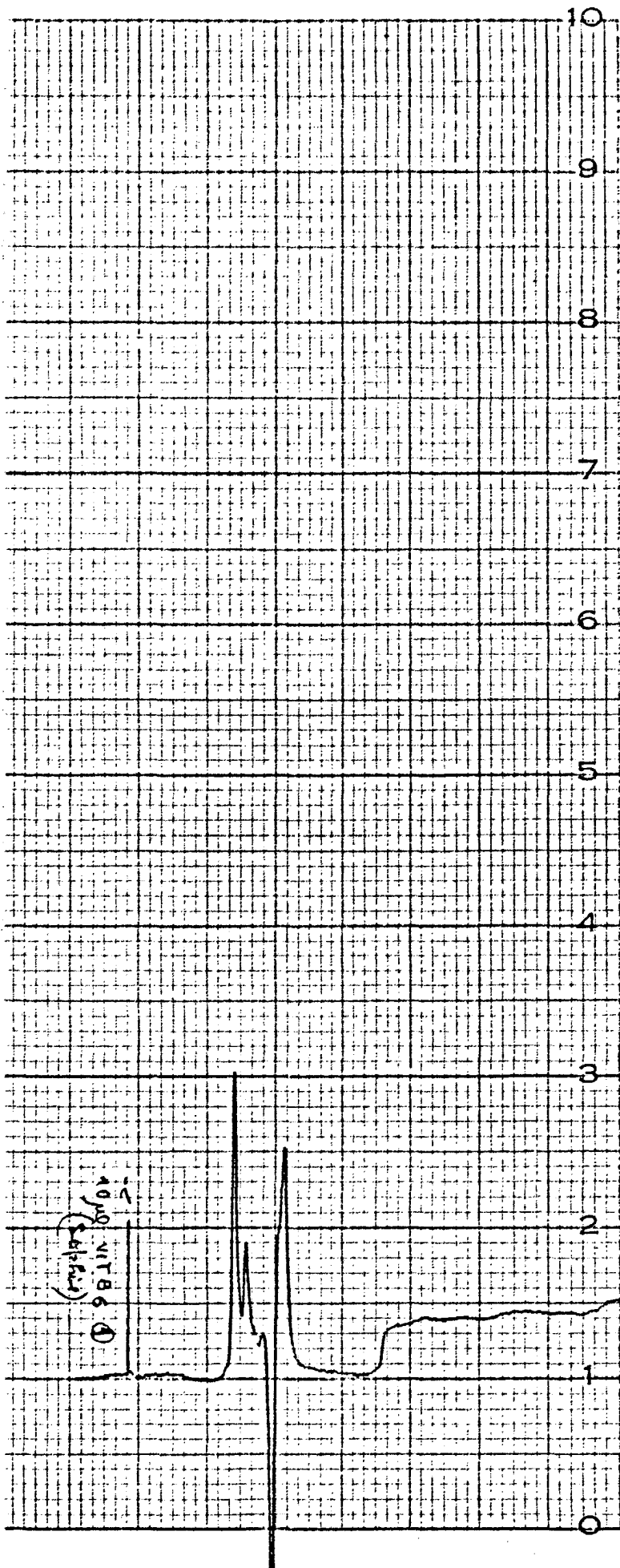
COURBE II

Injection : 10 μ l d'étalon vitamine B₆
de concentration 0,325mg/100



COURBE III

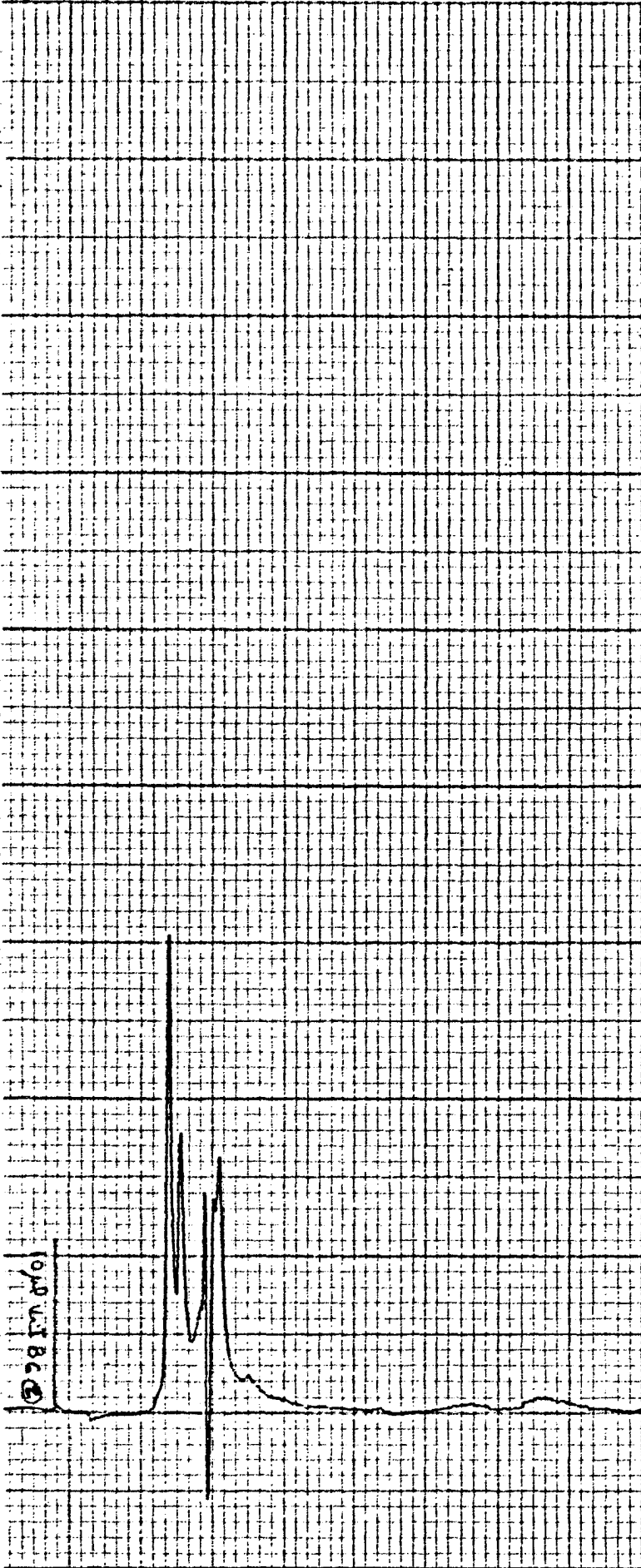
Injection : 10 μ l d'étalon vitamine B₆
de concentration 1,3 mg/100

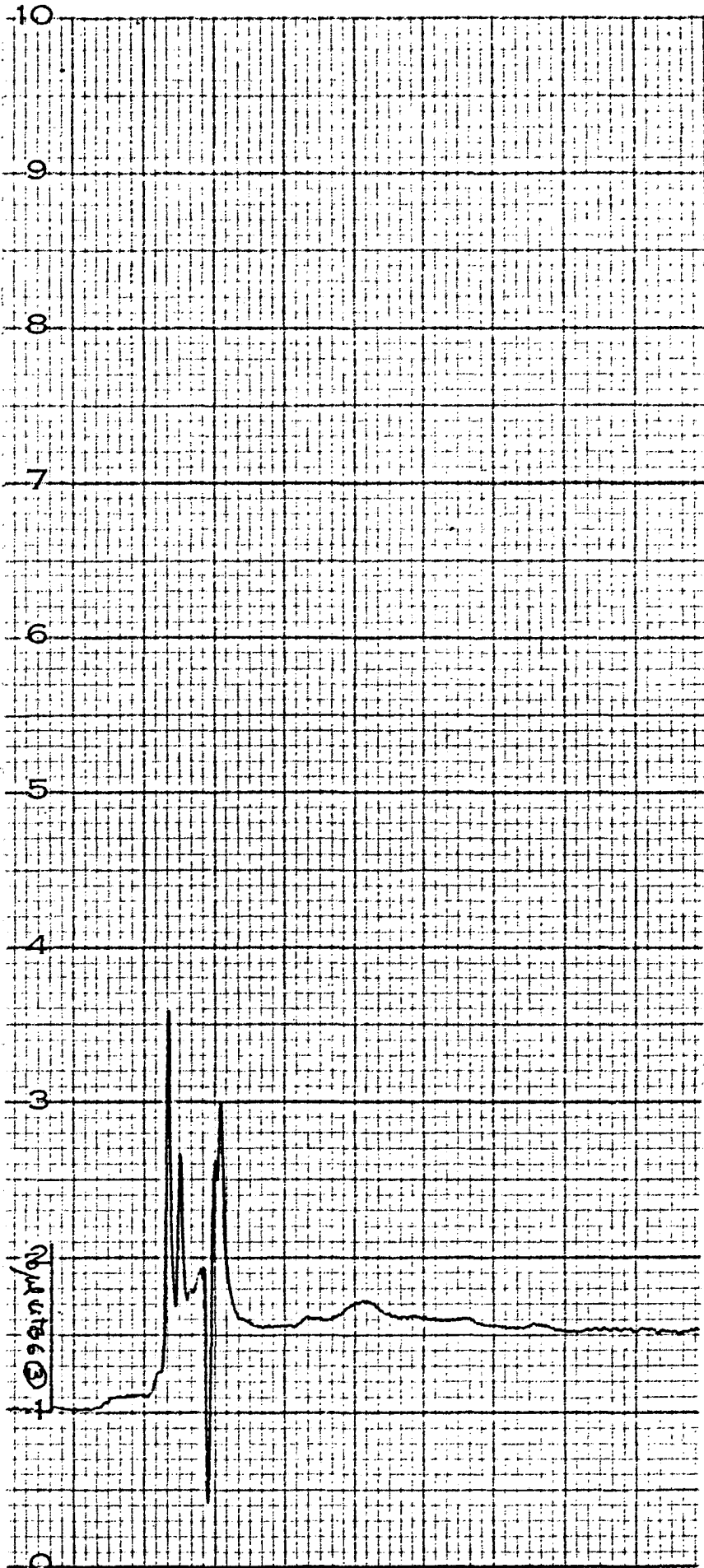


COURBE IV

Injection : 10 μ l d'extrait n° 1

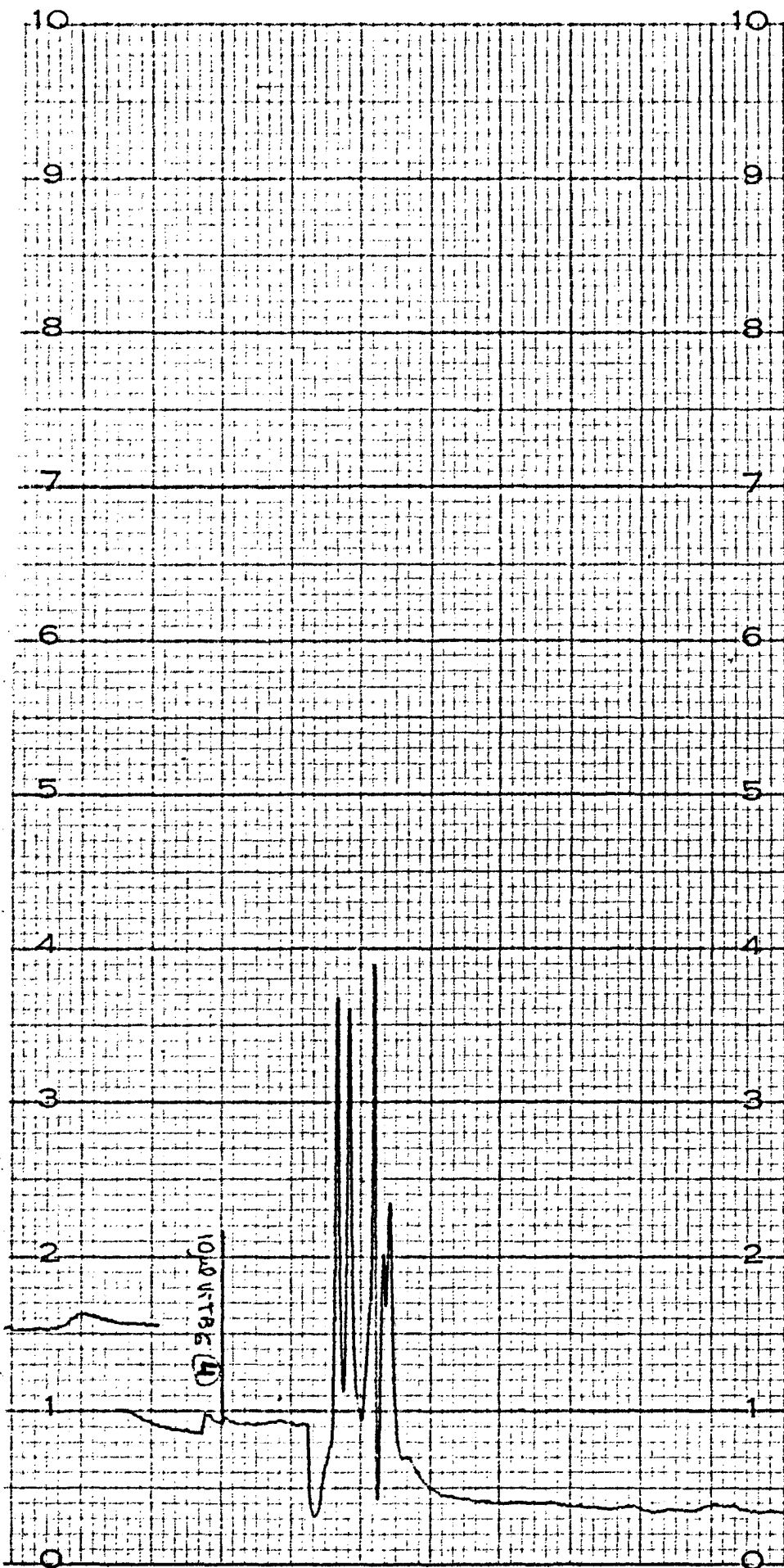
0806/N50/28339/7.85

COURBE VInjection : 10 µl d'extract n° 2



COURBE VI

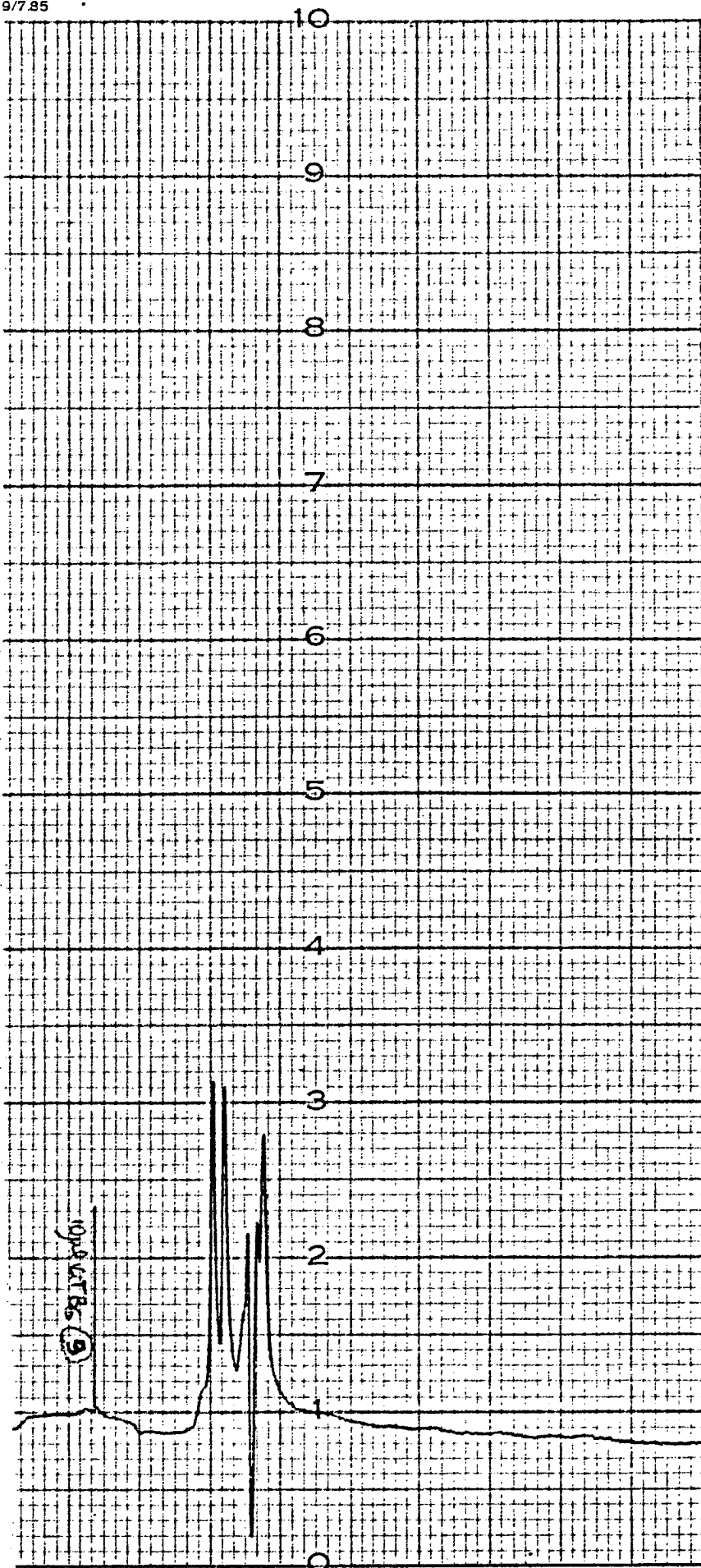
Injection : 10 μ l d'extrait n° 3

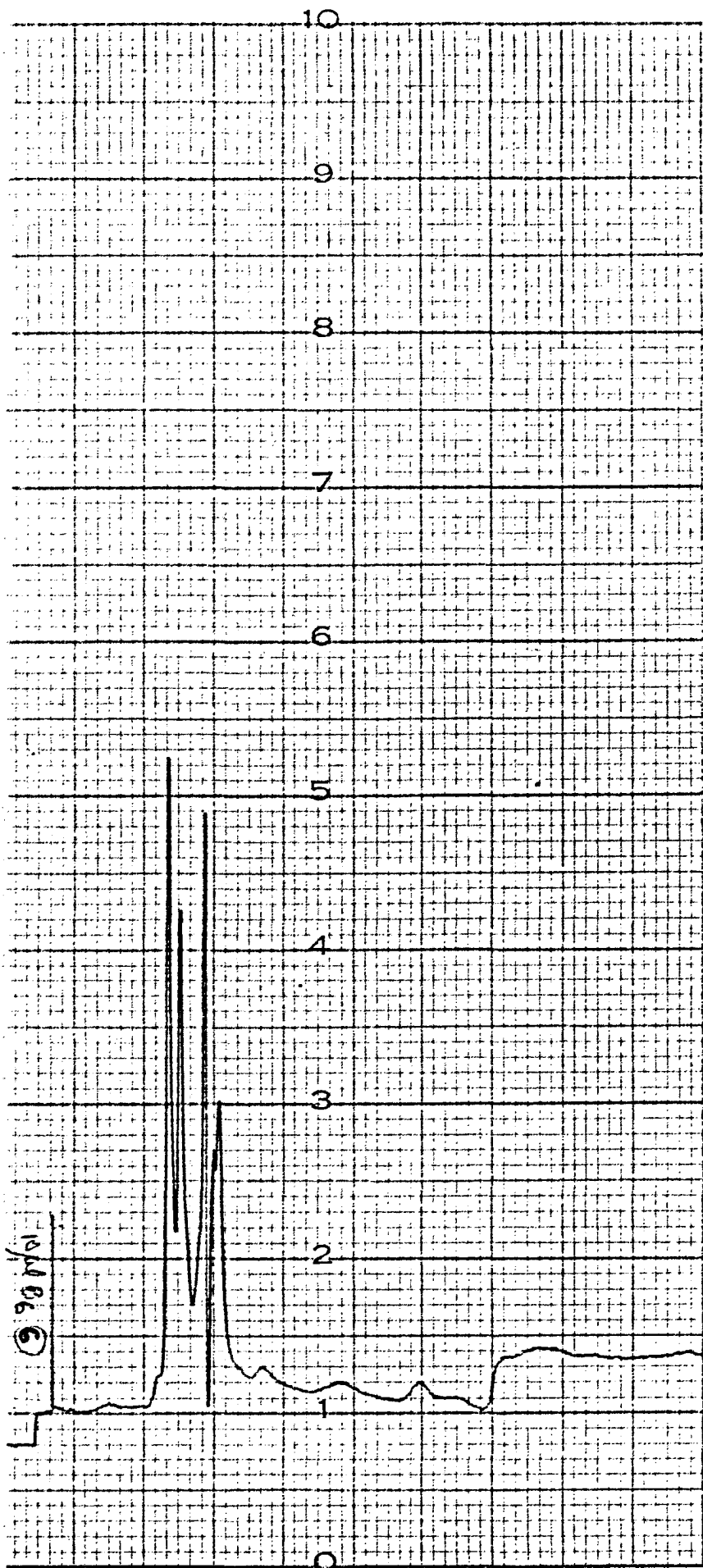


COURBE VII

Injection : 10 μ l d'extrait n° 4

9/785

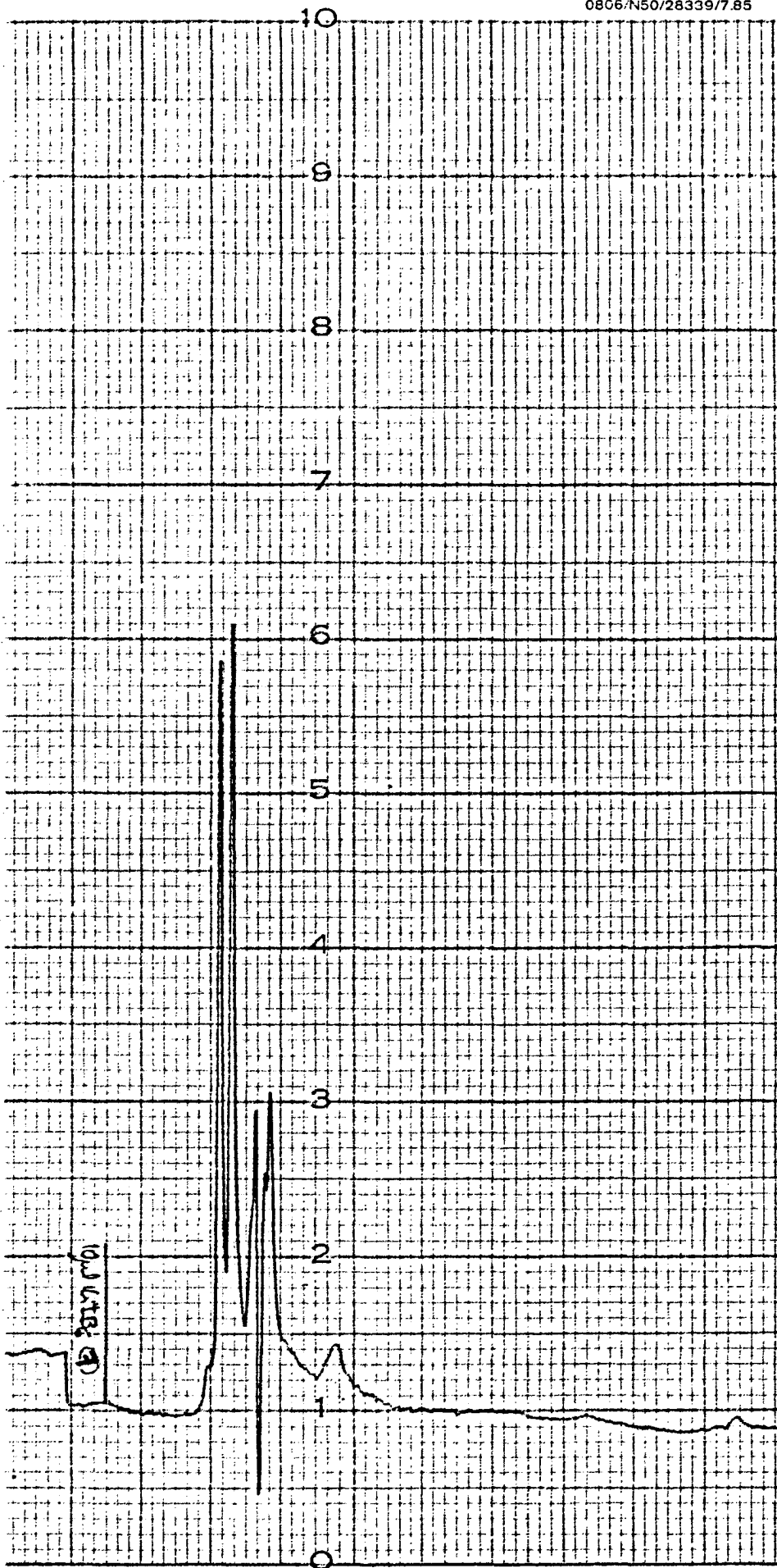
COURBE VIIIInjection : 10 μ l d'extrait n° 5



COURBE IX

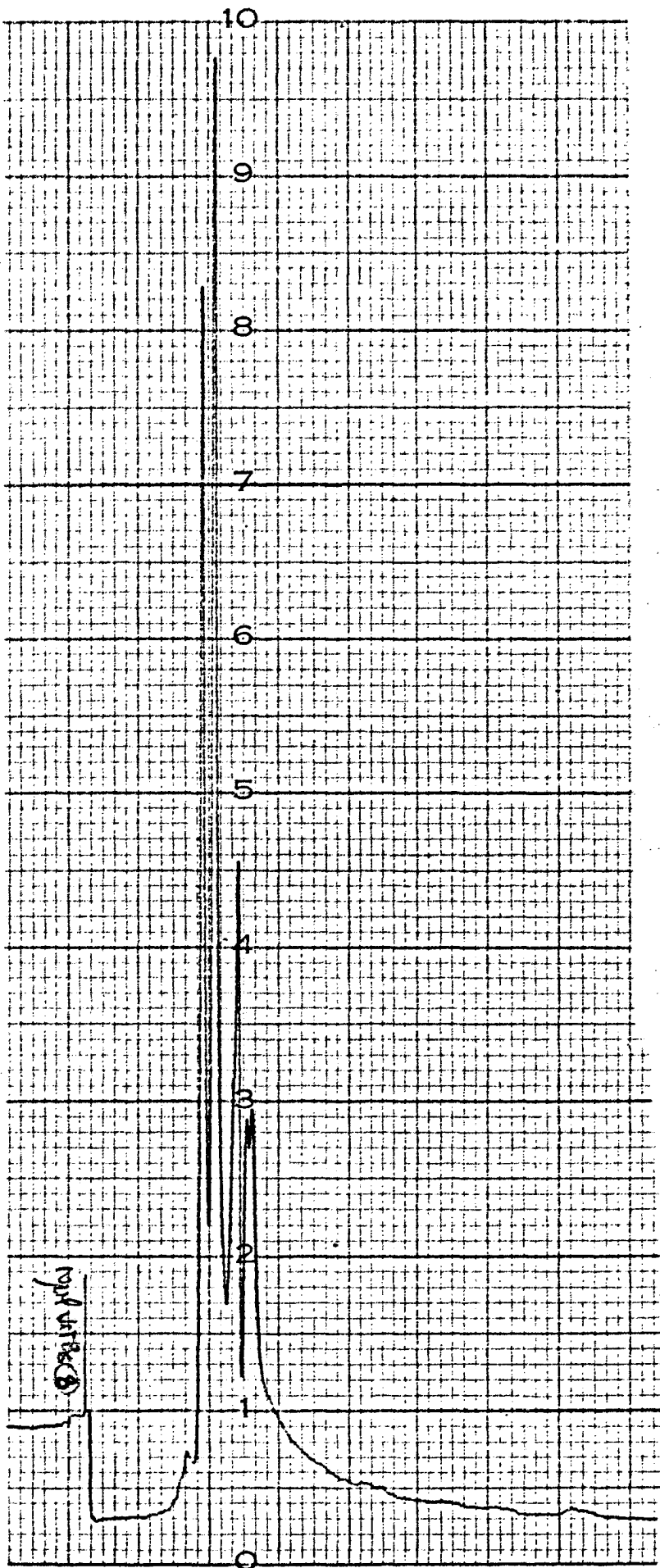
Injection : 10 μ l d'extrait n° 6

0806/N50/28339/7.85



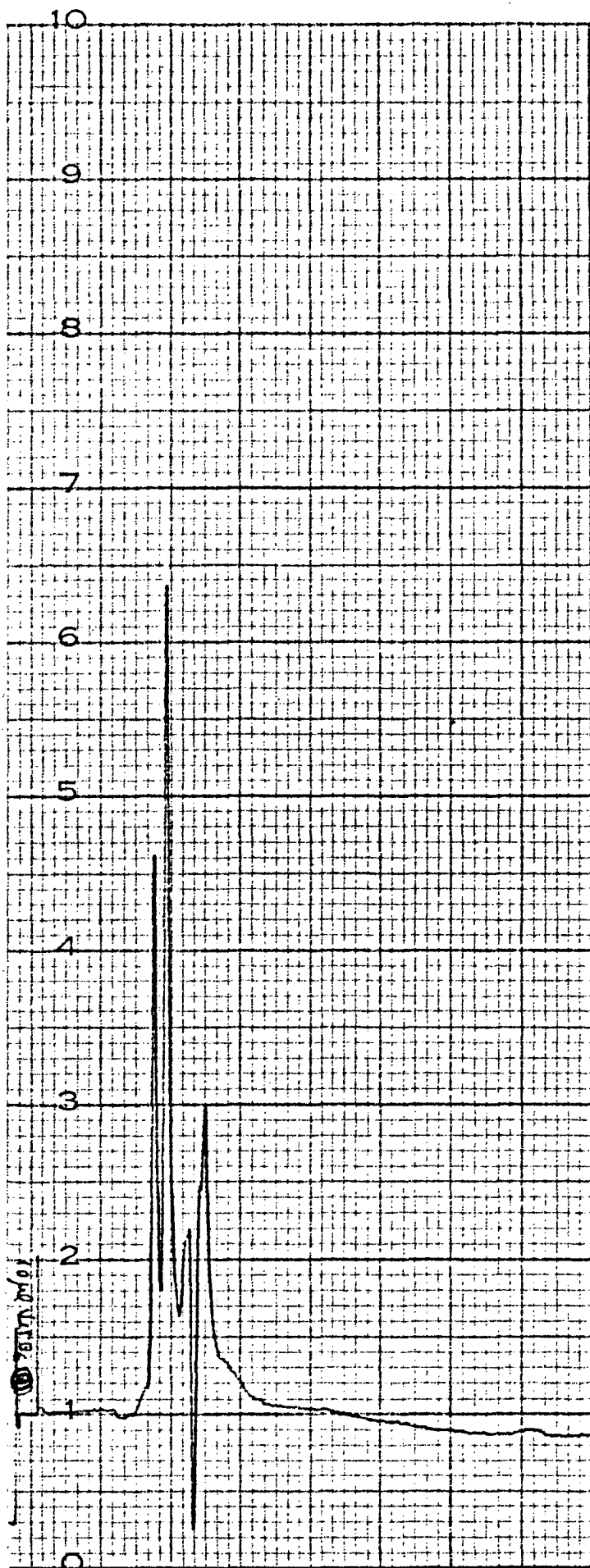
COURBE X

Injection : 10 µl d'extrait n° 7



COURBE XI

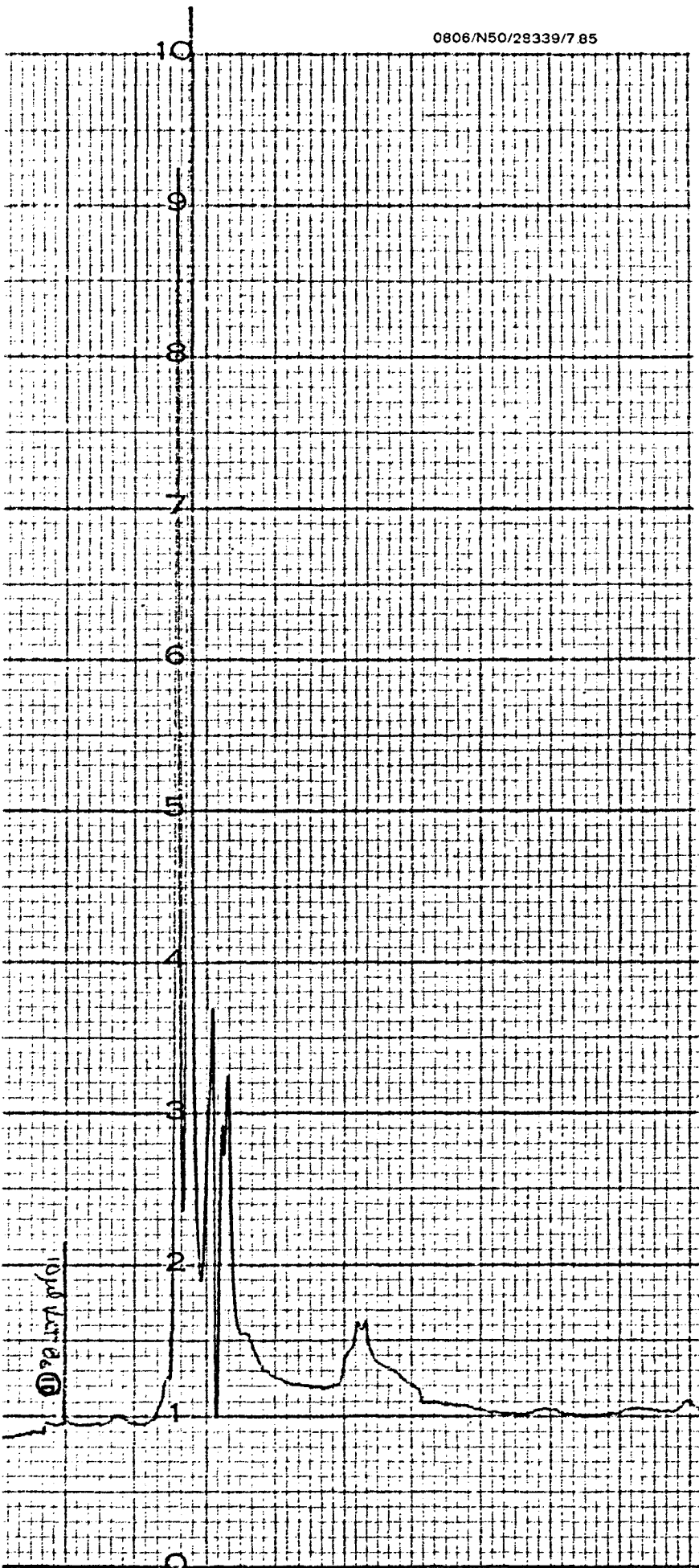
Injection : 10 µl d'extrait n° 8

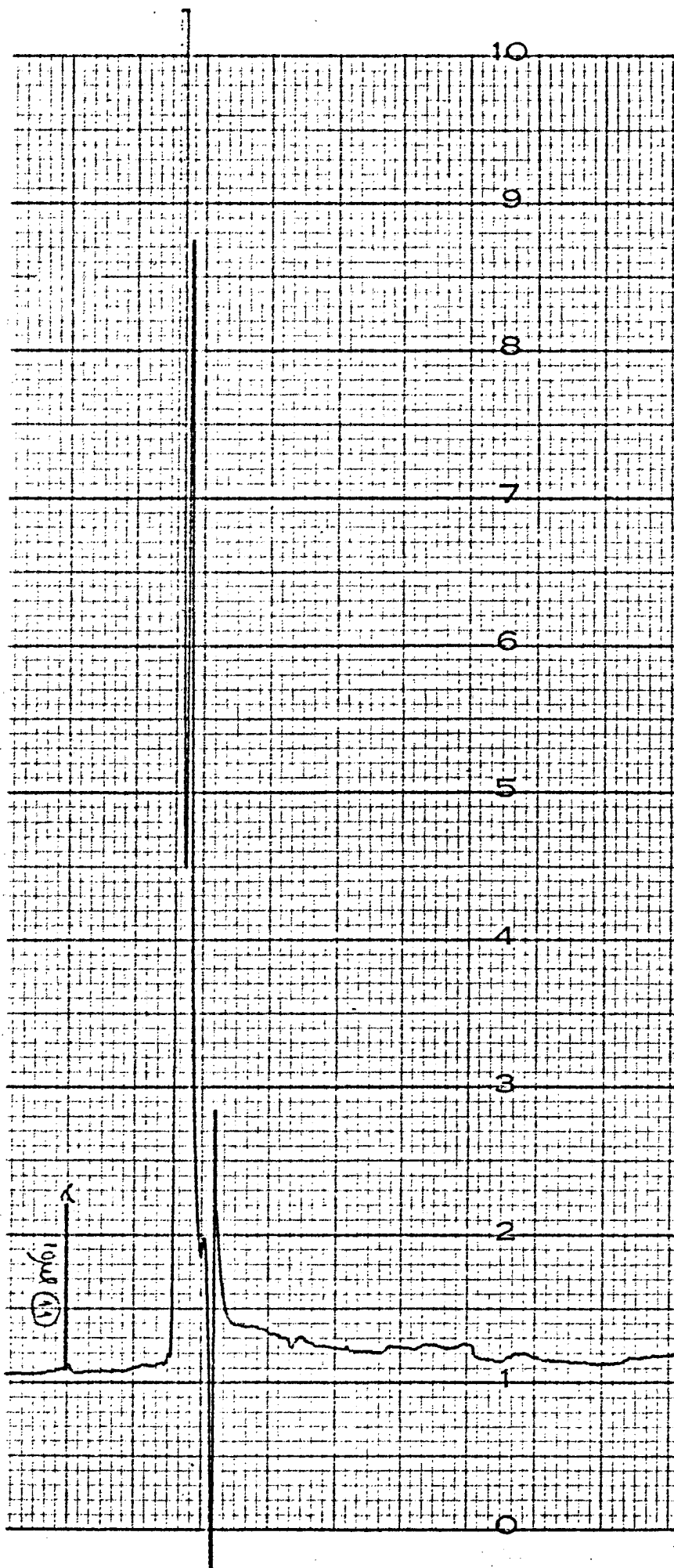


COURBE XII

Injection : 10 μ l d'extrait n° 9

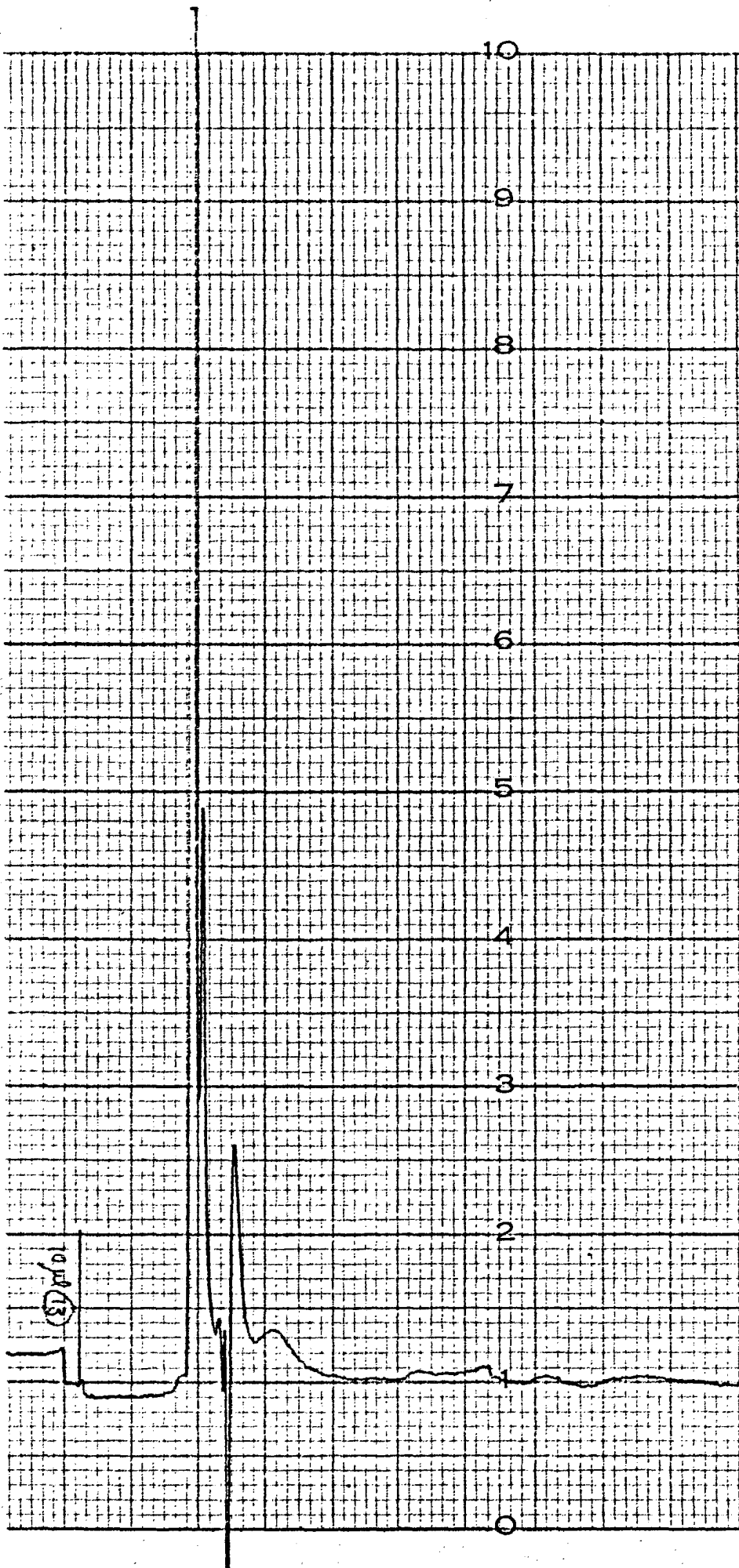
0806/N50/29339/7.85

COURBE XIIIInjection : 10 μ l d'extrait n° 10



COURBE XIV

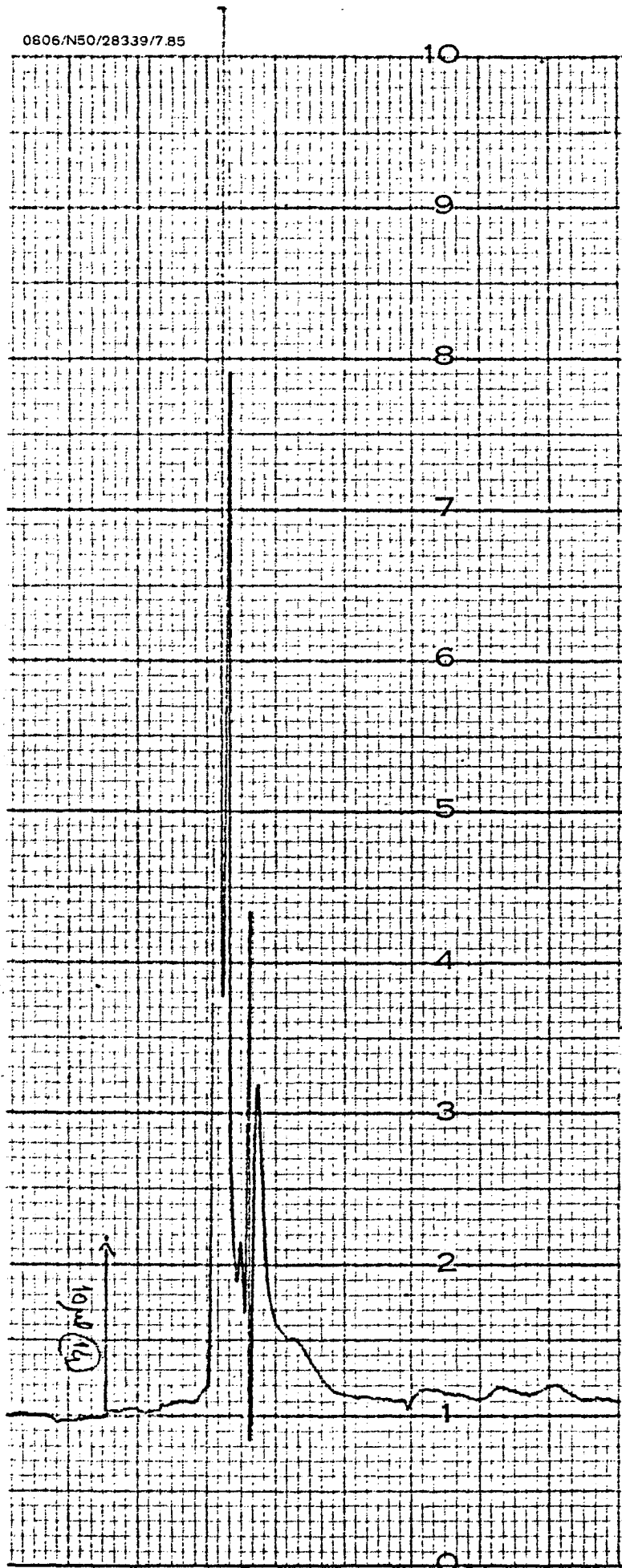
Injection : 10 μ l d'extrait n° 11

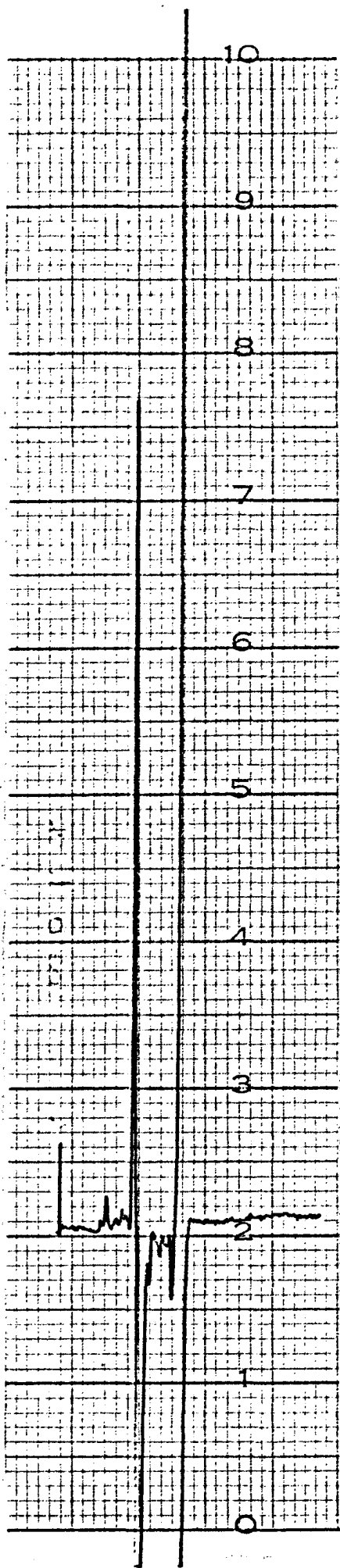


COURBE XV

Injection : 10 µl d'extrait n° 13

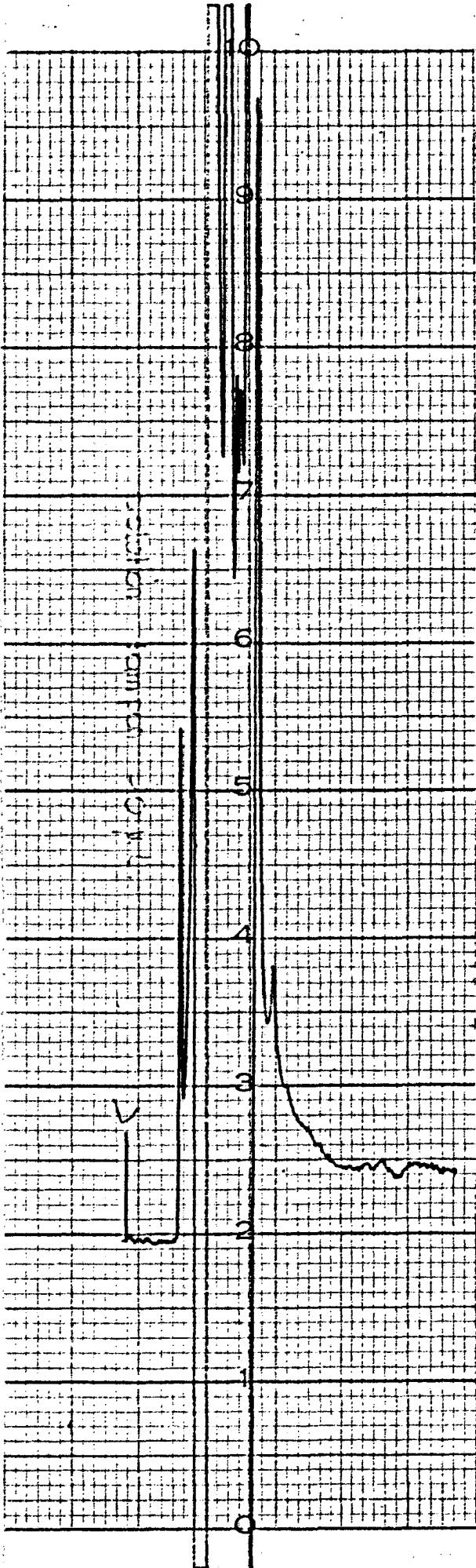
0806/N50/28339/7.85

COURBE XVIInjection : 10 μ l d'extrait n° 14



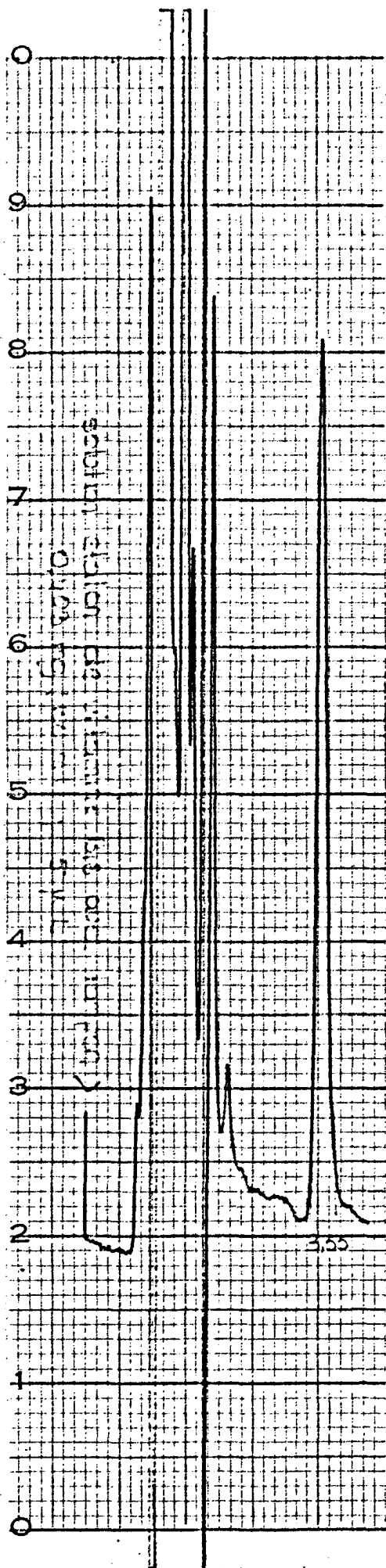
COURBE I

Injection : 10 μ l d'eau



COURBE II

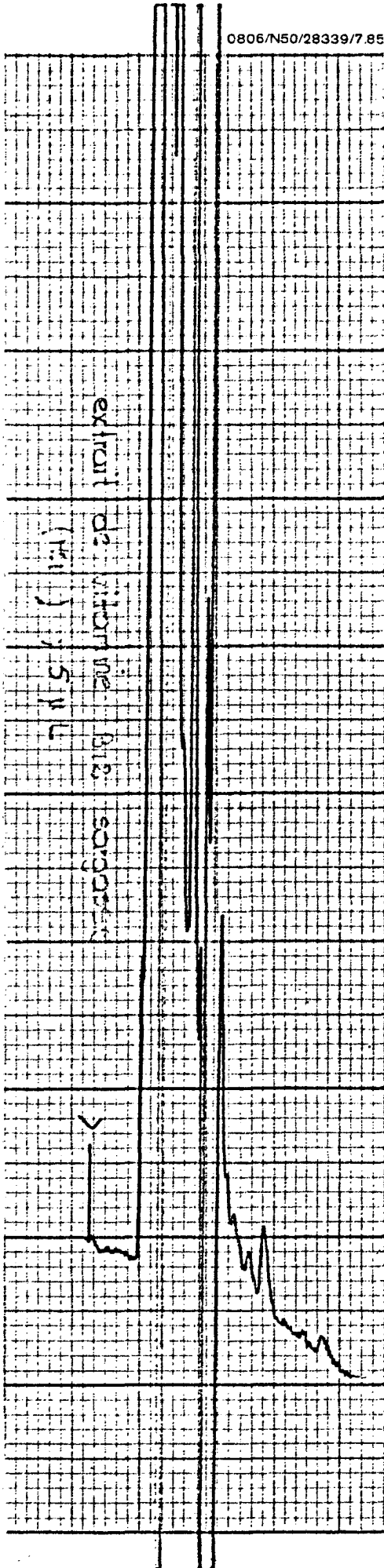
Injection : 10 µl solution tampon



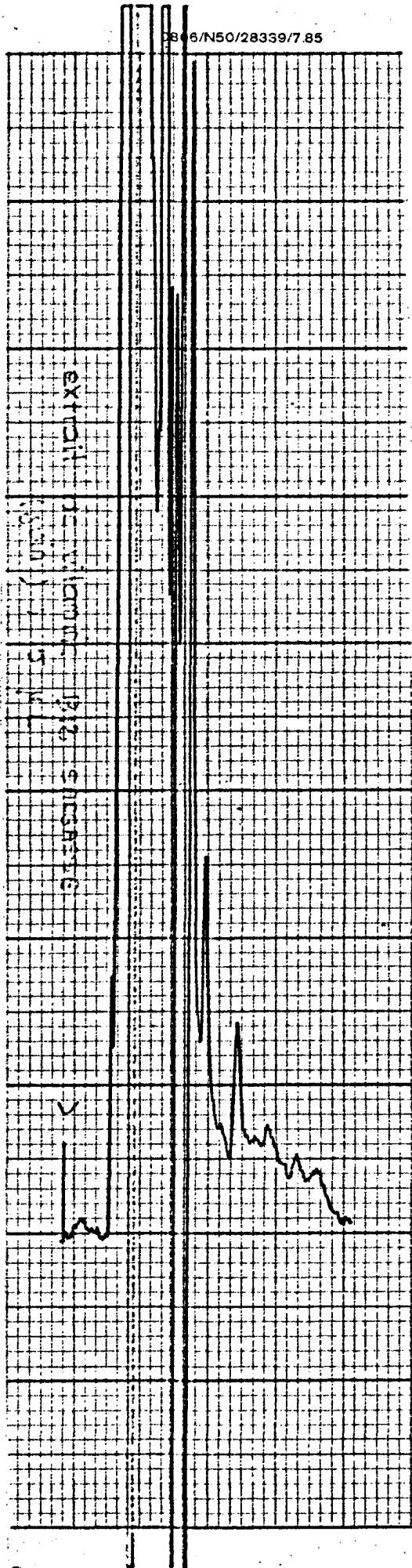
COURBE III

Injection : 5 μ l de solution
étalon de vitamine B12
avec tampon de concen-
tration 0,403 mg/100ml

0806/N50/28339/7.85

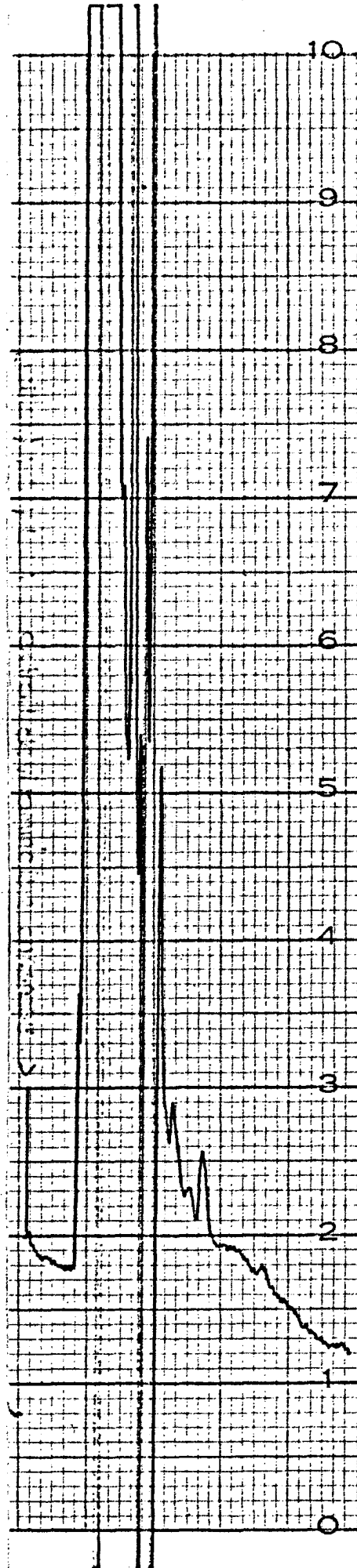
COURBE IVInjection : 5 µl d'extrait n° 1

DB 6/N50/28339/7.85



COURBE V

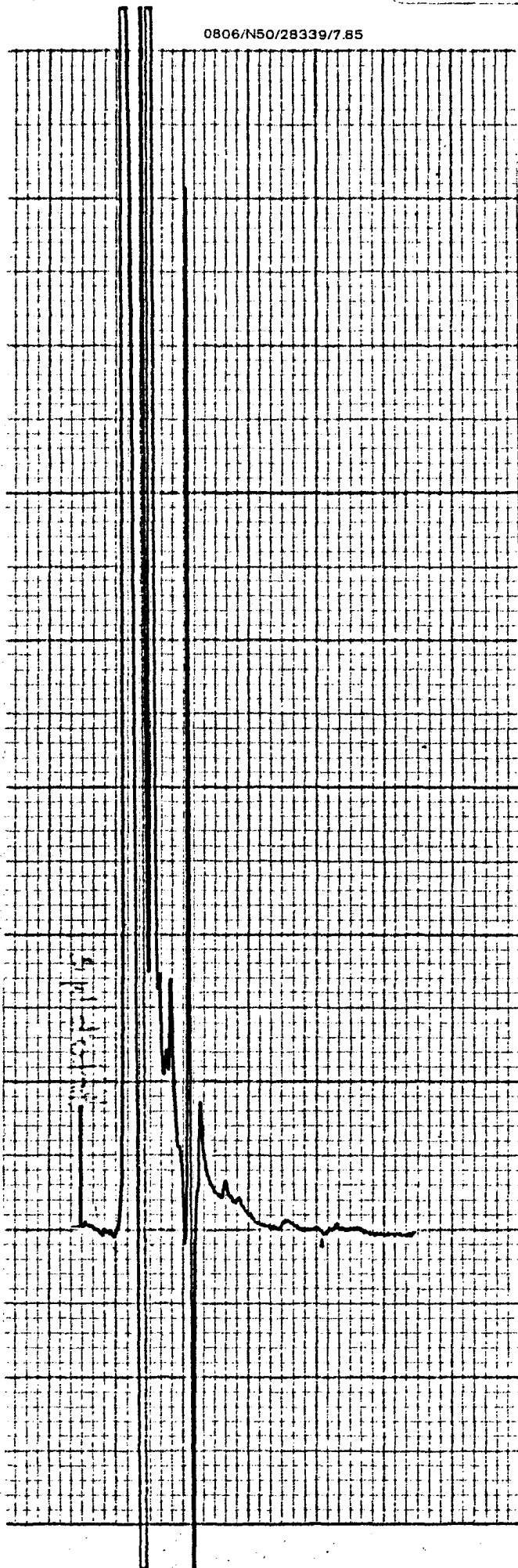
Injection : 5 µl d'extrait n° 3



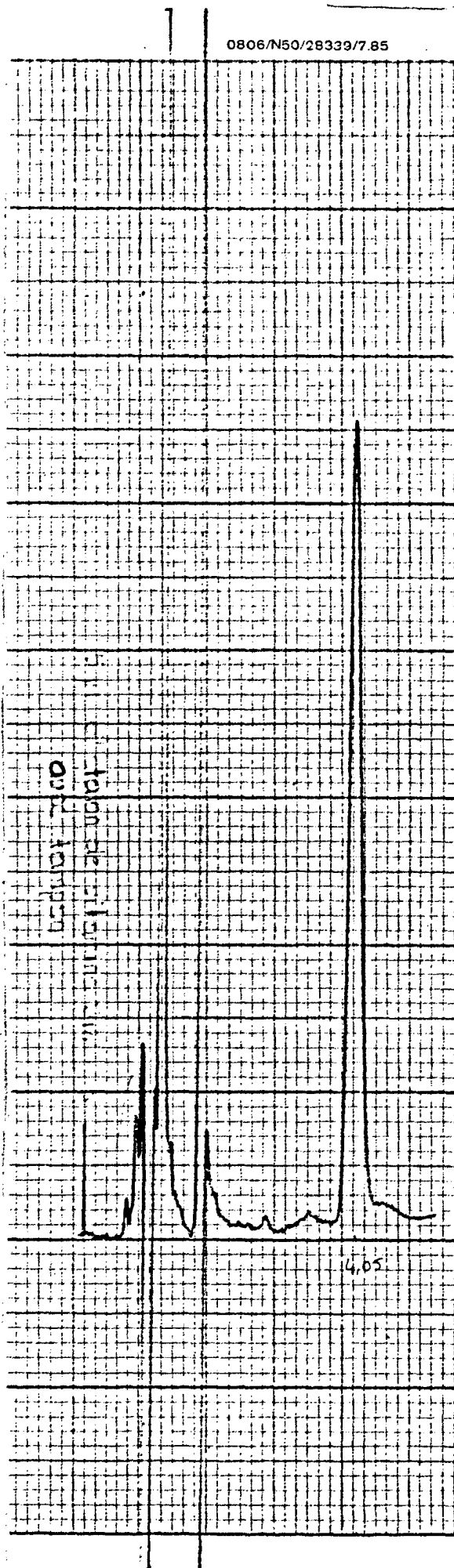
COURBE VI

Injection : 5 μ l d'extrait n° 5

0806/N50/28339/7.85

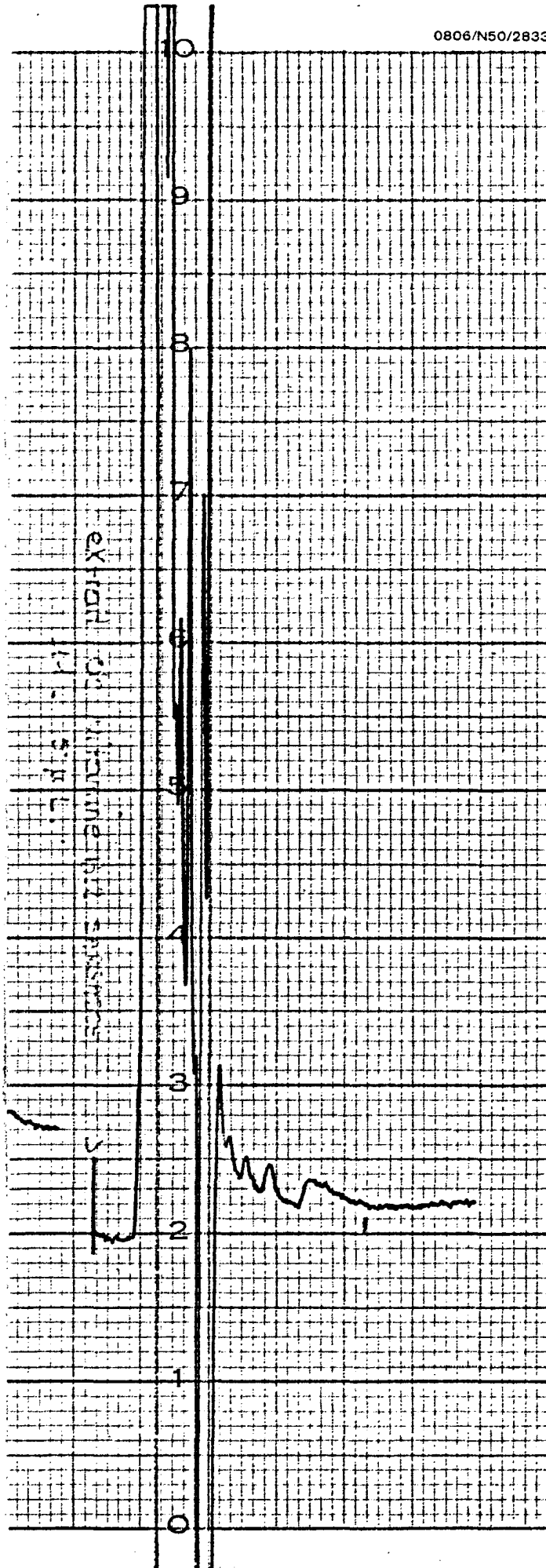
Courbe VI BisInjection : 5 μ l d'extrait
n°9

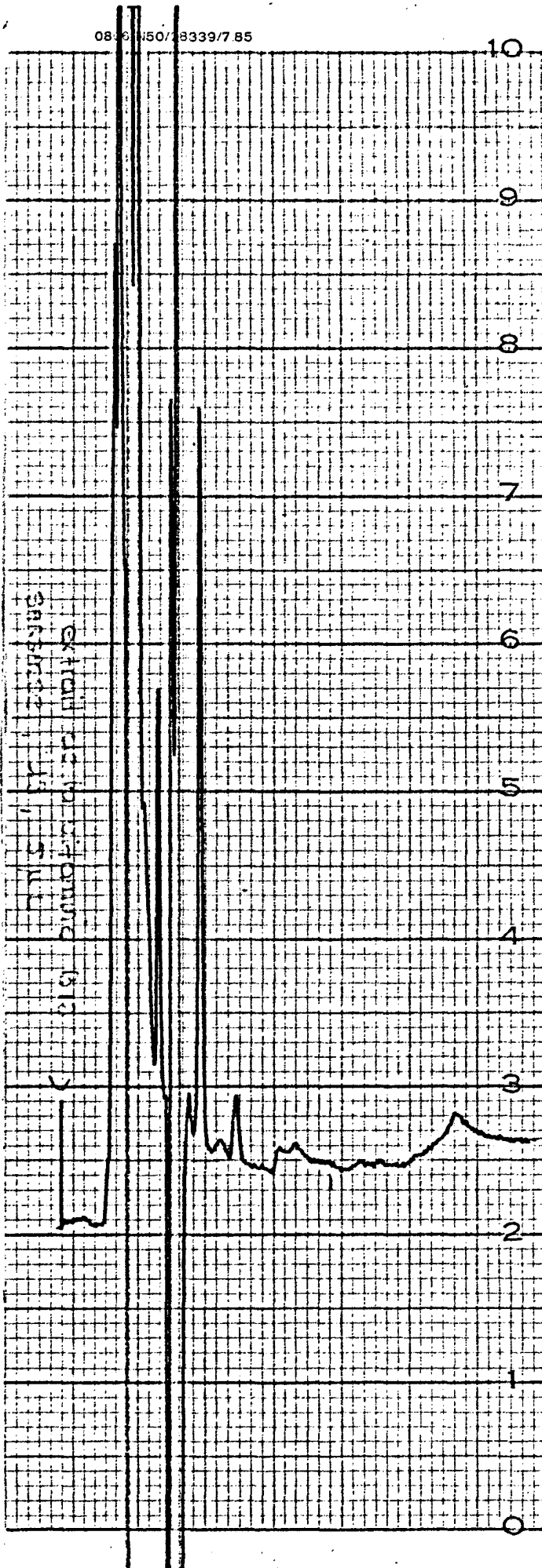
0806/N50/28339/7.85

COURBE VII

Injection : 5 μ l d'étalon de
vitamine B 12 avec
tampon de concentratio
0,403 mg/100 ml.

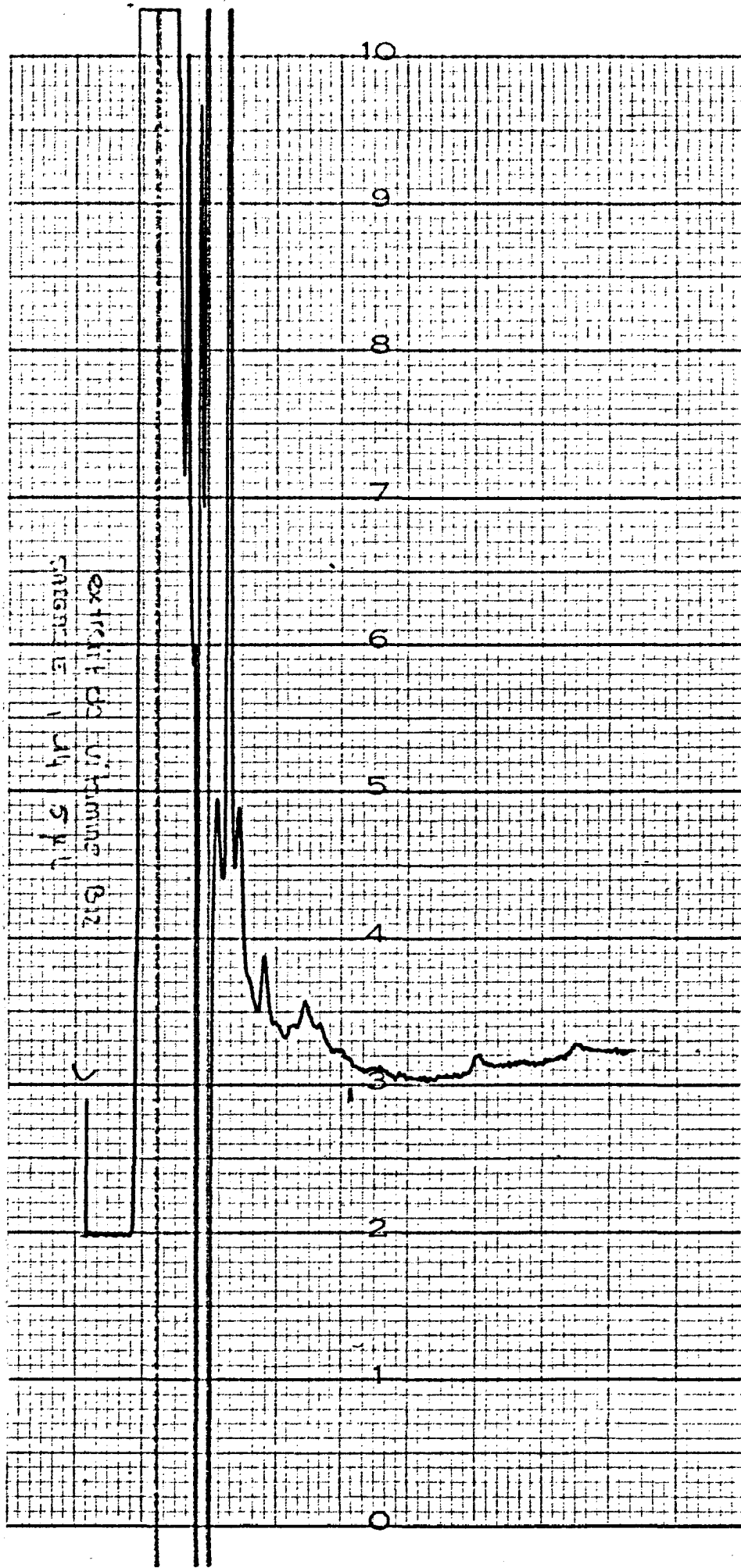
0806/N50/2833

COURBE VIIIInjection : 5 μ l d'extrait n° 11



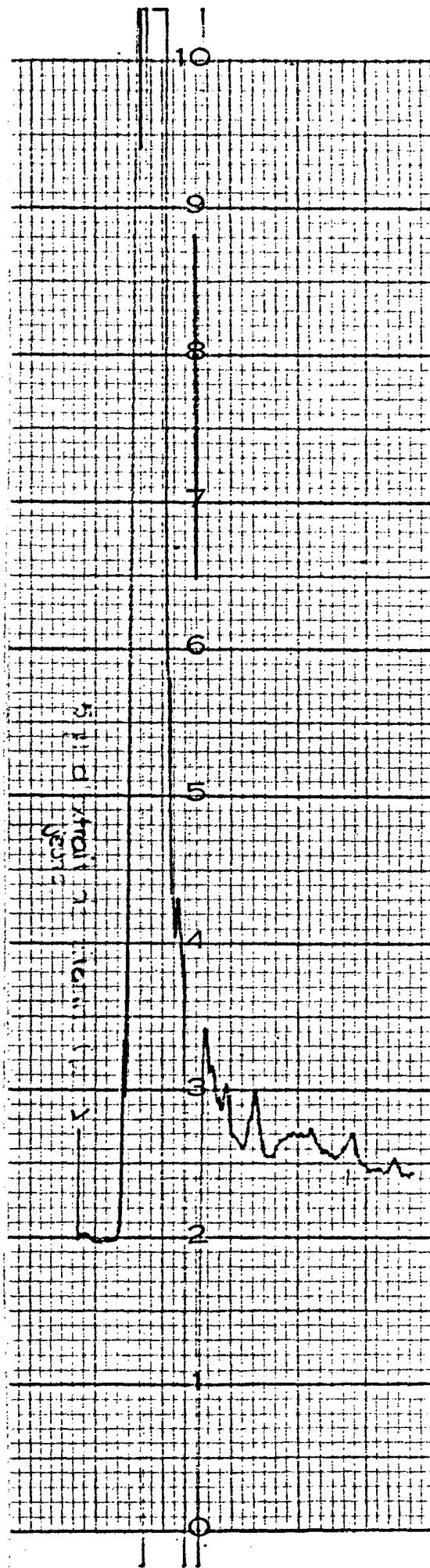
COURBE IX

Injection : 5 µl d'extrait n° 13



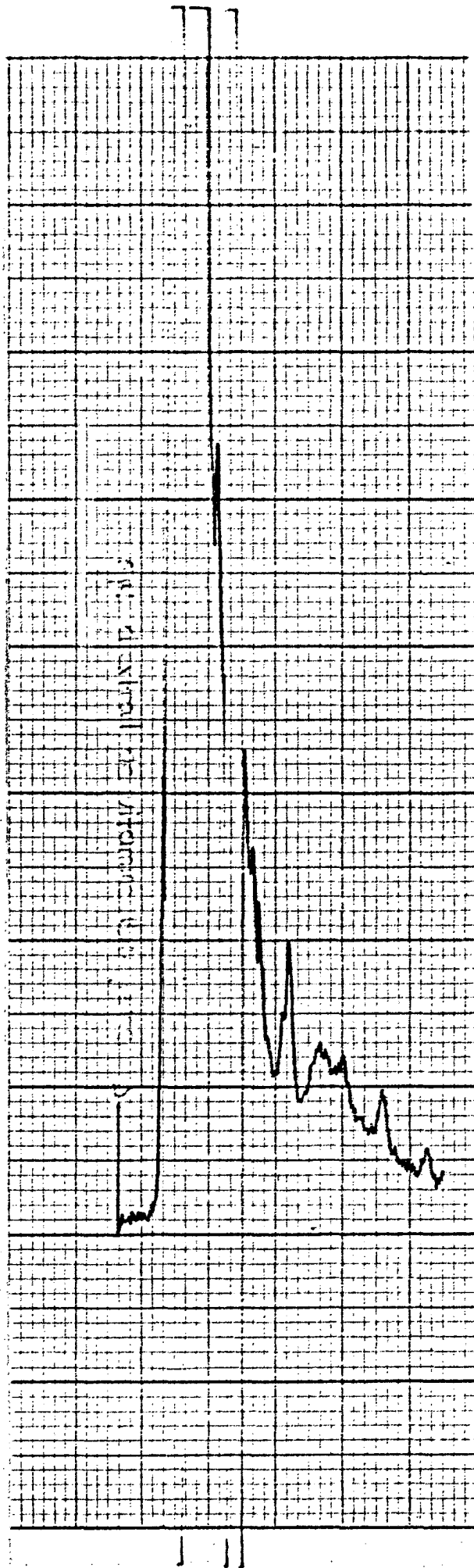
COURBE X

Injection : 5 µl d'extrait n° 14



COURBE XI

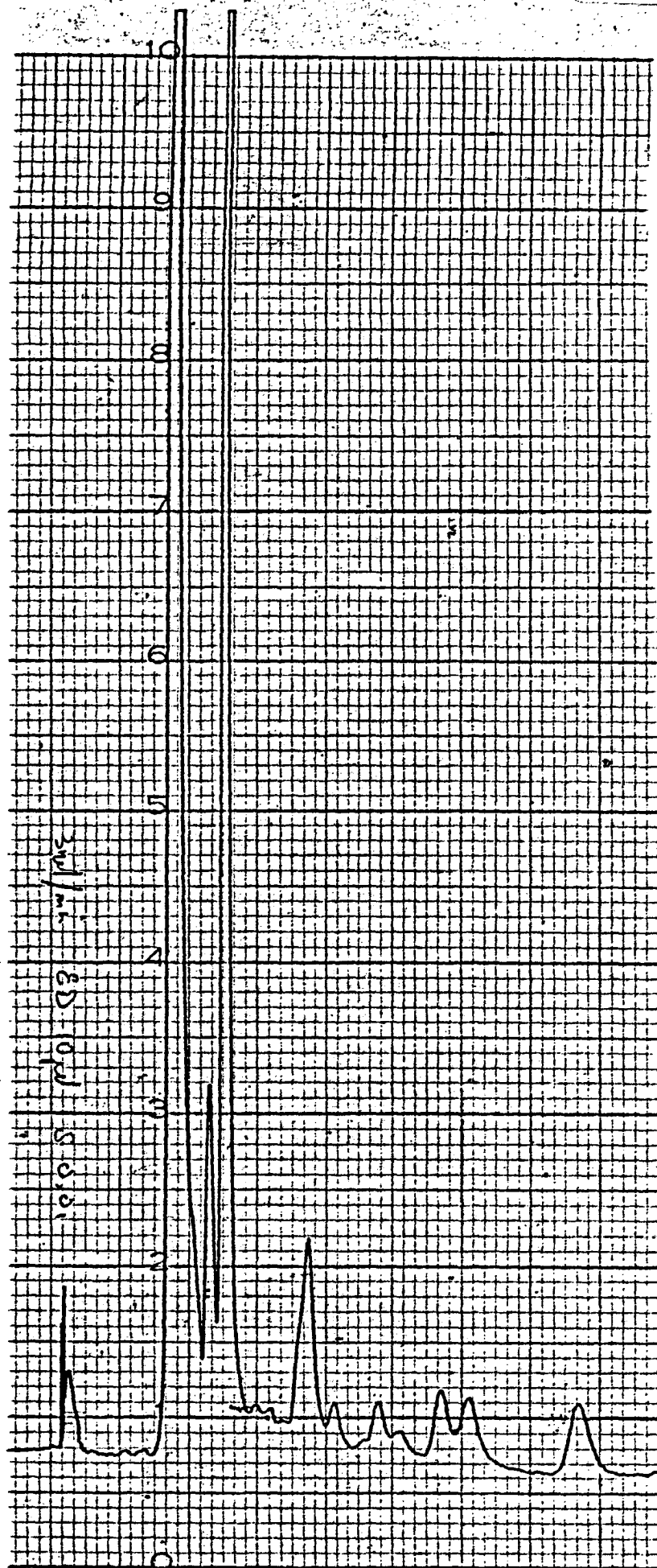
Injection : 5 μ l d'extrait d'algue
fraîche



COURBE XII

→ S = 0,002

Injection : 5 μ l d'extrait d'algue
fraîche



Courbe I

Injection de 10 μ l d'eau
distillée

Le nombre important de pics
est dû à l'absorption très
grande des tampons (phosphates)
à 215 nm

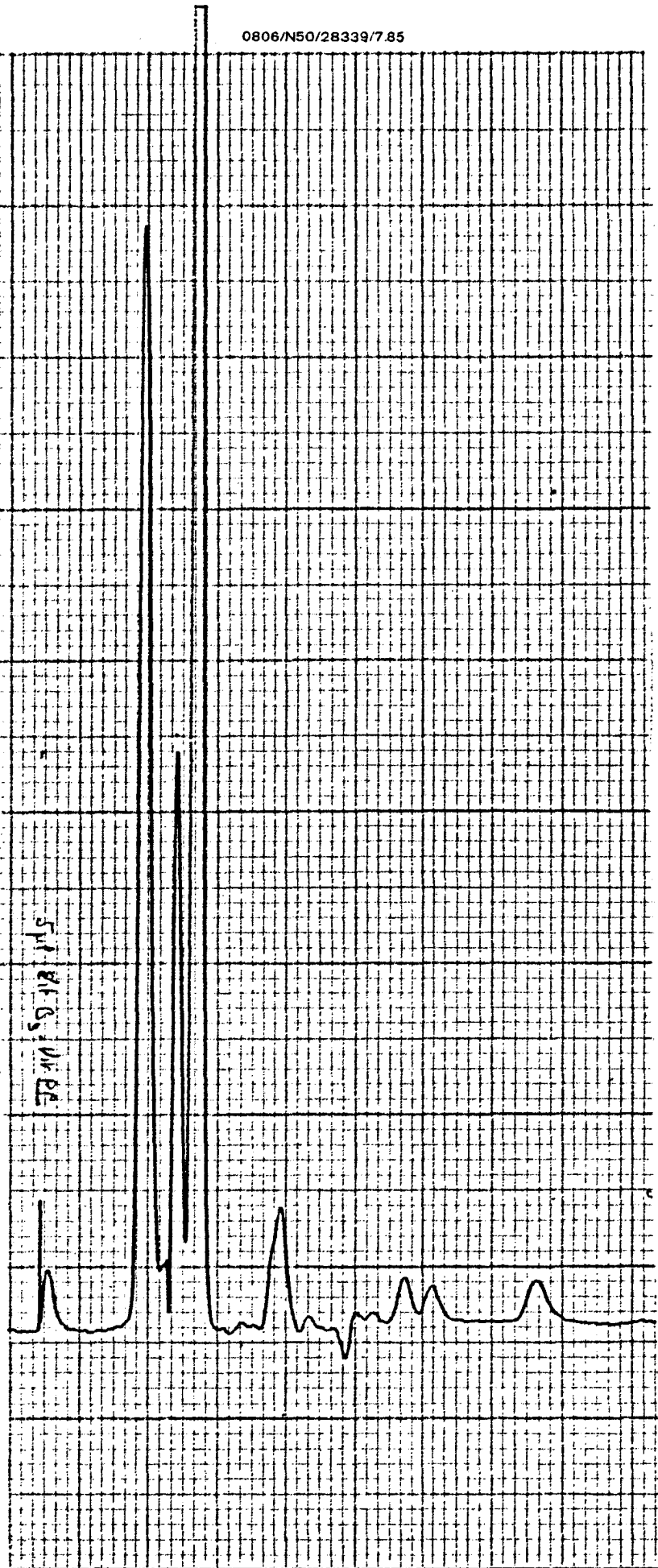
Ceci nous interdit d'augmenter
la sensibilité.

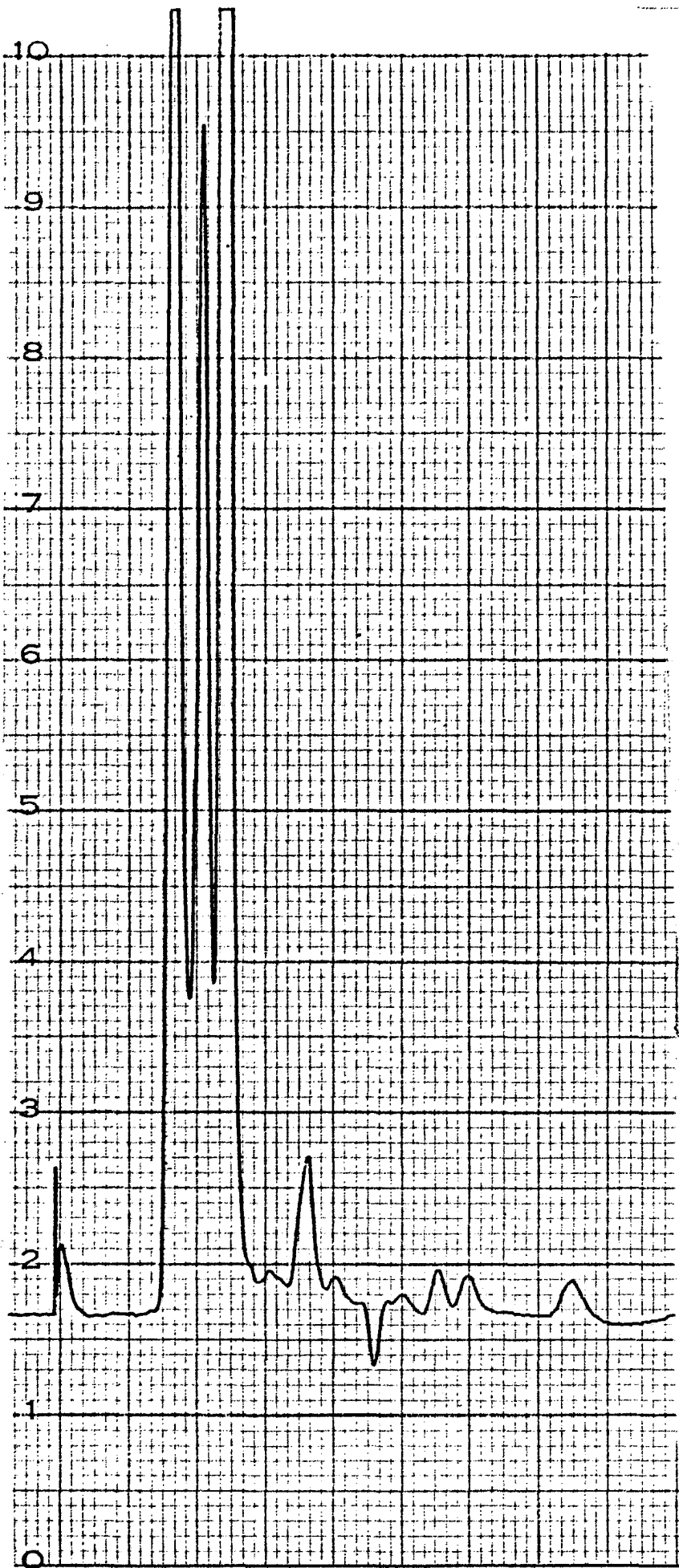
0806/N50/28339/7.85

Courbe II

Injection de 5 μ l d'une solution de Vitamine
PP à une concentration de 1 mg/l

On observe à 1,95 cm de rétention un pic sup-
plémentaire par rapport à la courbe I.





Courbe III

Injection de 10 μ l d'une solution de Vitamine P₁
à une concentration de 1 mg/l.

On observe toujours à 1,95 cm de rétention un pic
dont la hauteur a doublé par rapport à la pré-
cédente courbe.



Courbe IV

Injection de 10 μ l de l'extrait n°1

On observe un pic très mal résolu à 1,95 cm de rétention ; en faisant varier les conditions opératoires , nous n'avons pas obtenu de meilleure résolution, au contraire.

Le pic que l'on distingue ici a une hauteur de 11,5 cm.

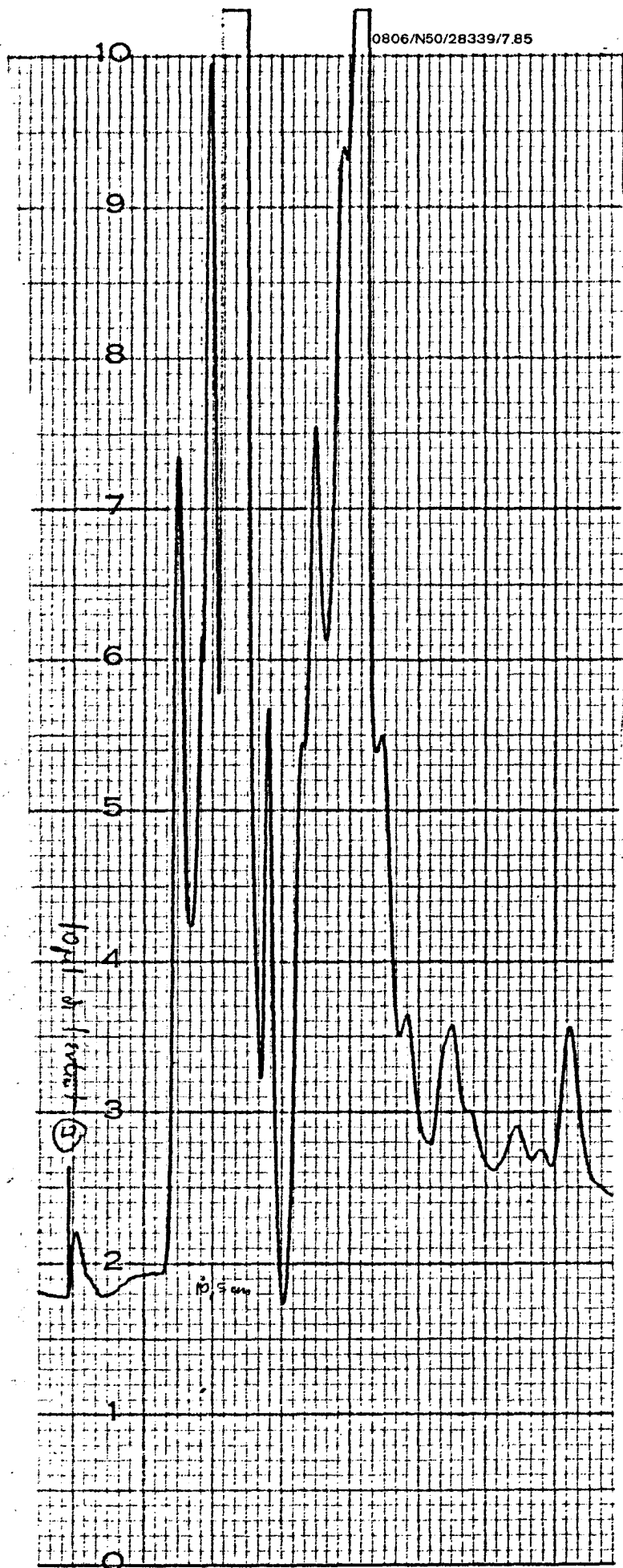
0806/N50/28339/7.85

Courbe V

Injection de 10 μ l de l'extrait n°2

le pic observé à une rétention de 1,95 cm, mesure 10,5 cm de hauteur.

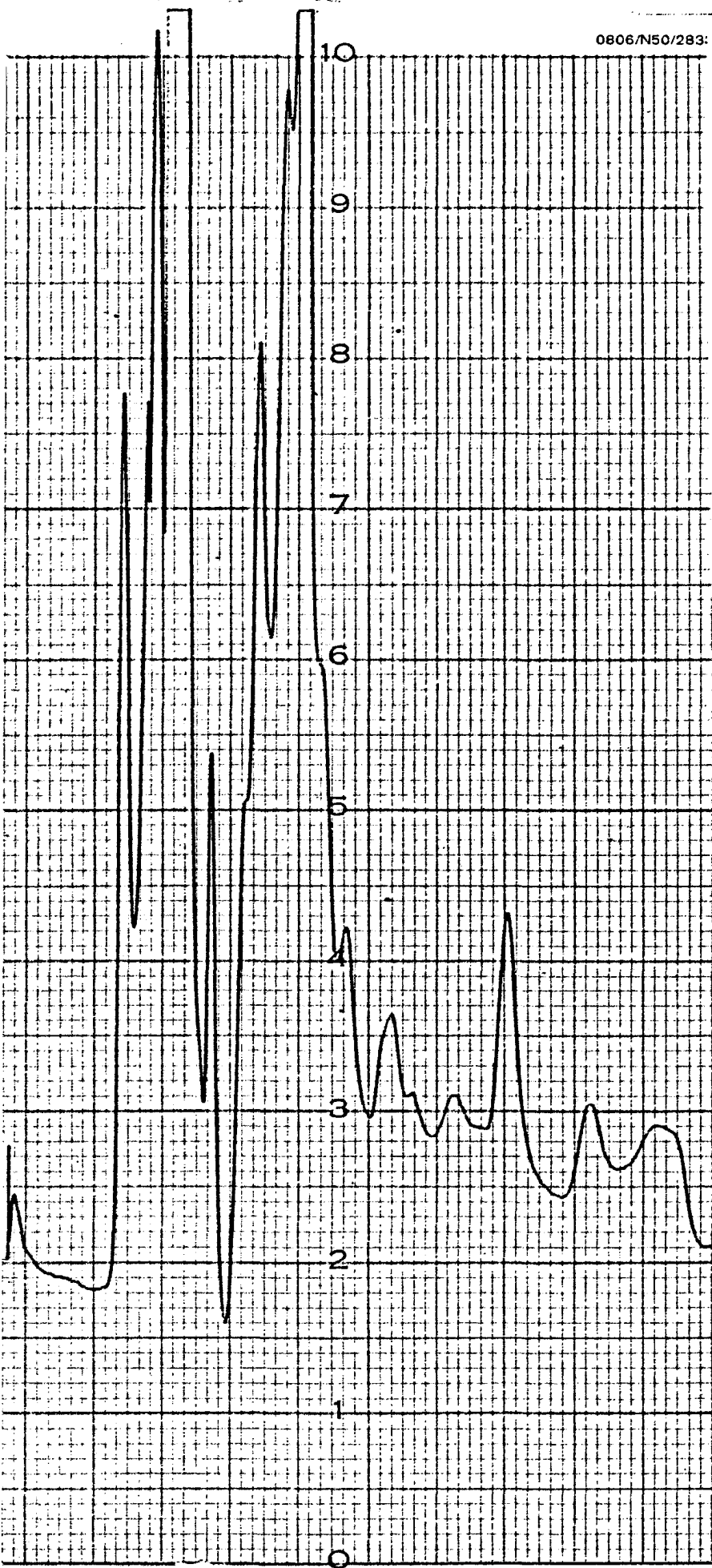
0806/N50/28339/7.85

Courbe VI

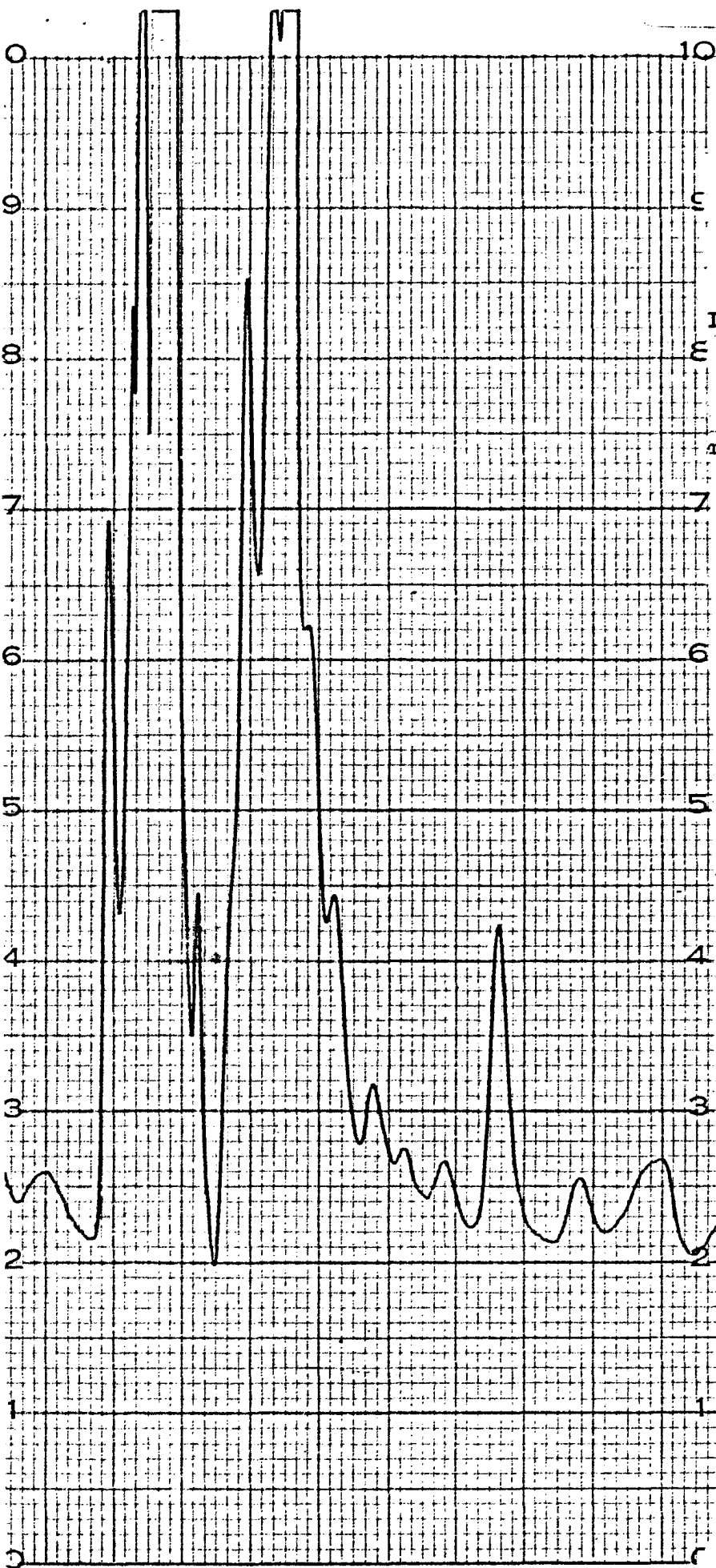
Injection de 10 µl de l'extrait n°3

le pic observé a une
 rétention de 1.95 cm et mesure 10,5cm
 de hauteur.

0806/N50/283:

Courbe VIIInjection de 10. μ l de l'extrait n°4

Le pic observé à une rétention de 1,95 cm mesure 14,5 cm de hauteur.



Courbe VIII

Injection de 10 μ l de L'extrait n°5

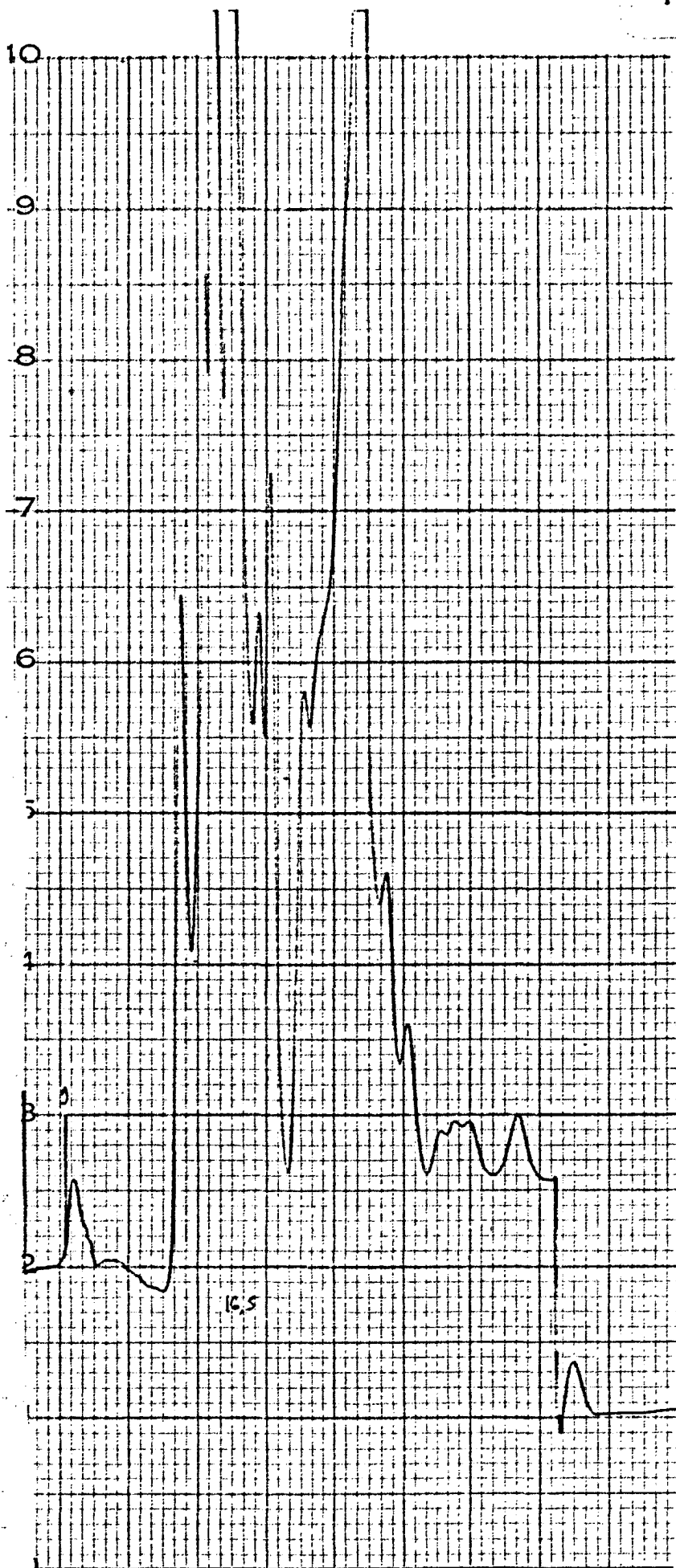
Le pic observé à 1,96 cm de rétention
mesure 15,5 cm de hauteur.



Courbe n° IX

Injection de 10 μ l de l'extrait n°6.

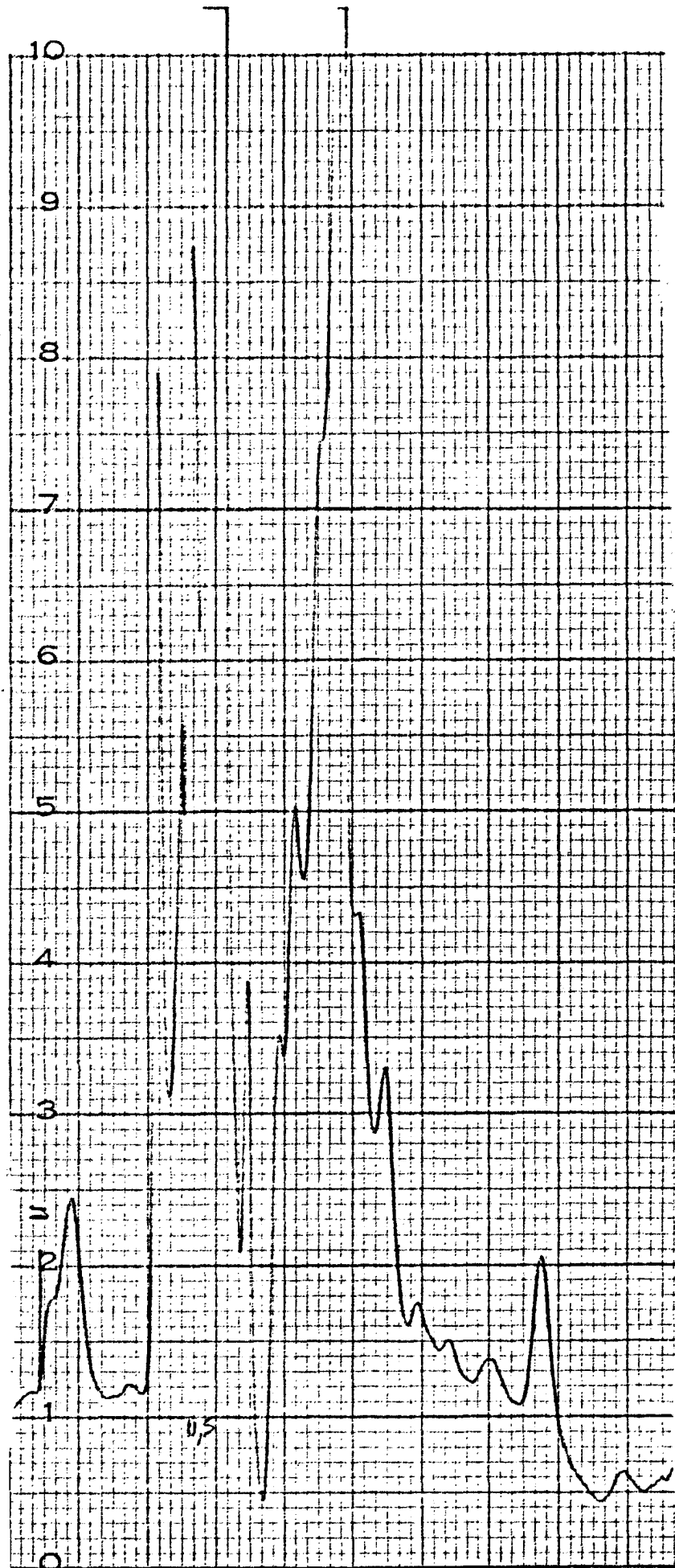
On observe, à 1,95 cm de rétention un pic qui mesure 16 cm de hauteur.



Courbe X

Injection de 10 μ l de l'extrait n°9.

Le pic de rétention à 1,95 cm mesure 16,5cm de hauteur.



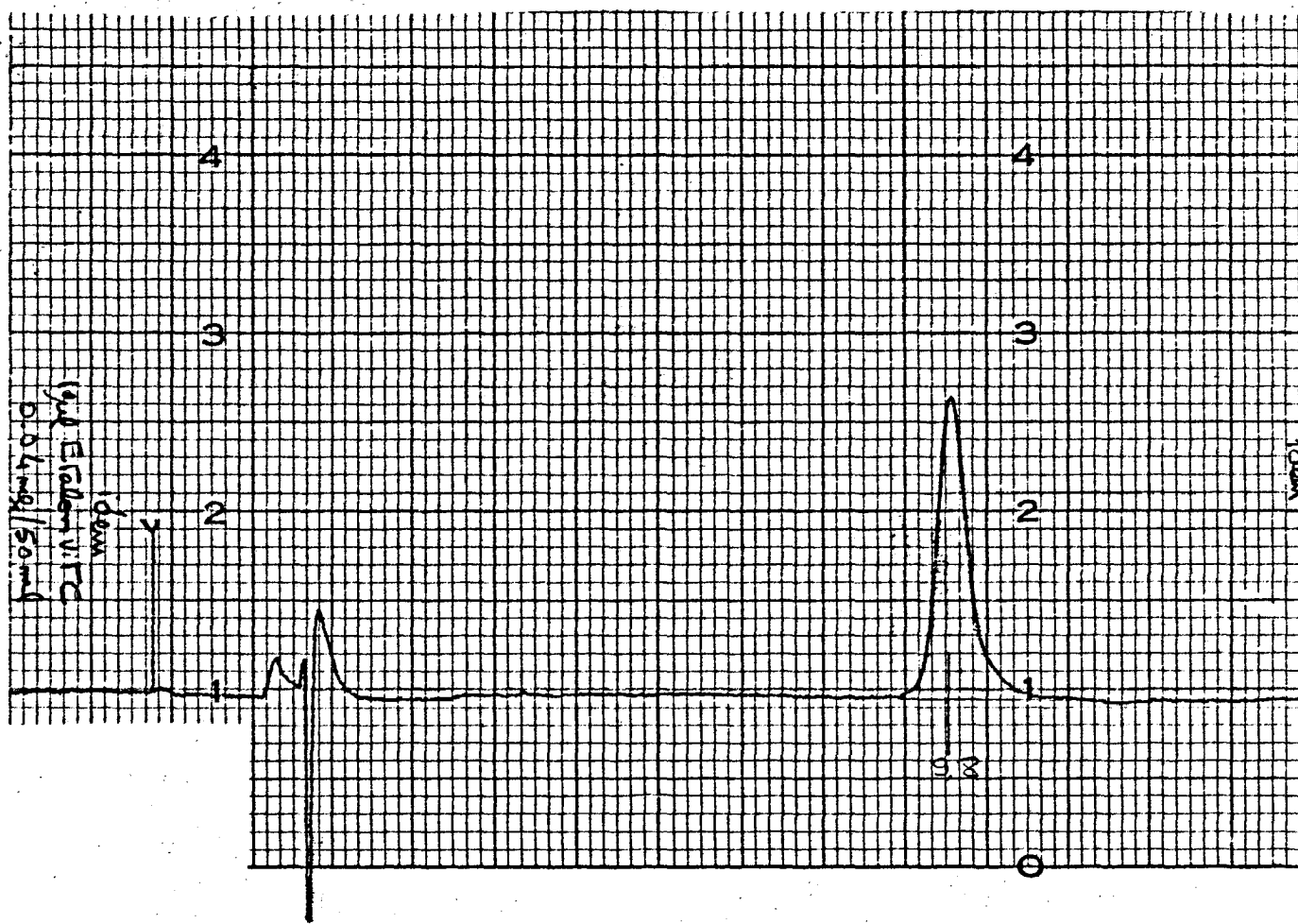
Courbe XI

Injection de 10 μ l de l'extrait n°11

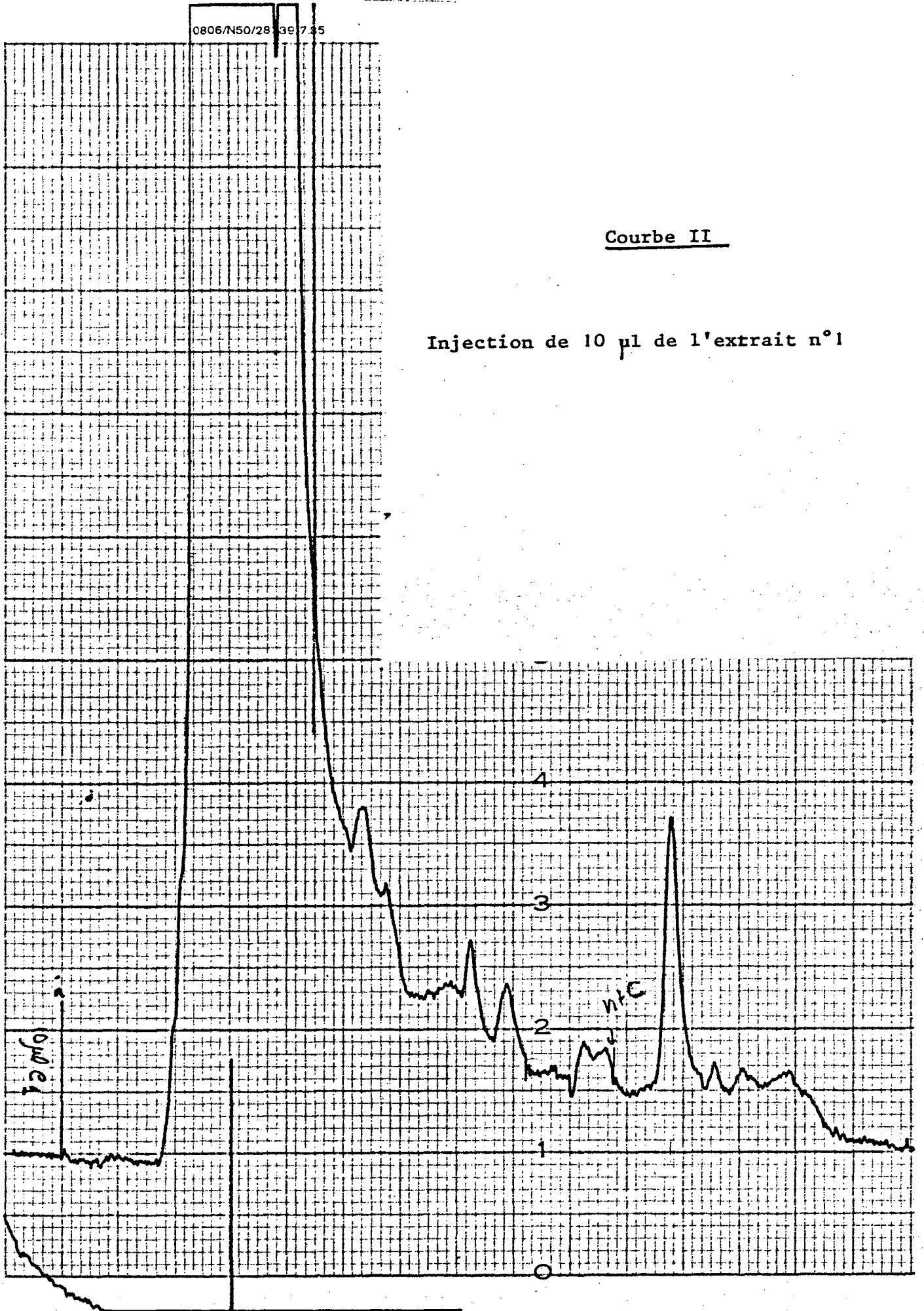
Le pic de retention à 1,95cm mesure 11,5cm de hauteur.

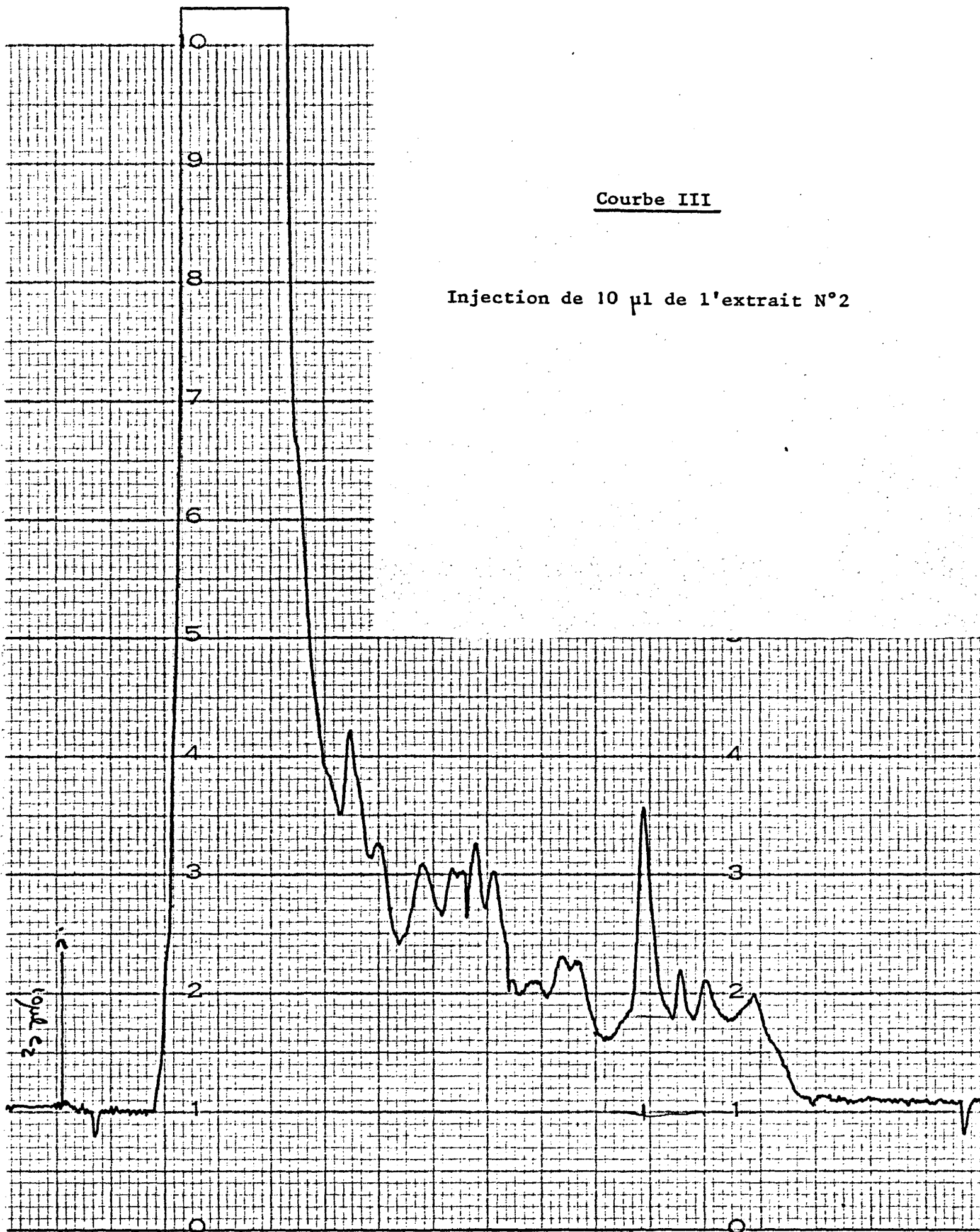
Courbe I

Injection de 10 μ l d'une solution étalon
de vitamine C à 0,8 mg/l



HOUSTON INSTRUMENT

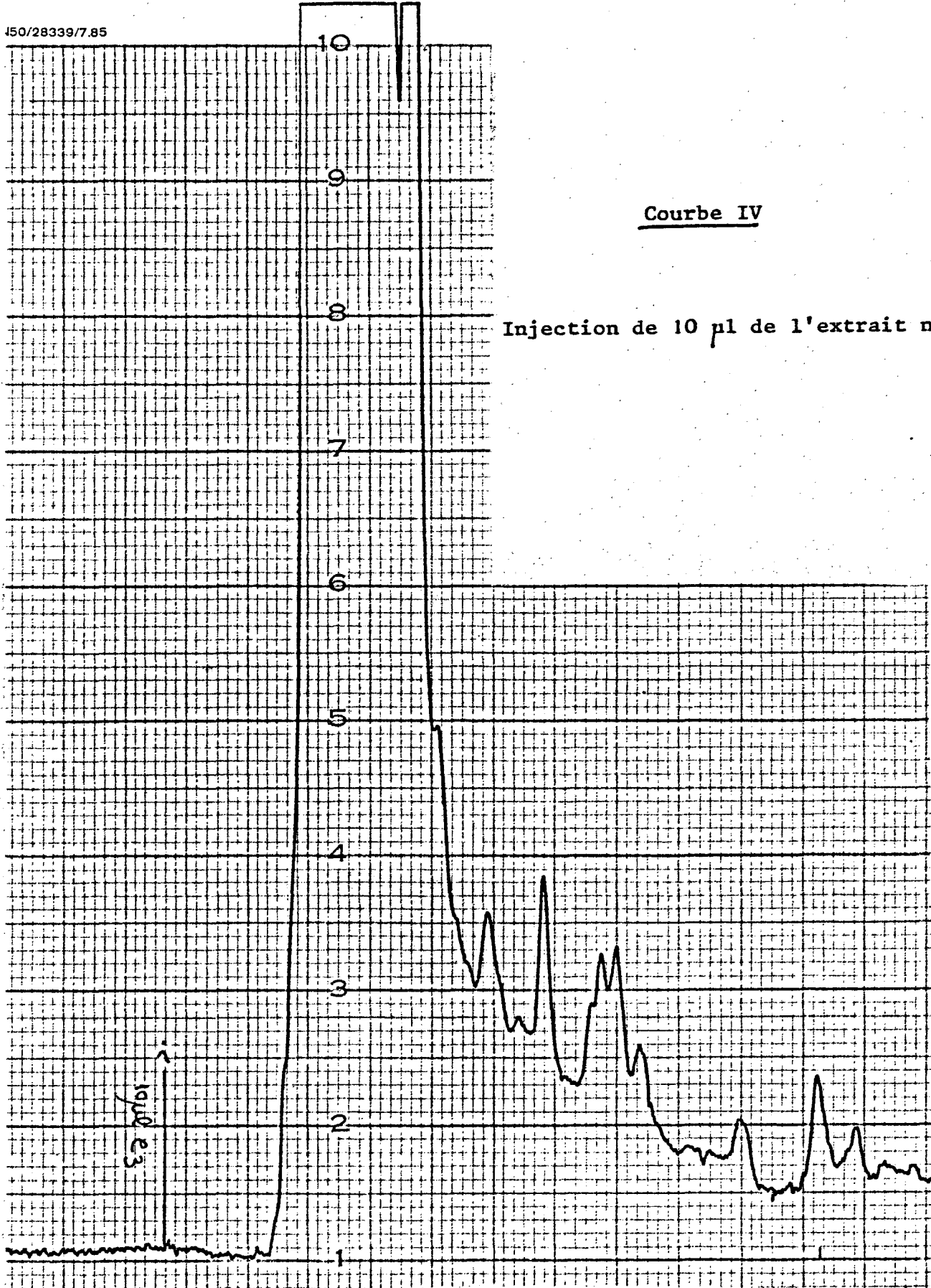


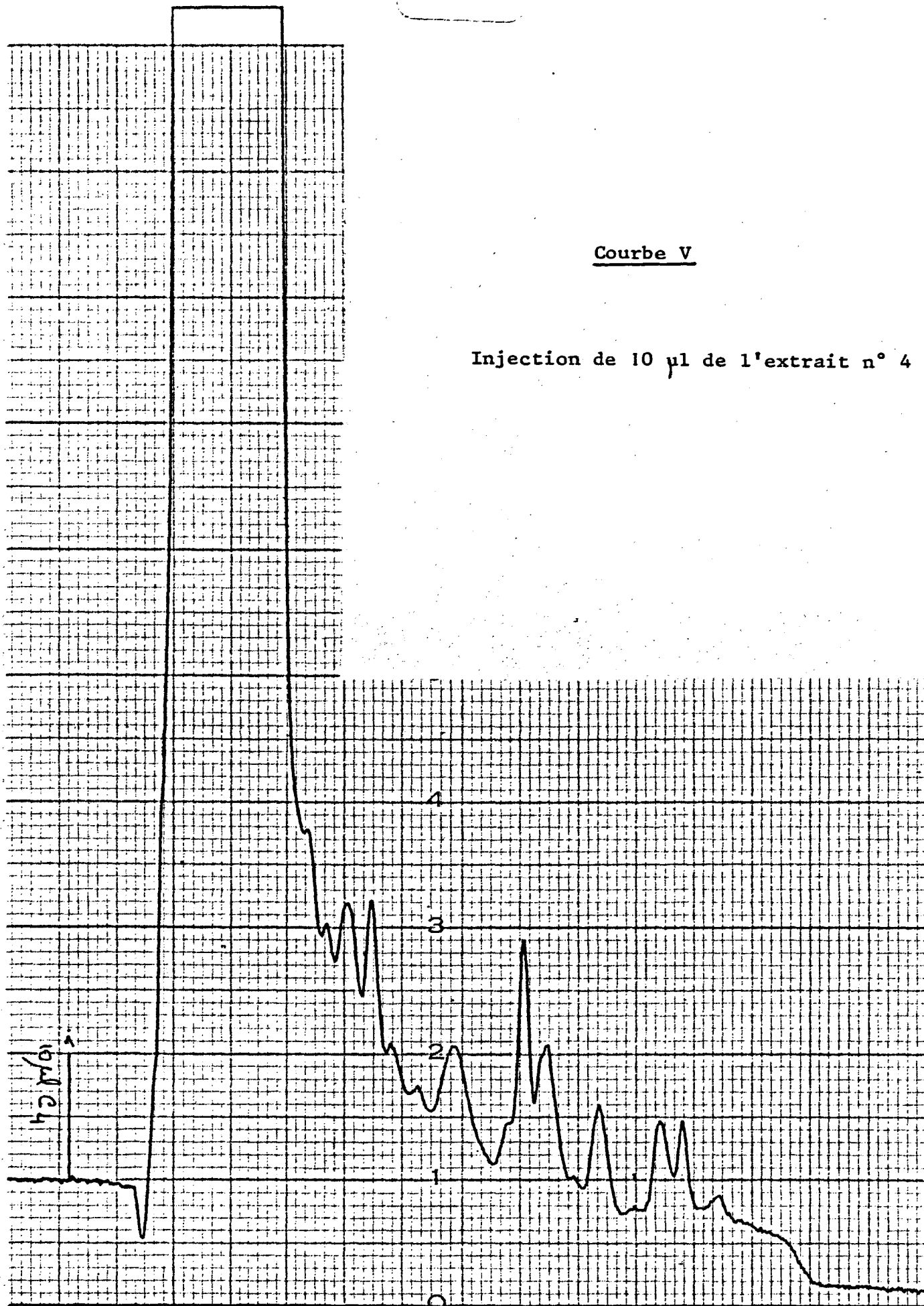


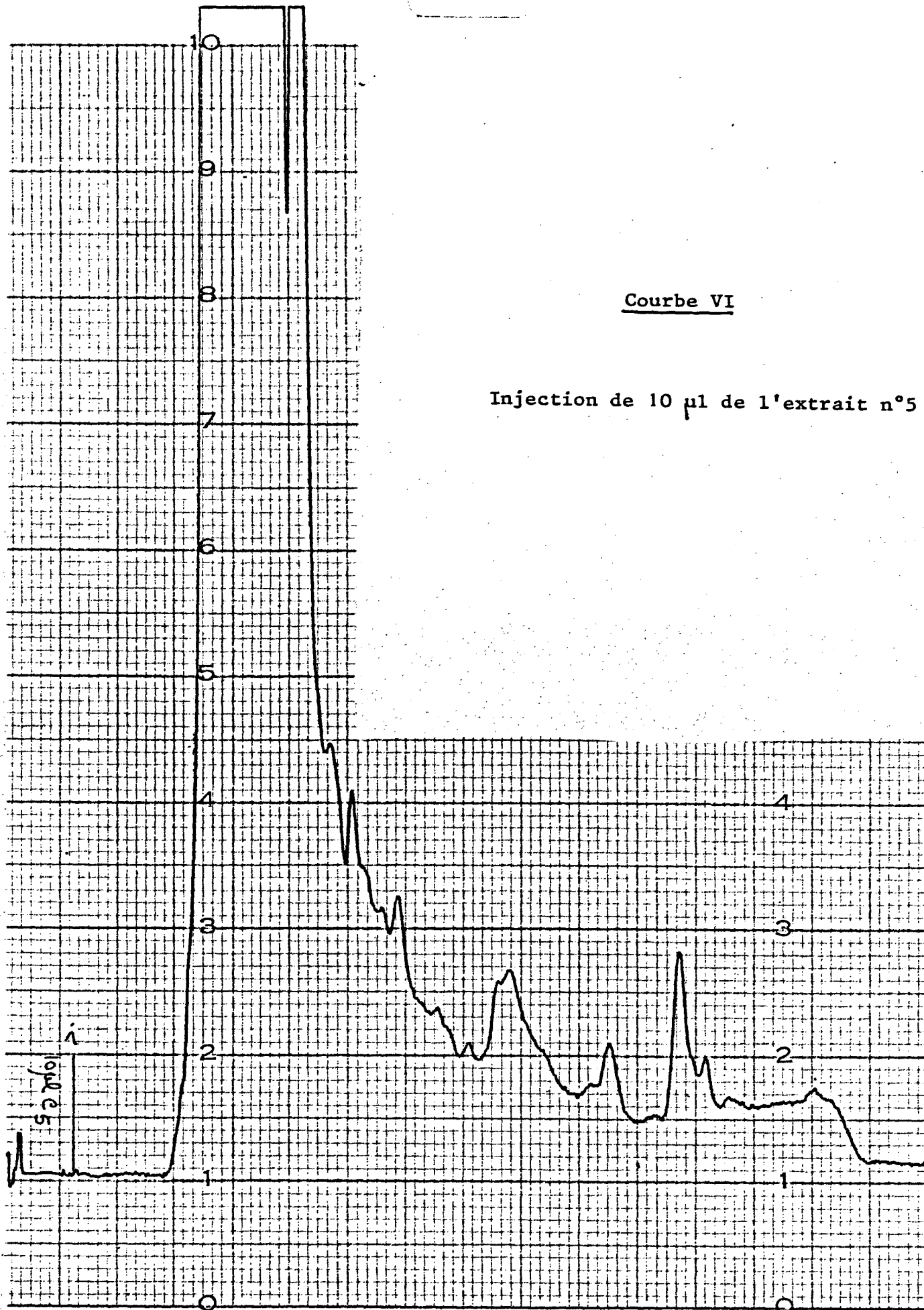
Courbe III

Injection de 10 µl de l'extrait N°2

450/28339/7.85

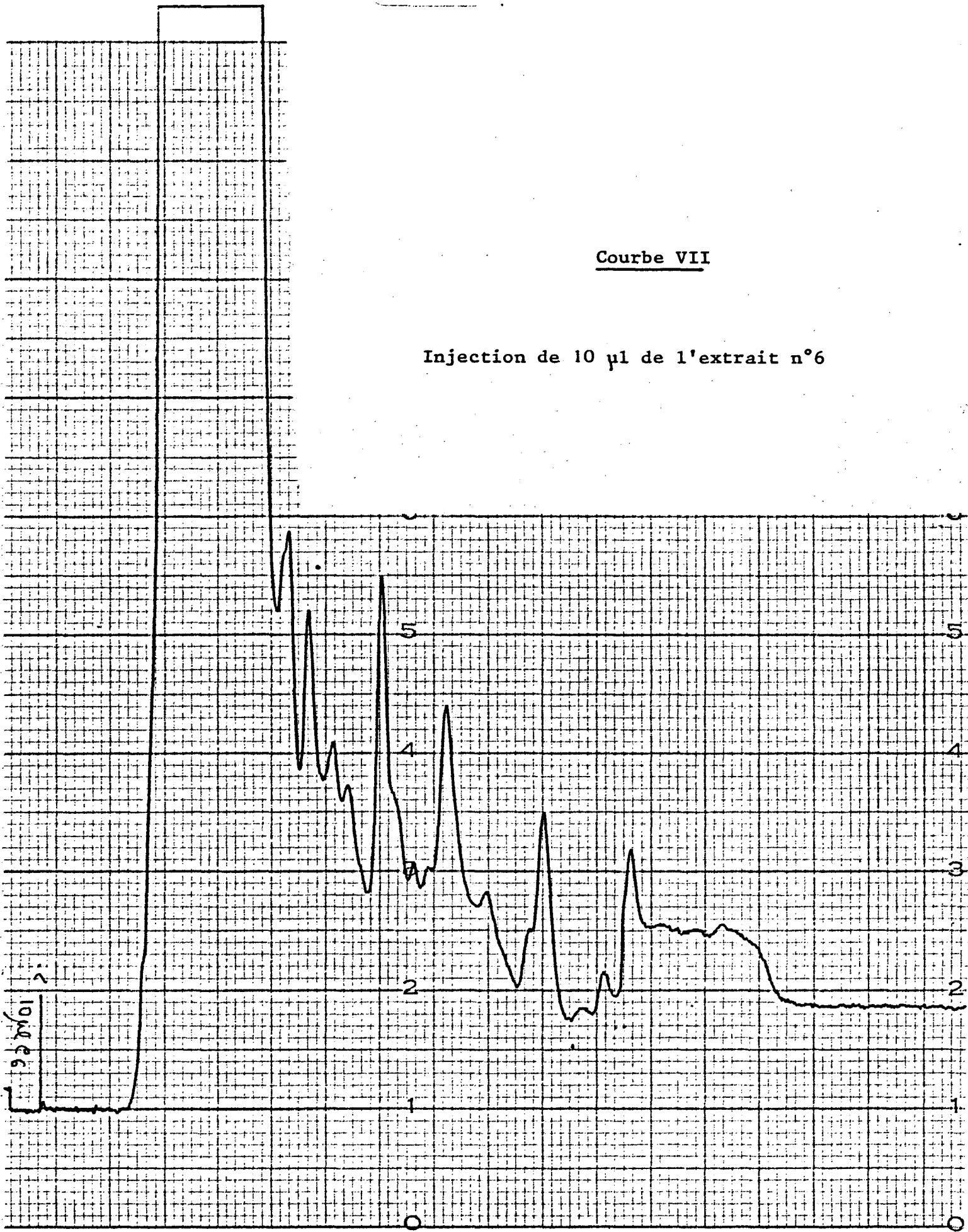






Courbe VI

Injection de 10 µl de l'extrait n°5



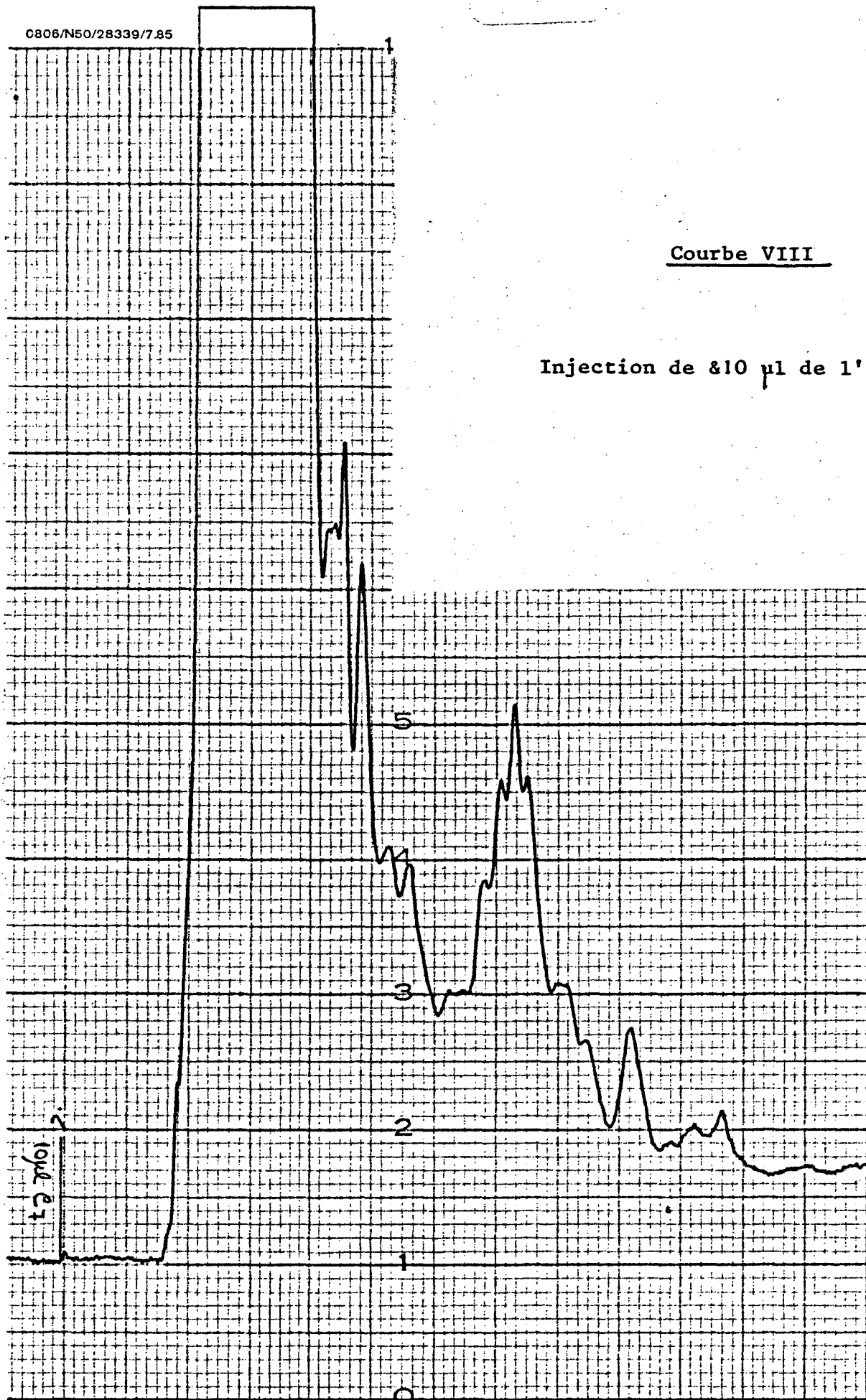
Courbe VII

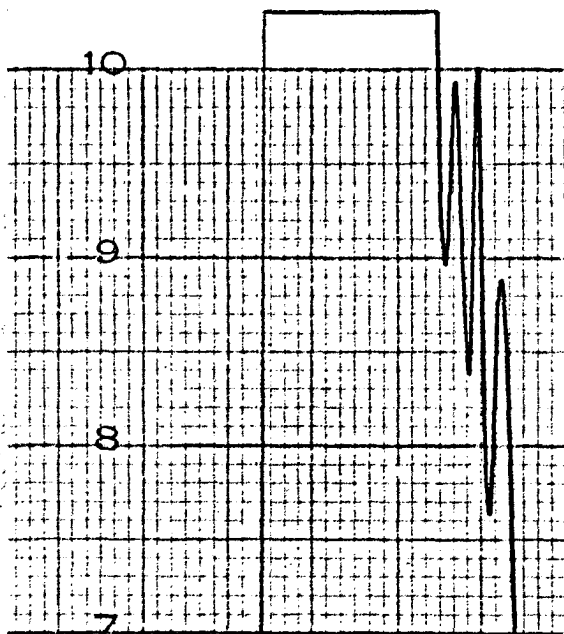
Injection de 10 µl de l'extrait n°6

C806/N50/28339/7.85

Courbe VIII

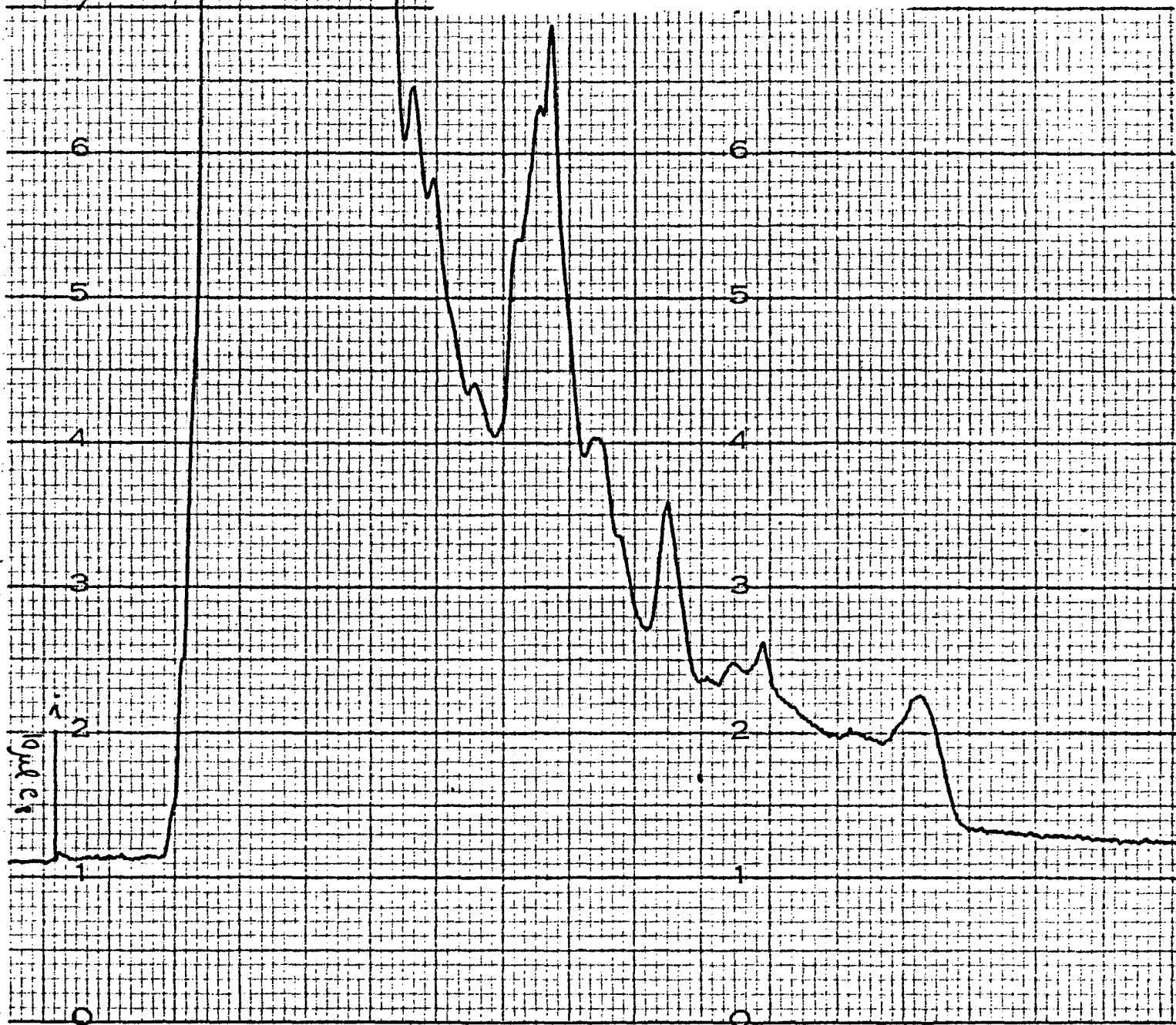
Injection de 10 µl de l'extrait n°7

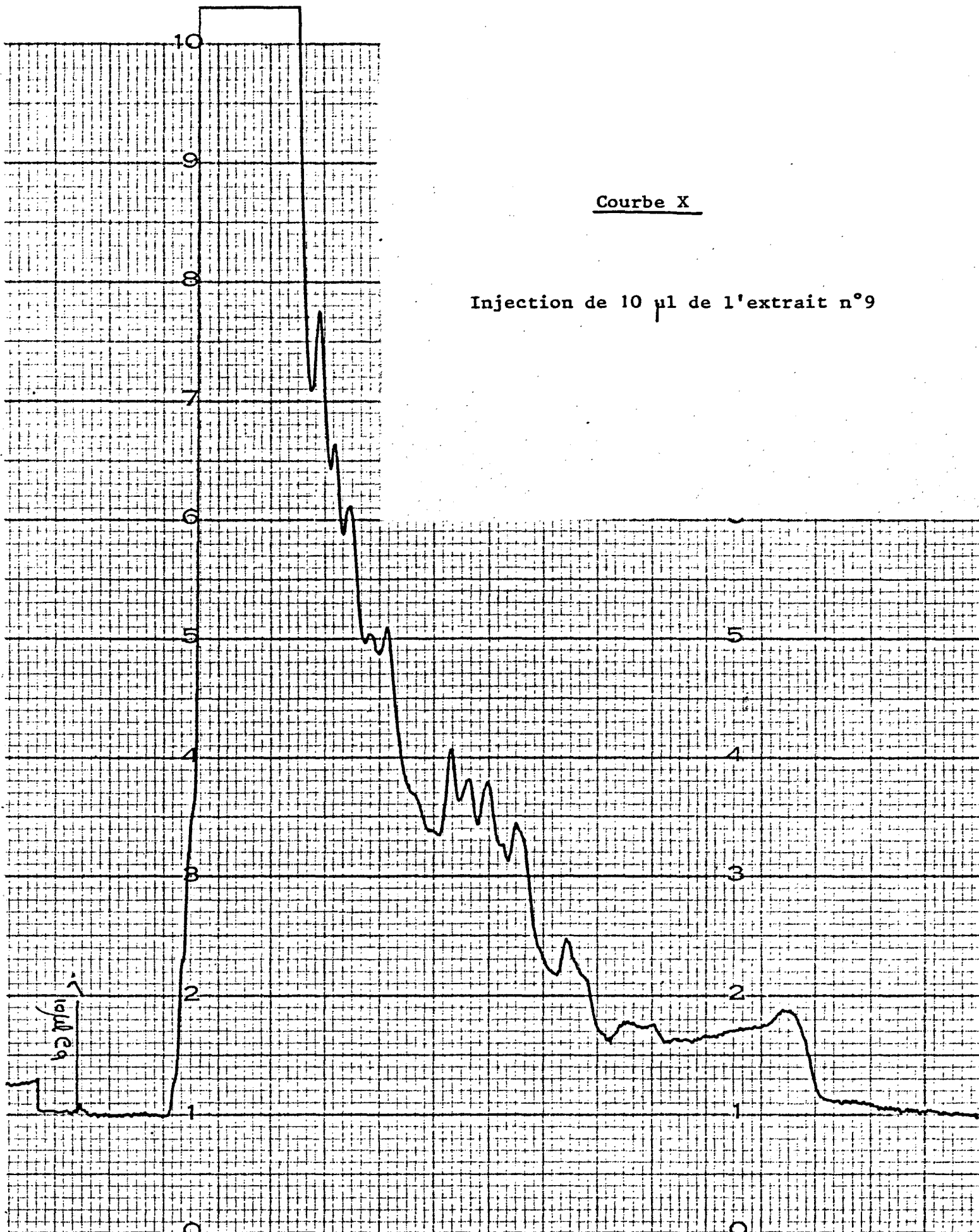




Courbe IX

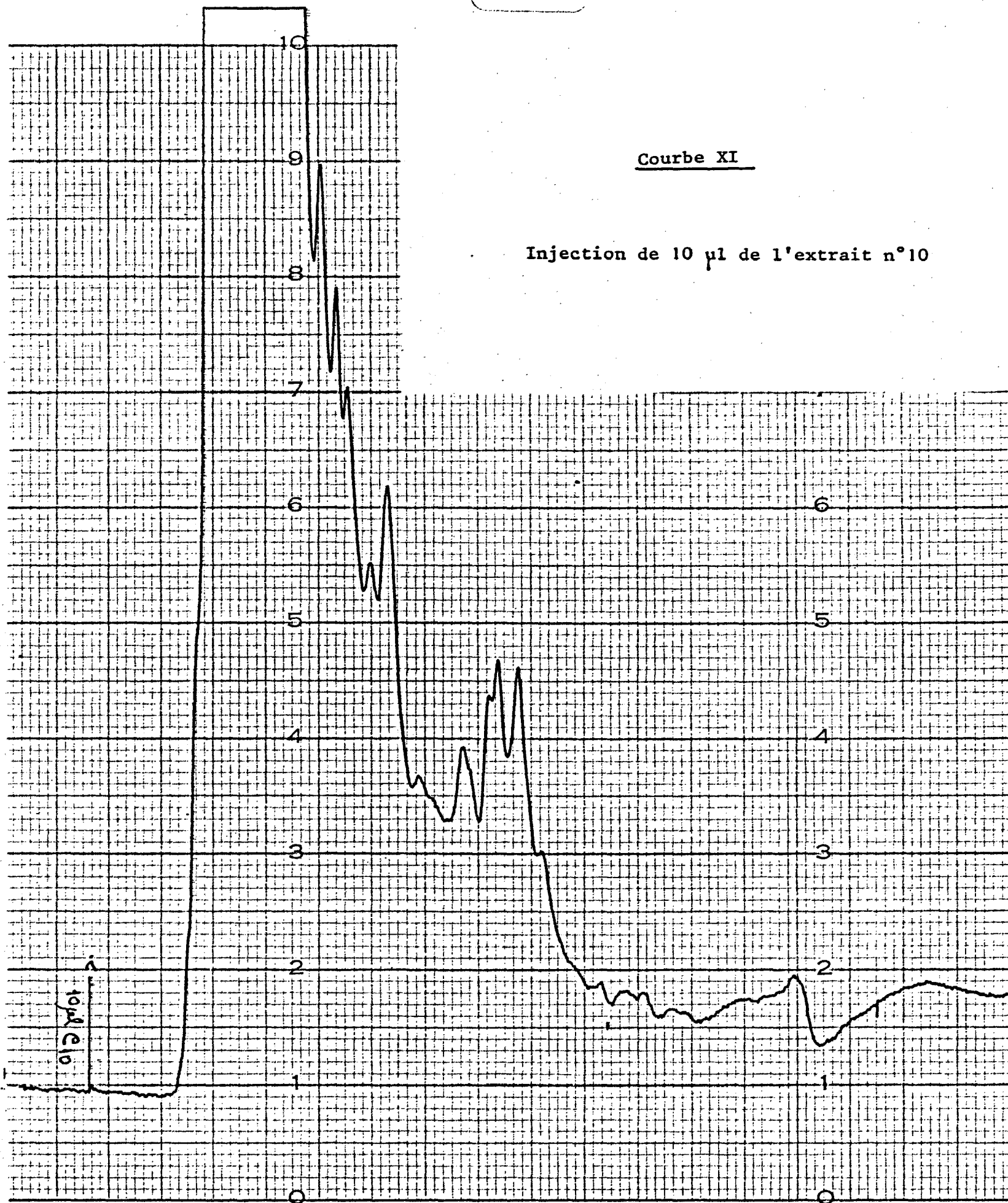
Injection de 10 μ l de l'extrait n°8





Courbe X

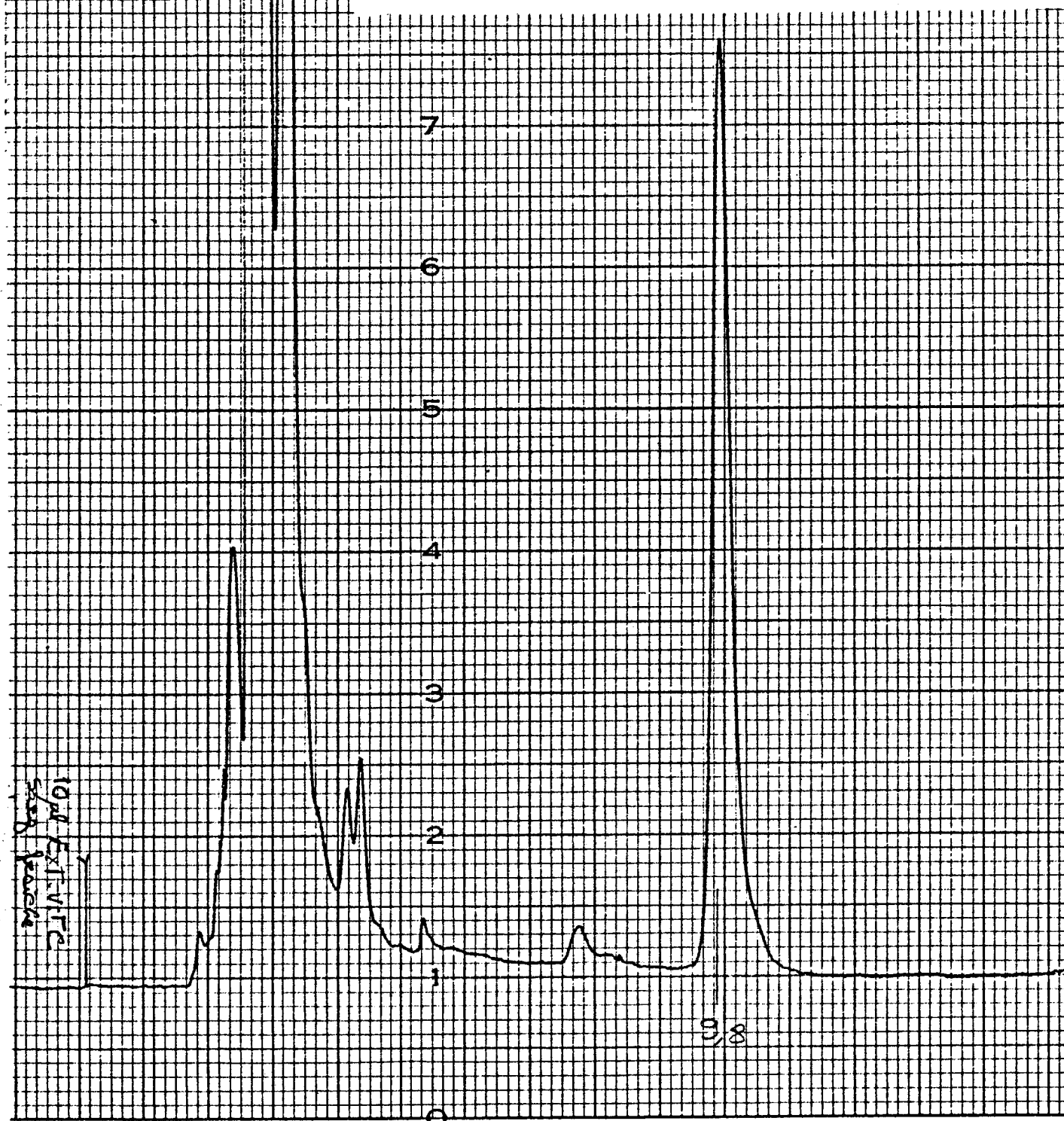
Injection de 10 µl de l'extrait n°9

Courbe XIInjection de 10 μ l de l'extrait n°10

0806N50/26057/12.83

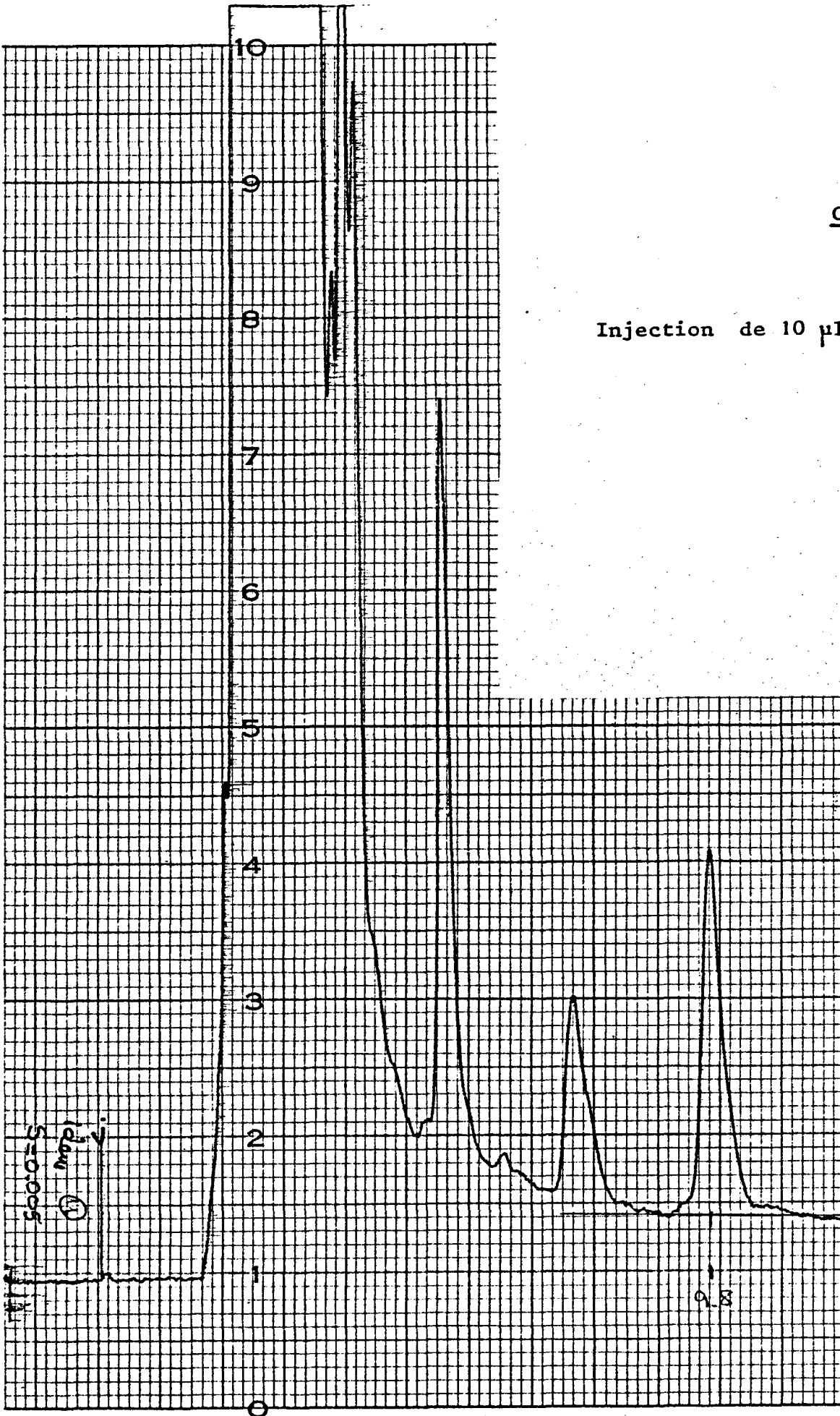
Courbe XII

Injection de 10 µl de l'extrait Jan. 86
(Sargassum fraiche)



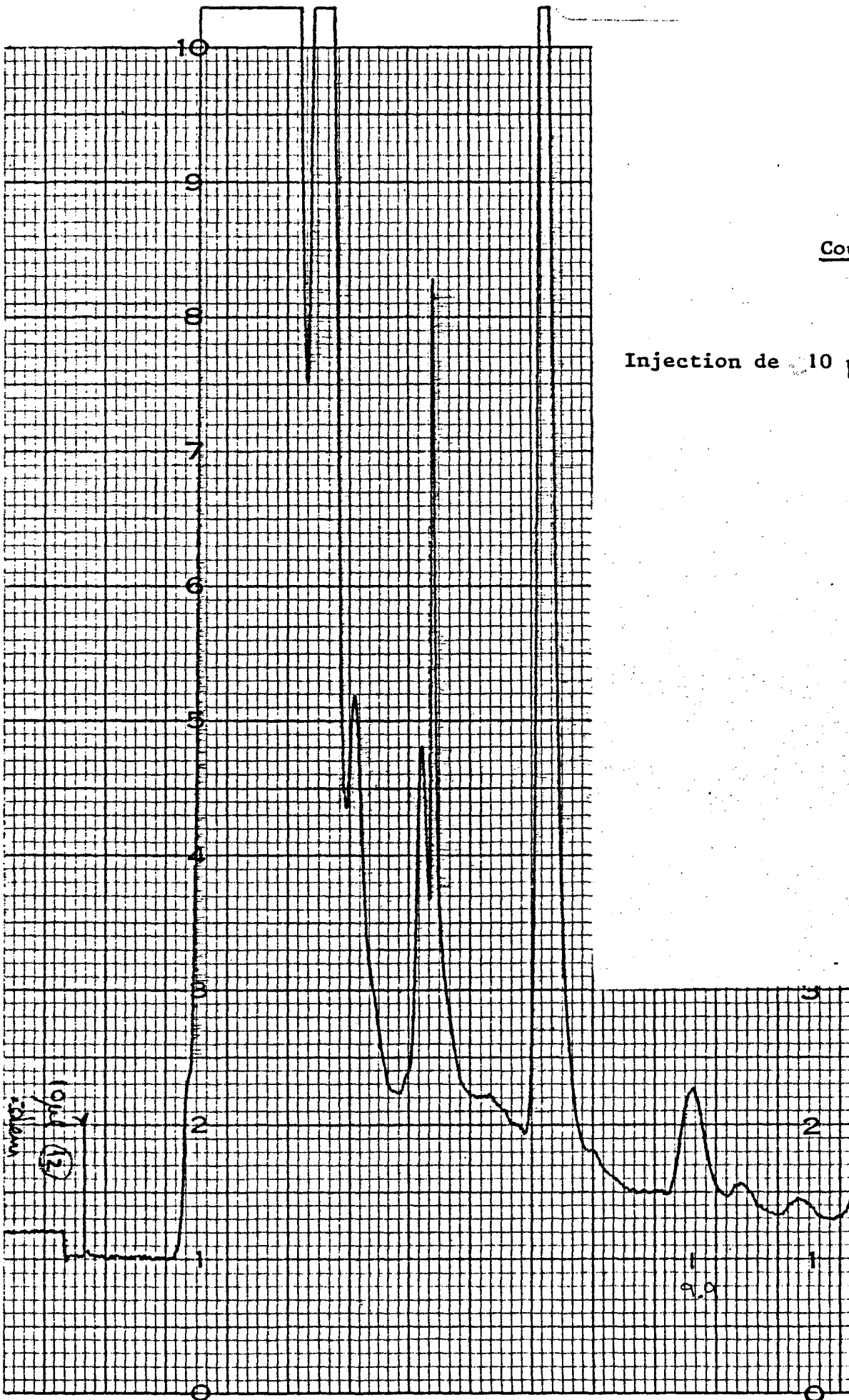
Courbe XIII

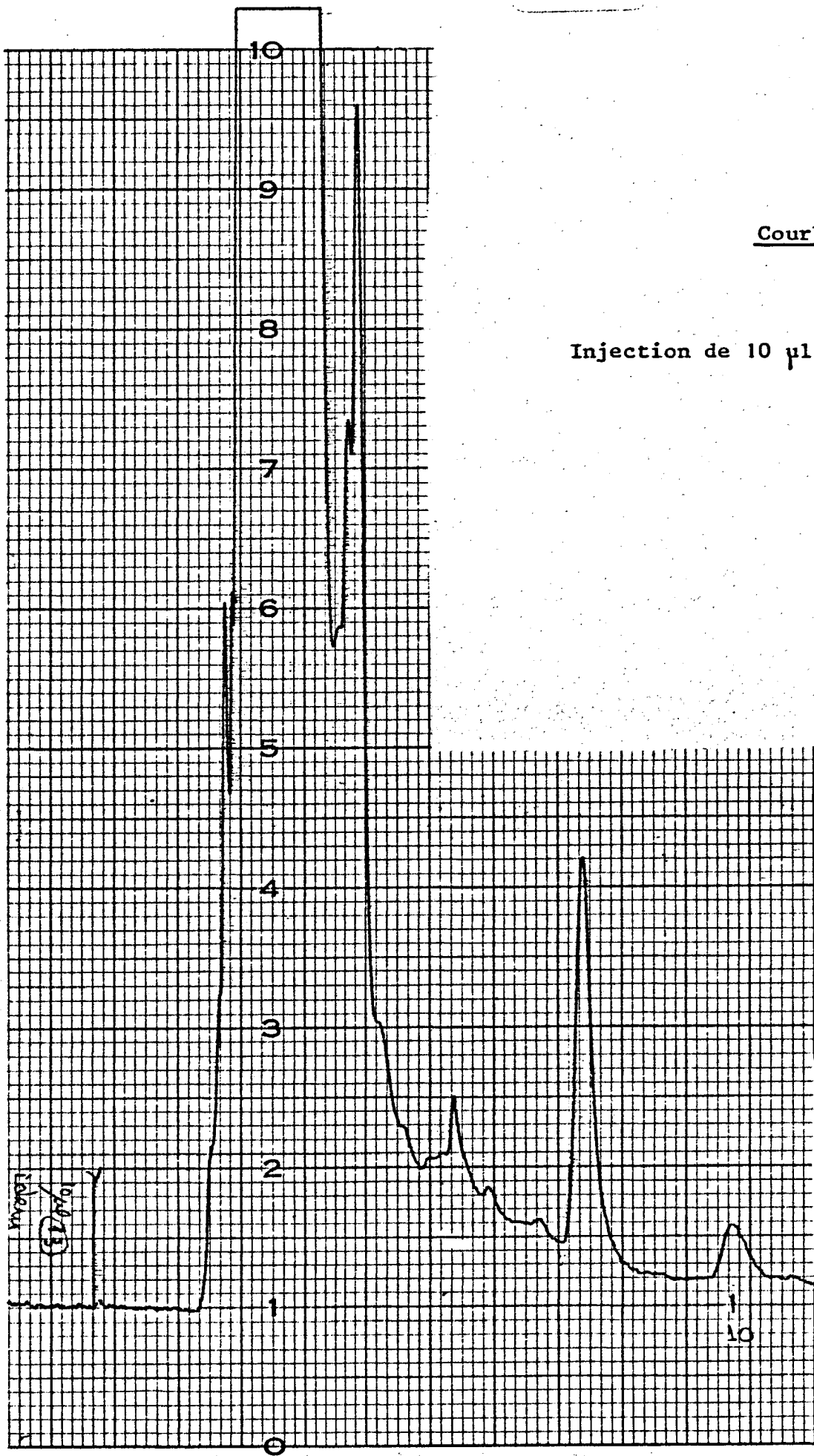
Injection de 10 μ l de l'extrait n° 11



Courbe XIV

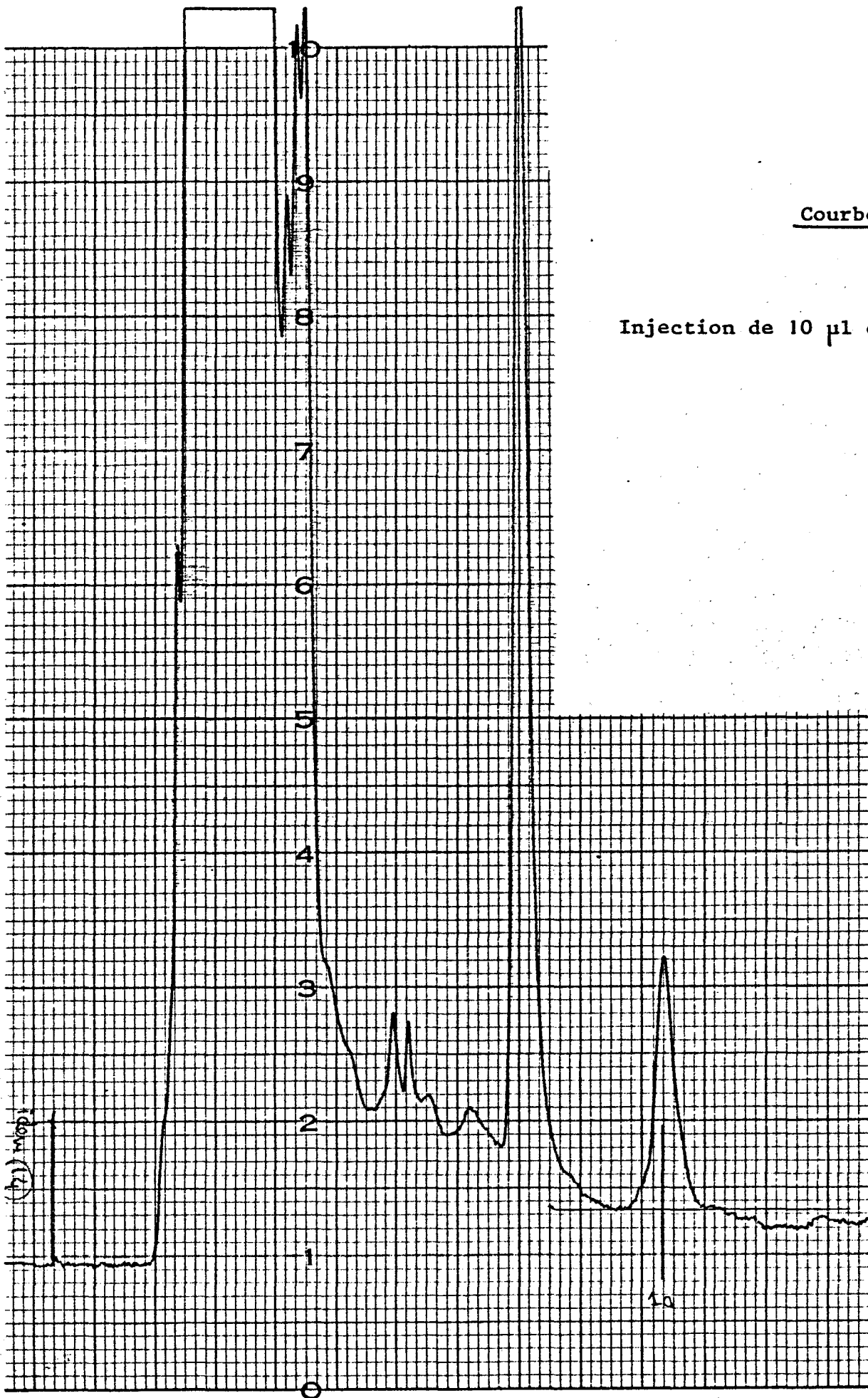
Injection de 10 µl de l'extrait n°12





Courbe XV

Injection de 10 μ l de l'extrait n°13

Courbe XVIInjection de 10 μ l de l'extrait n°14

5 - RESULTATS :

Les tableaux qui suivent donnent, vitamine par vitamine, les résultats obtenus et les améliorations qui pourraient être faites dans les dosages à venir.

A) Vitamines liposolubles :→ a) Rétinol :

Dans un premier temps, et sur les premiers extraits, un dosage de β carotène a été expérimenté pour montrer que tout le β carotène de *Sargassum muticum* s'hydrolysait en rétinol.

En effet, les résultats obtenus situaient la teneur en β carotène après extraction de l'ordre du nanogramme par gramme (10^{-9}). La réaction d'hydrolyse avait bien lieu.

Puis le dosage du rétinol a permis d'obtenir les résultats suivants :

NUMEROS EXTRAITS	CONCENTRATION EN VITAMINE A/gramme d'algue sèche en ppm
1	00
2 (pic non résolu)	—
3	54,8
4	68
5	69,6
6	21,5
7	26,7
8	50,5
9	0
10	0
11	24
12	21
13	171
14	76
<u>Algue fraîche</u>	<u>134</u>

Commentaires :

D'après ces résultats, il semblerait que le stockage des algues par cryobroyage, même si il est le meilleur que nous puissions envisager, n'est pas suffisant pour conserver le rétinol de Sargassum muticum, puisqu'il y a une nette différence entre les résultats de l'extraction des échantillons cryobroyés et ceux de l'algue fraîche.

Si tant est que la dégradation soit constante tout au long du stockage (ce qui est une simple hypothèse), on observe une augmentation de la teneur en rétinol pendant les mois d'été, au maximum des températures de l'eau et de la longueur des jours, puis à partir d'août, septembre, une diminution.

On peut considérer que le fort résultat obtenu pour l'extrait 13 vient plutôt du fait que le dosage a eu lieu juste après cryobroyage et que le rétinol n'avait pas encore eu le temps de se dégrader.

A noter dans ces résultats deux remarques importantes.

. La teneur de l'algue fraîche et de l'algue cryobroyée varie du simple au double.

Et dans les échantillons du même mois (janvier 1986), de provenance différente, Bouin et Golfe du Morbihan, présentent une différence très significative de résultats. D'où l'importance d'avoir varié nos sources d'approvisionnement : ceci nuit à l'élaboration d'une courbe donnant la variation de teneur en vitamines mois par mois, mais permet de constater que cette teneur varie et qu'un dosage ne peut permettre de conclusion générale si les matières premières ne sont originaires que d'une seule source.

Au reste, dans le cas présent, nous avons pu constater que tous les échantillons provenant du Golfe du Morbihan présentaient une plus faible teneur en vitamines, et ce quelque soit la nature de cette vitamine.

→ b) Cholécalciférol :

EXTRAITS	TENEUR EN VITAMINE D ₃ en ppm ALGUE SECHE
1	2,8
3	0,143
5	1,63
9	0
11	0,156
13	1,037
14	0,617

• Commentaires :

Etant donné l'éloignement de Nantes de toute source d'approvisionnement de l'algue, il ne nous a pas été possible pour le cholécalciférol d'envisager un dosage sur algue fraîche, ceci est regrettable.

Nos résultats ne portent que sur algue cryobroyée et il semblerait que *Sargassum muticum* contienne un très faible pourcentage de vitamine D₃ (< 1ppm), et cette teneur ne semble obéir à aucun cycle saisonnier pas plus qu'à une variation précise d'origine.

→ c) α Tocophérol :

NUMEROS EXTRAITS	TENEUR EN α TOCOPHEROL (en ppm)
1	8,96
2	10,83
3	36,70
4	13,17
5	0
6	7,20
7	15,20
8	27,60
9	0
10	22,24
11	0
12	0
13	0
14	0
<u>Algue fraîche</u>	<u>0</u>

• Commentaires:

Sargassum muticum semble en moyenne contenir 10 ppm d'α tocophérol, ce qui rentre dans les moyennes observées chez les végétaux.

Nous avons pu constater d'après ce dosage, que les formes hivernales de l'algue ne contenaient pas du tout d'α tocophérol et comme les dosages sur algue fraîche de cette algue se situaient en hiver, nous n'avons pu le comparer par rapport à celui de l'algue cryobroyée, les deux résultats étant nuls.

→ d) Phytoméнадione :

Rappelons ici que le dosage de la phytoméнадione n'a pu être mis au point que très tardivement; de fait, les algues sont donc restées stockées longtemps en congélateur, après cryobroyage il est vrai, ceci a nui à la phytoméнадione qui est d'une exceptionnelle fragilité.

NUMERO EXTRAITS	RESULTATS EN ALGUE CRYOBROYEE (ppm)	RESULTAT EN ALGUE SECHE (ppm)
1→8	0	0
9	Traces	Traces
10	21,8	144
11	86,9	511
13	582,3	1165
15	504,8	1179

• Commentaires:

Sargassum muticum semble contenir un fort pourcentage de vitamine K₁. Cette teneur est d'autant plus forte que l'échantillon dosé n'avait séjourné que peu de temps au congélateur.

Il semble donc qu'une dégradation très rapide de la vitamine K₁ soit à l'origine des faibles pourcentages des premiers extraits. Nous ne pouvons donc conclure aucune hypothèse quant aux variations d'un cycle annuel.

Il serait très intéressant de poursuivre des recherches dans cette voie, non que l'extraction de la vitamine K₁ ne puisse avoir d'application dans un domaine pharmaceutique à ce jour, car toute extraction et purification seraient beaucoup trop coûteuses par rapport aux prix de sa synthèse actuellement; mais à seule fin phytochimique, il serait intéressant, d'une part de mettre en oeuvre un dosage sur algue fraîche mensuel d'autre part d'envisager un dosage en chromatographie phase gazeuse pour confirmer les résultats obtenus.

B) Vitamines hydrosolubles :

Rappelons ici que le travail d'extraction n'a pu être effectué avec une lyophilisation finale, ce qui a élevé d'autant les limites de détection dans certains cas. (supérieure à la teneur vraisemblable en vitamines).

—————→ a) Thiamine :

Les courbes en annexe nous permettent de constater que nous n'avons pu déceler de vitamine B₁.

Notre limite de détection se situant à 16 ppm pour l'algue fraîche et 120 ppm pour l'algue sèche, nous pouvons donc conclure que *Sargassum muticum* contient moins de 120 ppm de vitamine B₁ (poids sec).

Ce d'autant qu'une Chromatographie couche mince a pu être envisagée sur un extrait lyophilisé gracieusement par l'IFREMER de Nantes. Cette chromatographie couche mince décèle la présence de vitamine B₁.

—————→ b) Riboflavine :

EXTRAIT NUMERO	VITAMINE B ₂ (poids sec) en ppm
1	51
3	77
4	61
5	71
7	86
8	85
9	54
11	66
14	43
15	56

• Commentaire :

Sargassum muticum présente en poids sec une teneur en Riboflavine de 60 ppm environ, ce qui correspond à 10 ppm en poids cryobroyé. Ce qui est la moyenne de la teneur en vitamine B₂ des tissus végétaux.

En outre, on observe une légère augmentation de cette teneur durant la période estivale, au maximum de la température de l'eau et de la durée des jours.

Quand l'algue a libéré ses organes reproducteurs, cette teneur baisse de nouveau. Le rôle de coenzyme de la vitamine B₂, nécessaire à toutes cellules, est un bon reflet de l'activité métabolique des tissus, tant végétaux qu'animaux.

Il semblerait donc que le maximum de cette activité métabolique corresponde à la période de fécondation pour l'algue, et retombe après libération des organes reproducteurs.

—————→ c) Pyridoxine :

Là encore, notre limite de détection, 30 ppm poids cryobroyé, et 200 ppm poids sec, est assez élevée. Nous pouvons juste conclure que, Sargassum muticum, si elle contient de la vitamine B₆, possède une teneur inférieure à cette limite.

Ce dosage serait intéressant à expérimenter quand le laboratoire possèdera un lyophilisateur.

—————→ d) Cyanocobalamine :

Même conclusion, si Sargassum muticum contient de la vitamine B₁₂, sa teneur est inférieure à la limite de détection : 125 ppm (poids sec) et 10 ppm (poids cryobroyé).

→ e) Amide nicotinique :

Nous avons fourni ici les courbes d'enregistrement "optimales" obtenues après variations des conditions opératoires. La résolution du système chromatographique est telle, qu'une extrapolation sans intégrateur, serait du domaine de la simple hypothèse.

Aussi pouvons-nous signaler que *Sargassum muticum* contient de la vitamine PP, mais nous ne préférons pas quantifier pour l'instant les résultats.

→ f) Acide ascorbique :

Comme pour la vitamine K₁, les premiers extraits ne contiennent pas d'acide ascorbique. Seuls les derniers extraits permettent de quantifier les résultats.

NUMERO EXTRAITS	VITAMINE C en ppm (poids sec)
11	73
12	22
13	21
14	54
Algue fraîche	569

• Commentaires :

On peut constater que les derniers extraits sont les seuls à contenir de l'acide ascorbique, ce qui signifie que ce dernier s'est dégradé dans les précédents extraits (mauvaise conservation à la congélation).

D'autre part, un dosage sur algue fraîche a permis de constater une importante concentration de vitamine C. dans *Sargassum muticum* environ 570 ppm, nettement supérieure.

Il semblerait donc que le cryobroyage ne permette pas la conservation de l'acide ascorbique.

Donc pour connaître les variations saisonnières de la teneur en vitamine C de Sargassum muticum, il est nécessaire de travailler sur échantillon frais d'une part, et d'autre part il serait intéressant de connaître la teneur en acide déhydroascorbique pour établir la variation du potentiel Redox cellulaire au cours du cycle écophysiological, autre bon témoin de l'activité métabolique.

6 - CONCLUSION ET PROJETS DE RECHERCHES :

Les deux années de recherche ont principalement été consacrées à mettre au point une série de protocoles phytochimiques reproductibles permettant le dosage des vitamines dans *Sargassum muticum*.

Toutefois, nous pouvons fournir une moyenne de résultats pour seulement 7 d'entre elles sur 10.

L'éloignement de Nantes de toutes sources de Sargasse d'une part, l'absence de lyophilisateur et d'intégrateur au moment du dosage d'autre part, n'ont pas permis de couronner de succès cette mise au point pour l'ensemble des vitamines.

VITAMINES	QUANTITE en ppm (poids sec)
A ₁	51
D ₃	1
E	10
K ₁	750
B ₂	65
C	560
PP	traces

L'étude de la variation saisonnière des teneurs en vitamines B₁, B₆ et B₁₂ pourra être effectuée ultérieurement avec un lyophilisateur qui sera disponible au laboratoire.

L'étude de la variation saisonnière de la teneur en vitamine PP pourra être effectuée ultérieurement avec un intégrateur*.

* acquis à ce jour.

Celles des vitamines C et K, si un échantillonnage d'algues fraîches arrive régulièrement au laboratoire.

Il resterait intéressant de poursuivre une recherche dans le domaine de ces deux vitamines, compte tenu de l'importance de leur concentration dans cet élément végétal particulièrement abondant.

Il conviendrait, de même, d'établir un dosage couplé Acide ascorbique-Acide déhydroascorbique, permettant d'évaluer l'intensité de l'activité métabolique des cellules de Sargasse.

Enfin, dans un domaine d'avenir, dépassant la teneur en vitamine de cette matière première, des recherches

- d'alcaloïdes,
- de tanins
- d'anthocyanes, de coumarine

restent à établir pour cette algue afin d'avoir un panorama complet de sa composition phytochimique et, qui sait, envisager une application à des fins thérapeutiques ou cosmétiques de Sargassum muticum.

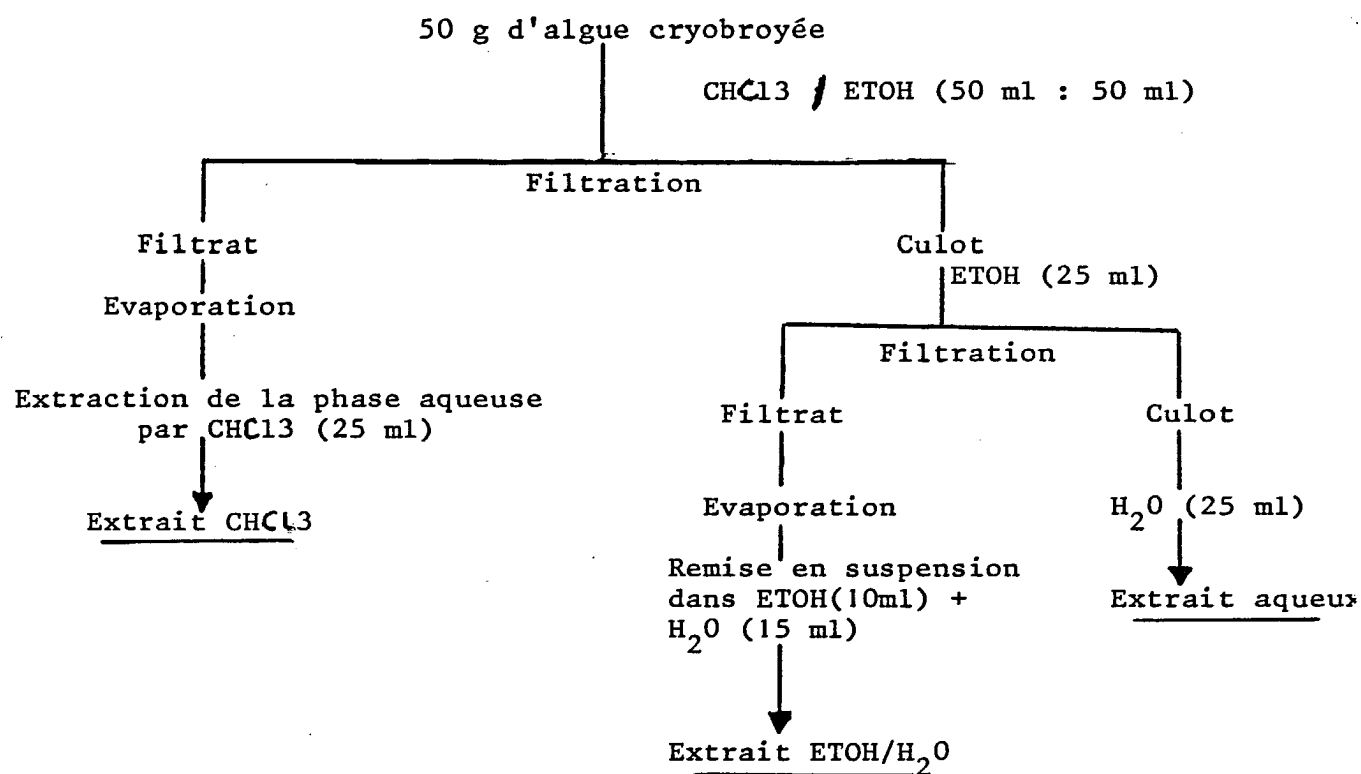
III - ESSAIS D'EFFICACITE BACTERIOSTATIQUE

A. OBJET :

Evaluation du pouvoir bactériostatique des extraits de trois algues :
 Fucus vesiculosus
 Sargassum muticum
 Undaria pennatifida.

B. METHODE :

Les extraits sont obtenus par la méthode suivante :



On a testé l'efficacité des extraits sur les quatre germes suivants :

- Escherichia coli
- Klebsiella pneumonia
- Pseudomonas aeruginosa
- Staphylococcus aureus

Les germes stockés au laboratoire sur gélose nutritive sont réactivés par une remise en suspension dans un bouillon nutritif, la veille de l'expérience.

On procède à des ensemencements en profondeur sur gélose standard pour dénombrement avec 1 ml de chaque suspension bactérienne.

Après solidification de la gélose ensemencée et avec un emporte-pièce stérile, on découpe des cupules de gélose d'un diamètre de 6 mm. Les cupules sont remplies avec les extraits à étudier.

On remplit aussi les cupules avec les différents solvants utilisés : CHCl_3 ; $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ et H_2O , afin d'observer s'il y a une inhibition de la croissance des germes par les solvants.

Les boîtes de Pétri sont mises à l'étuve à 35°C pendant 72 heures.

RESULTATS :

TABLEAU I : Diamètre d'inhibition (mm) après 72 h.

ALGUE	GERME EXTRAIT	ESCHERICHIA COLI		KLEBSIELLA PNEUMONIA		PSEUDOMONAS AERUGINOSA		STAPHYLOCOCCUS AUREUS	
FUCUS VESICULOSUS	CHCl_3	7	10	8	8	7	8	9	9
		8	9	8	8	7	8	9	8
		8	10	8	8	8	8	9	8
FUCUS VESICULOSUS	$\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$	U	0	0	0	10	10	U	0
		U	U	U	U	10	10	U	0
		U	0	U	U	10	10	U	0
FUCUS VESICULOSUS	H_2O	25	25*	U	0	U	0	25	25*
		25	25	U	U	U	U	25	25
		25	25	U	U	U	U	25	25
SARCASSUM MUTICUM	CHCl_3	8	8	8	8	8	7	9	9
		8	8	8	8	8	7	9	9
		8	8	8	8	8	7	9	9
SARCASSUM MUTICUM	$\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$	U	U	20	24*	0	0	0	U
		U	U	20	20	U	U	U	U
		U	0	20	20	U	U	U	U
SARCASSUM MUTICUM	H_2O	20	20*	23	20*	0	U	U	U
		20	20	23	23	0	0	U	U
		20	21	23	23	0	U	U	U
UNDARIA PENNATIFIDA	CHCl_3	9	9	9	9	8	7	9	9
		9	8	10	9	7	8	9	9
		8	8	9	8	8	8	9	8
UNDARIA PENNATIFIDA	$\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$	U	U	U	U	U	0	U	0
		22	22*	22	21*	0	U	0	0
		24	22	22	20	U	U	0	U
UNDARIA PENNATIFIDA	H_2O	22	22	22	20	0	0	U	0
		22	22	22	20	0	0	U	0

* Il ne s'agit pas de vraies zones d'inhibition car elles sont diffuses

TABLEAU II : Diamètre d'inhibition (mm) après 72 h.

GERMES EXTRAIT	ESCHERICHIA COLI		KLEBSIELLA PNEUMONIA		PSEUDOMONAS AERUGINOSA		STAPHYLOCOCCUS AUREUS	
CHCl ₃	8	8	7	8	9	8	9	9
	8	9	7	7	8	8	9	9
	8	9	7	7	8	8	9	9
ETOH/H ₂ O	0	0	0	0	0	0	0	0
H ₂ O	0	0	0	0	0	0	0	0

On observe que le chloroforme inhibe lui-même la croissance des bactéries, donc les diamètres d'inhibition mesurés sont dus au chloroforme et non à l'extrait d'algue.

L'observation des résultats nous amène à procéder à un nouveau test sur un extrait éthanolique de Sargassum muticum.

L'extrait de Sargassum muticum (octobre 1985) a été préparé de la façon suivante :

50 g d'algue cryobroyée

ETOH (50 ml)

Filtration

Extrait éthanolique

En utilisant la même méthode, on trouve les résultats suivants :

TABLEAU III : Diamètre d'inhibition (mm) après 72 h.

GERMES EXTRAIT	ESCHERICHIA COLI		KLEBSIELLA PNEUMONIA		PSEUDOMONAS AERUGINOSA		STAPHYLOCOCCUS AUREUS	
ETOH	28	27	11	11	22	24*	0	0
	28	28	11	11	22	24	—	—
	28	27	11	11	25	23	0	0

Pour *Klebsiella pneumonia*, on observe deux cercles. Le cercle de 11 mm de diamètre est un vrai cercle d'inhibition tandis que l'autre est, comme pour *Escherichia coli*, un cercle diffus opaque qui pourrait correspondre à une inhibition partielle.

Il est dommage que l'extrait éthanolique de Sargassum ne soit pas efficace sur Pseudomonas aeruginosa et Staphylococcus aureus. Cependant son efficacité sur les deux autres germes tests, Klebsiella pneumoniae et Escherichia coli est intéressante, car elle laisse supposer une certaine efficacité sur d'autres germes courants.

Nous allons donc formuler une crème cosmétique à base d'extrait éthanolique de Sargassum et étudier si cette crème résiste bien à une contamination volontaire de Klebsiella pneumoniae par exemple.

C. FORMULATION DES CREMES POUR ESSAIS D'EFFICACITE BACTERIOSTATIQUE

Deux crèmes seront préparées, la première à base de 20% d'éthanol pour servir de témoin, la deuxième à base d'extrait éthanolique de Sargassum muticum afin de vérifier l'intérêt d'un tel extrait d'algue sans tenir compte de son solvant.

1. Formule retenue :

Alcool éthylique	20,00 g (ou extrait)	Phase aqueuse
Sorbitol 70%	10,5 g	
Carboxyméthylcellulose	1,00 g	
Tween 40	3,8 g	
Eau	50,3 g	
Huile de vaseline	10,00g	Phase huileuse
Acide stéarique	2,5 g	
Span 40	1,9 g	

2. Préparation :

- Former le gel de carboxyméthylcellulose par dispersion dans l'eau sous agitation.
- Ajouter l'alcool, le sorbitol et le tween 40 sous faible agitation.
- Préparer la phase huileuse.
- Chauffer les deux phases séparément au bain-marie.
- Verser la phase huileuse dans la phase aqueuse sous agitateur à palettes.
- Agiter jusqu'à refroidissement complet de la crème.

3°) Détermination de la contamination éventuelle initiale des deux crèmes formulées :

Selon la méthode classique de détermination de la contamination des produits cosmétiques, on procède à des dilutions des deux crèmes selon le protocole suivant.

1 g de crème + 9 ml de bouillon nutritif →
dilution 10^{-1} ; de même des dilutions jusqu'à 10^{-6} sont préparées.

Desensemencement en profondeur sur gélose standard pour dénombrement avec 1 ml de chaque dilution. Après solidification de la gélose, les boîtes de Pétri sont mises en étuve à 35°C pendant 24 heures.

Soit les résultats microbiologiques suivants:

DILUTIONS CREMES	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
20% ETOH	0	0	0	0	0	0
20% Extrait	0	0	0	0	0	0

Première constatation :

Les deux crèmes testées ont été correctement préparées et ne sont pas contaminées à l'origine.

4°) Contamination volontaire avec Klebsiella pneumoniae :

a) Sur la crème à 20% Ethanol :

On procède à une contamination volontaire de cette crème avec Klebsiella pneumoniae. Des dénombrements de germes sont alors faits à intervalles de temps réguliers pour suivre l'évolution de la contamination du produit.

A chaque temps de contact, on effectue des dilutions dans du bouillon nutritif (9 ml + 1 g de crème : dilution 10^{-1}) et ainsi jusqu'à la dilution 10^{-6} .

Les ensemencements en profondeur sont faits immédiatement et les boîtes sont mises à l'étuve à 35°C.

b) Sur la crème à 20% d'extrait éthanolique de Sargassum muticum :

On procède de la même façon en suivant la contamination de cette crème ainsi préparée aux temps 1/2 heure, 24 heures, 48 heures, 7, 8 et 9 jours.

Les résultats sont donnés dans les tableaux de la page suivante.

1 - Crème + 20% d'extrait éthanolique d'algue

Dilution Temps	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1/2 h	300	300	300	300	300	108
24 h	300	300	300	300	87	9
48 h	300	300	300	254	24	2
7 jours	300	300	291	30	1	0
8 jours	300	189	19	1	0	0
9 jours	300	98	1	0	0	0

Temps de contamination	1/2 h	24 h	48 h	7 jours	8 jours	9 jours
20% extrait éthanolique d'algues + crème	$108 \cdot 10^6$	$87 \cdot 10^5$	$253 \cdot 10^4$	$291 \cdot 10^3$	$189 \cdot 10^2$	$98 \cdot 10^2$

2 - Crème + 20% d'Ethanol :

Dilution Temps	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1/2 h	300	300	300	300	247	23
24 h	300	300	300	300	250	24
48 h	300	300	300	300	300	65
7 jours	300	300	300	300	300	96
8 jours	300	300	300	300	290	29
9 jours	trouble	trouble	trouble	103	1	0

Temps de contamination	1/2 h	24 h	48 h	7 jours	8 jours	9 jours
20% Ethanol + crème	$246 \cdot 10^5$	$250 \cdot 10^5$	$65 \cdot 10^6$	$96 \cdot 10^6$	$290 \cdot 10^5$	$103 \cdot 10^4$

5°) Conclusion :

Les contaminations initiales dans les deux crèmes sont respectivement 246.10^5 germes au gramme pour la crème à 20% d'éthanol et 108.10^6 germes au gramme pour la crème renfermant 20% d'extrait de Sargasse.

L'évolution sur 9 jours nous permet de conclure sur deux points :

- l'extrait de *Sargassum muticum* possède un réel pouvoir bactéricide sur *Klebsiella pneumoniae* (108.10^6 germes au gramme initialement à 98.10^2 germes au gramme à 9 jours).

Ce pouvoir s'exerce lentement et nous pouvons supposer qu'il serait encore plus efficace au delà des 9 jours.

- la contamination de la crème à 20% d'éthanol reste stable jusqu'au huitième jour. Au neuvième jour, on note cependant une légère diminution 103.10^4 germes au gramme au bout de 9 jours.

IV SCREENING COSMETIQUE DE SARGASSUM

I - IDEES DE BASE :

Nous disposons, au départ, de différentes sources d'algues :

- algue fraîche,
- farine d'algue adressée par le Centre de Recherches de Pleubian et préparée selon le procédé Armoralgue,
- algue cryobroyée à l'azote liquide au Laboratoire de Cosmétologie et de Pharmacie Industrielle, sur laquelle nous réalisons un extrait hydroalcoolique à raison de 40 parties d'alcool pour 60 parties d'eau,
- poudre d'algue réalisée au Laboratoire de Cosmétologie et de Pharmacie Industrielle par séchage à l'étuve réglée à 35° ±1°C pendant 72 heures d'algue Sargassum fraîchement cueillie. Cette algue séchée est micronisée à l'aide d'un broyeur de laboratoire type P 14 à rotor à 24 fléaux muni d'une grille de 200 µ.

Trois pistes de recherche ont été développées :

1) La poudre d'algue microbroyée et la farine d'algue ont une rugosité certaine, due à la texture fibreuse de l'algue Sargassum.

Or en cosmétologie, les industriels sont à la recherche de substances d'origine naturelle ayant un pouvoir gommant ou même abrasif.

- a) gommant, pour la réalisation de crèmes gommantes pour le corps, en particulier au niveau des callosités des coudes et des genoux ou encore en crème exfoliante pour éliminer les cellules mortes de l'épiderme au niveau du visage ou des mains.
- b) abrasif, pour la réalisation de pâtes dentifrices suffisamment abrasives pour polir la surface des dents et pas trop abrasive pour éviter de les rayer

2) L'algue cryobroyée a une teneur intéressante en certaines vitamines, telles que vitamines C et K.

D'où l'idée d'utiliser cette matière première d'origine naturelle, recueillie à sa période optimale de teneur en vitamines, dans une crème traitante pour le visage ou les mains.

Un test d'efficacité cosmétique de la crème obtenue a été réalisé in vivo sur 10 volontaires selon un protocole original mis au point au laboratoire.

3) L'extrait alcoolique de Sargassum présente, comme nous l'avons démontré, une certaine efficacité bactériostatique, qui pourrait peut être être exploitée en utilisant l'extrait d'algue comme additif cosmétique antibactérien.

II. PROBLEMES POSES :

1) L'algue Sargasse étant très fibreuse, il convient de la broyer sous azote liquide, si l'on veut éviter tout échauffement de la matière première, qui serait préjudiciable à la teneur en vitamines de l'extrait d'algue à préparer.

Nous opérons de la façon suivante : l'algue fraîche est, soit congelée, aussitôt après sa cueillette par plongée sous-marine et transportée en congélateur portable au laboratoire, soit traitée immédiatement à l'état frais dans un container alimenté en azote liquide.

L'algue congelée est concassée à l'aide d'un pilon de bois placé sur un tamis de maille 1,25 mm et la poudre obtenue est extraite par un mélange eau-alcool à 95° (40-60).

2) Toujours en raison de l'état fibreux de l'algue, la farine d'algue fournie par Pleubian s'est révélée inutilisable, tant pour la réalisation de la crème gommante que du dentifrice.

Les grains de poudre étaient en effet trop gros et donnaient une crème gommante d'aspect marbré désagréable et trop rugueuse au toucher et un dentifrice de couleur brune au ruban granuleux incommercialisable.

Le rebroyage de cette farine avec passage au tamis Afnor 0,125 mm n'a pas permis d'améliorer notablement la qualité de la matière première.

3) Nous avons donc réalisé nous-même, une poudre microbroyée par séchage de l'algue fraîche à l'étuve à 35-40° pendant 72 heures, suivi d'un broyage fait durant 1 minute au P 14 avec Rotor 24 fléaux avec grille à 200 µ.

La poudre obtenue fine et homogène permettra la réalisation de crèmes gommantes à l'aspect lisse, et de pâtes dentifrices homogènes avec un ruban plus lisse.

Nous avons essayé également d'introduire l'algue sèche et la glycérine dans un émulsionneur de type Robot Coupe GT 550 avec un résultat intéressant.

Cette notion de finesse suffisante de l'algue micronisée est à souligner au niveau industriel, car une telle valorisation de l'algue Sargassum devra inclure nécessairement la recherche d'une technologie adaptée à ce type d'algue fibreuse avec le souci d'une finesse suffisante et d'une parfaite homogénéité de la poudre d'algue destinée à servir de matière première.

4) L'odeur assez forte de l'algue en poudre devra être couverte, dans le dentifrice, qui doit pouvoir être ingéré sans dégoût, par un parfum naturel.

De même, pour l'application cutanée, qu'il s'agisse de la poudre pour la crème gommante, ou, à un moindre degré, l'extrait hydroalcoolique pour la crème traitante.

5) La couleur brune de la poudre et des extraits ne permet d'obtenir que des produits cosmétiques de couleur beige, ce qui n'est pas un inconvénient à notre époque de recherche de produits naturels.

Nous n'avons pas jugé utile d'ajouter, comme certains industriels, pour d'autres algues, de colorant vert pour masquer cette couleur beige plus ou moins foncée.

6) La poudre de Sargasse devra nécessairement être couverte par un ou plusieurs conservateurs, type méthylparaben.

Nos premiers essais montrent que l'extrait alcoolique de Sargassum devrait avoir un pouvoir bactériostatique suffisant sans addition de bactériostatique.

III - FORMULATION D'UNE CREME GOMMANTE ;

1) Critères d'une crème gommante :

C'est une crème à appliquer en massage modéré sur la peau pour la nettoyer en éliminant les cellules mortes et la stimuler. Les grains doivent rouler sur la peau, tandis que la crème doit sécher rapidement lors du massage pour pouvoir être éliminée par gommage.

Les critères importants seront :

- la viscosité de la crème,
- la finesse et la forme arrondie des grains,
- le temps de séchage qui devra être inférieur à 5 minutes.

La couleur brune de la poudre d'algue sera éclaircie légèrement par addition de dioxyde de titane TiO_2 et également de talc, qui accentuera par son pouvoir lubrifiant le pouvoir de glissement de la crème.

2) Caractéristiques des constituants de la crème gommante :

Après différents essais avec différents excipients et additifs, ont été retenus les constituants suivants dont nous ferons varier les teneurs en une série de 22 essais :

- talc : silicate de magnésie hydraté naturel :
 - à pouvoir lubrifiant, permet le glissement des grains sur la peau,
 - à pouvoir absorbant, souvent incorporé dans les masques ou crèmes gommantes.
- syloblanc 34 : silice utilisée comme agent liant épaississant.
- dioxyde de titane : agent de blanchissement de la teinte de la crème,
 - opacifie également la pâte.
- glycérol associé à du sorbitol à 70% :
 - agents humectants évitant le dessèchement de la préparation.
- myristate d'isopropyle : lubrifiant.
- alcool éthylique : accélère la vitesse de séchage de la crème sur la peau,
 - également bon conservateur et antiseptique.
- conservateur : méthylparaben.
- parfum : essence de verveine,
 - essence de fougère,
 - essence de lavande.

3) Formules réalisées :

ASPECT	COMPOSANTS											
	Eau	Conservateur	Parfum	Alcool éthylique	Myristate isopropyle	Sorbitol 70%	Glycérol	Tio ₂	Syloblanc 34	Talc	Poudre Sargasse	
Trop abrasif	34	0		0	0	0	28	1	0	25	12	1
Trop épaisse exsude	29	0		0	0	30	0	1	0	30	10	2
Pâteuse, trop visqueuse	40	0		0	0	29	0	1	6	14	10	3
Pâteuse, trop visqueuse	40	0		0	0	30	0	1	7	16	6	4
Pas assez abrasif	40	0		0	0	32	0	1	7	17	3	5
Problèmes de consistance	40	0		0	0	32	0	1	7	16	3	6
Consistance agréable - ne gomme pas	40	0		0	0	23,5	0	0	7	22	5	7
Ne sèche pas au contact peau	42,5	0		0	2	20	0	0,5	8	23	5	8
Trop foncée avec liseré blanc	42	0		1	2	20	0	0	8	23	5	9
Pas d'amélioration	42	0		3	2	19	0	0	8	20	5	10

	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Poudre de Sargasse	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Talc	22	15	15	15	16	18	18	21	21	21	21	21
Syloblanc 34	7	11	7	7	7,5	7	7	7	7	7	7	7
Ti 02	0	0	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Glycérol	0	0	0	0	0	0	30	28	28	28	28	28
Sorbitol 70%	20	20	27,5	28	30	30	0	0	0	0	0	0
Myristate isopropyle	2	2	2	2	2	2,9	2,9	2,9	2,9	3,4	3,4	3,4
Alcool éthylique	4	4	5	5	5,5	6	6	5	5	3	3	3
Conservateur	0	0	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Essence de verveine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	lgte	0	0
Essence de lavande	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	lgte	0
Essence de fougère	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	lgte
Eau	40	40	38	37	33	30	30	30	30	31,4	31,4	31,4
	Un peu trop liquide - trop foncée	Trainées blanchâtres - trop dure	Ne sèche pas au contact peau	Exsude	Légères traces blanches - assez bonne tenue	Bonne tenue mais exsude	Bonne tenue exsude	Bonne consistance avec brillance - léger exsudat	Bonne consistance - brillante - léger exsudat au vieillissement	Excellente tenue	Excellente tenue	Excellente tenue

4) Emploi de la crème gommante :

La crème obtenue peut être employée pour nettoyer, une à deux fois par semaine, la peau du visage en l'appliquant en couche mince que l'on roulera avec douceur sous les doigts après quelques minutes de séchage.

Un gommage plus vigoureux peut permettre de diminuer les callosités et les rugosités de la peau du corps au niveau des talons, des coudes ou des genoux, en adoucissant la surface cutanée et ce, par un usage régulier sur plusieurs jours.

N.B. : Cette crème gommante pourra faire l'objet dans un prochain programme de recherche, d'un test d'usage avec suivi de l'état de surface de la peau d'une zone à callosité type coude ou genou, par prise d'empreintes, de contre-empreintes, traitées par profilométrie, avant et après expérimentation, par usage régulier de la crème sur un nombre codifié de patients.

IV - FORMULATION D'UN DENTIFRICE :

a) Critères :

Un dentifrice doit nettoyer les dents, éviter la formation de la plaque dentaire. Il doit être suffisamment abrasif pour polir la surface de la dent et niveler les aspérités naturelles mais ne pas être trop abrasif pour ne pas la rayer.

Les substances abrasives classiques d'origine minérale comme le carbonate de calcium ou le pyrophosphate de calcium tendent à être remplacés par des substances mieux calibrées comme la silice ou encore par des substances synthétiques, billes de polyamide ou par des substances végétales comme de la poudre de liège.

C'est précisément cette dernière application qui nous a donné l'idée d'utiliser la farine de Sargasse comme agent abrasif doux et gommant à la fois. Et ce avec une granulométrie suffisamment fine pour obtenir un dentifrice aux algues d'aspect agréable.

Notons que les dentifrices aux algues actuels contiennent généralement des extraits d'algues glycoliques ou aqueux en algues mélangées tout venant et non un extrait spécifique d'algue ou une poudre d'algue spécifique.

b) Constituants utilisés :

Après différents essais d'excipients et additifs, et en fonction de notre expérience de formulation de dentifrices au laboratoire de Cosmétologie et de Pharmacie Industrielle, nous avons retenu les constituants :

1 - L'algue séchée à l'étuve sera broyée au broyeur de type P 14 à Rotor 24 fléaux et à grille de 200 u.

2 - Déhydazol A 400 P est employé comme liant, gélifiant pour conférer une viscosité suffisante à la crème dentifrice. C'est une carboxyméthylcellulose purifiée.

3 - L'alginate de sodium est également un liant que l'on associera au déhydazol en différentes proportions.

4 - Le Syloblanc 34, l'aérosil 200, le Sipernat 22 S sont employés comme agents épaississants : ce sont des silices colloïdales. Elles seront ou non additionnées de talc qui aura un effet couvrant et éclaircissant.

5 - Bioxyde de titane TiO₂ : cet agent couvrant a un effet de blanchiment de la pâte.

6 - Du Sorbitol, de la glycérine et du propylène-glycol seront incorporés comme agents humectants pour éviter tout dessèchement de la pâte, si le tube est laissé ouvert par inadvertance. Là encore, on jouera sur les proportions de ces trois constituants pour obtenir un résultat optimal.

7 - Du laurylsulfate de sodium est un émulsionnant employé pour conférer au dentifrice un certain pouvoir moussant facilitant l'élimination des débris alimentaires situés dans les anfractuosités dentaires éventuelles.

8 - De la saccharine sous forme de saccharinate de sodium sert à édulcorer la pâte dentifrice et à masquer la saveur d'algue que l'on couvrira également avec une essence de menthe.

9 - Un conservateur, le méthylparaben permettra d'assurer la conservation du dentifrice contre les bactéries.

c) Différentes formulations réalisées :

Au terme des essais réalisés, la formule n° 10 présente une excellente tenue et semble répondre aux critères d'un bon dentifrice.

En fonction des excipients et additifs retenus, nous avons réalisé 10 formules différentes selon le tableau suivant :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Poudre de Sargasse	10,7	10	4,7	4,7	5	5	5	5	5	5
Déhydazol A 400 P	1,6	1,5	1,4	0	0	0	0	0	0	1,6
Alginate de sodium	0	0	0	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0
Syloblanc 34	8,6	8	0	0	0	0	0	0	0	0
Aérosil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Sipernat 22S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Talc	0	0	22,8	23,7	25	25	25	30	26	0
Sorbitol	24	25	28,5	28,5	0	0	0	0	0	0
Glycérol	0	0	0	0	29	28	28	28	28	24
Propylène glycol	3,2	3	3,8	2,8	3	3	3	3	3	3
TiO ₂	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1,5
Laurylsulfate de sodium	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Saccharinate de sodium	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1
Méthylparaben	0	0	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Essence de menthe	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,4
Eau	53,5	52	37,8	37,9	35,4	35,4	35,4	30,4	33,8	52,3
	Aspect pâteux trop abrasif	Pâteux - trop de poudres	Trop liquide	Trop liquide	Bonne tenue du boudin	Trop liquide	Trop liquide	Trop épais	Bonne connaissance mais s'altère au vieillissement	Excellente tenue et consistance

d) Applications :

La pâte dentifrice ainsi réalisée est de couleur crème, d'odeur agréable couverte par la menthe et de saveur correcte sucrée par la saccharine.

Les grains de Sargasse roulant sous la brosse pour nettoyer la surface de la dent.

N.B.: Cette pâte dentifrice devra faire l'objet dans un prochain programme de recherches, d'une série d'essais tels qu'ils ont été codifiés dans notre Laboratoire de Cosmétique et de Pharmacie Industrielle, à savoir :

- détermination du pouvoir abrasif,
- pouvoir nettoyant,
- efficacité antiplaque.

Parallèlement, à ces essais menés in vitro, un test d'usage sera réalisé en cabinet dentaire sur une trentaine de sujets.

V FORMULATION D'UNE CREME DE JOUR :

a) Critères :

Une crème de jour sera appliquée chaque jour, sur la peau pour la protéger des agressions extérieures, pour maintenir son équilibre physiologique, réguler sa teneur en eau et pour prévenir son vieillissement.

Les critères retenus pour la formulation sont :

- émulsion favorisant la pénétration des principes spécifiques,
- bonnes viscosité de la crème,
- application facile,
- odeur agréable.

b) Constituants utilisés :

Après différents essais, nous avons retenu en fonction de notre expérience de formateur, les constituants suivants :

1) L'extrait de Sargasse hydroalcoolique (40/60) sera incorporé dans une proportion de 10%.

2) La carboxyméthyl cellulose sodée : la CMC sodée est utilisée comme liant, gélifiant de type synthétique pour conférer à la préparation une bonne viscosité.

3) Sorbitol solution à 70% : incorporé comme agent humectant et lubrifiant pour assurer un vieillissement de la crème sans dessèchement.

4) Acide stéarique ou stéarine : cet acide gras en C 18 est intéressant pour ses propriétés lubrifiantes.

5) Huile de vaseline épaisse : cet excipient huileux est un facteur de consistance et un agent filmogène.

6) Tween 40 - Span 40 : ces dérivés esters d'acides gras (acide palmitique C 16) et de sorbitol sont des tensioactifs non ioniques. Ces dérivés polyoxyéthylènes servent à stabiliser la préparation.

7) Un conservateur : le paraoxybenzoate de méthyl sodé est utilisé pour protéger d'une contamination bactérienne, la crème.

c) Formulations réalisées :

Après adoption des ces différents constituants, nous en avons fait varier les proportions pour obtenir une crème de consistance et de toucher agréable. Ceci selon le tableau suivant :

N° Essai	I	II	III	IV
Eau	60	61	60	60
Extraits d'algues	10	10	10	10
Nipagine	0,3	0,3	0,3	0,3
Sorbitol 70%	7	7	10	10,5
CMC	2	1	1,5	1
Huile de vaseline	10	10	10	10
Acide stéarique	5	5	2,5	2,5
Tween 40	4	4	3,8	3,8
Span 40	1,7	1,7	1,9	1,9
COMPOSANTS ASPECT	Emulsion épaisse	Bonne viscosité - pénètre lentement - trainées blanches	Un peu plus épaisse - pénètre mieux	Fluide - très pénétrante

d) Mode de préparation :

- Préparation du gel de carboxyméthylcellulose par dispersion sous agitation mécanique dans l'eau.
- Préparation de la phase aqueuse que l'on chauffe au bain-marie à 70°.
- Préparation de la phase huileuse que l'on porte à 65°.
- Verser la phase huileuse dans la phase aqueuse sous agitateur à pale.
- Laisser sous agitation jusqu'à refroidissement complet.

e) Test d'efficacité :

1) La formule IV a fait l'objet d'un test d'efficacité mené in vivo sous forme d'un test d'usage réalisé selon un protocole mis au point par H. et Y. DE ROECK au Laboratoire de Cosmétologie et de Pharmacie Industrielle et non encore publié.

Le pannel choisi est constitué de personnes de sexe féminin ayant entre 20 et 40 ans. 30 femmes ont eu l'amabilité de se plier à l'expérimentation, soit : appliquer pendant 21 soirs consécutifs, la valeur d'une pointe de spatule de crème au niveau de la "palette du pharmacien" ou mont de Vénus (espace entre le pouce et l'index de la face dorsale de la main droite) après la toilette. Elles devaient exclure l'application de tout autre produit cosmétique.

Les prises d'empreintes furent effectuées aux temps Jo : avant la première application du cosmétique (état initial de la peau) ;

jours : J 14, J 21 (date de fin d'expérimentation).

Ce pannel était réparti comme suit :

- 10 personnes appliquant sur la main droite : base
sur la main gauche : rien
- 10 personnes appliquant sur la main droite : crème à la Sargasse
sur la main gauche : base
- 10 personnes appliquant sur la main droite : crème à l'Undaria
sur la main gauche : base.

Ceci devrait nous permettre de déterminer d'une part, l'action de la base (même formule que la crème dont l'extrait d'algue a été remplacé par de l'eau distillée) et, d'autre part, l'effet sur le stratum corneum de chaque crème à l'algue par comparaison avec la main traitée uniquement avec de la base.

2) Suivi de l'état de la peau :

Prise d'empreinte sur une zone cutanée de la main, bien délimitée et repérée par l'expérimentatrice en fonction d'un grain de beauté, d'une tâche cutanée ou d'un point tracé à l'encre de Chine, ceci afin de bien réaliser les empreintes successives aux différents temps d'expérimentation toujours au même endroit.

Ceci pour les deux mains, gauche et droite, aux temps 0, 14 et 21.

Chaque profil est répertorié avec les initiales suivi de D ou G (droite ou gauche) et du temps d'application.

La prise d'empreinte est réalisée par une coulée, sur la zone à tester, d'un élastomètre, "l'emprasil", mélangé au moment de la manipulation à un accélérateur de polymérisation.

On obtient en deux minutes une pellicule verte très fine, qui enlevée après séchage, permet d'obtenir en négatif le relief de la peau.

Ces empreintes servent à la réalisation immédiate de contre-empreintes en plâtre qui seront archivées puis analysées au profilomètre ou par macrophotographie optique.

3) Réalisation des contre-empreintes en plâtre :

L'empreinte cutanée est découpée en rectangle ayant comme centre le point de repère cité. Ce rectangle est déposé au fond d'un godet rectangulaire et maintenu au fond, puis recouvert d'un mélange de plâtre "microdico" et d'eau.

Le démoulage après séchage permet d'obtenir une éprouvette dure, qui constitue une véritable réplique de la surface cutanée en positif.

Sur ces contre-empreintes a été réalisée une analyse profilométrique selon un protocole mis au point par le Laboratoire de Cosmétologie et de Pharmacie Industrielle et non encore publié par H. DE ROECK et Y. DE ROECK-HOLTZHAUER. Cette méthode permet de quantifier les phénomènes observés et de vérifier statistiquement les résultats obtenus.

4) Analyse profilométrique des contre-empreintes :

Chaque contre-empreinte rectangulaire est analysée sur sa longueur, à l'aide d'un palpeur constitué par une pointe métallique usinée à 2/10 de millimètre, relié à un montage de profilométrie.

L'appareil, de marque Lefebvre Précision, commande un capteur électrique, relié à un détecteur donnant un signal de sortie analytique, qui est repris par un multimètre à sortie codée. Ce voltmètre est relié à un enregistreur multivoies Sefram.

L'aiguille balaie l'échantillon qui se déplace d'une façon horizontale, étant mu par un moteur.

L'analyse du relief est ainsi effectuée avec une précision de un micron.

Les courbes de profil enregistrées sur Sefram ont été agrandies deux fois par un procédé reprographique, afin de permettre une analyse plus fine des résultats, en particulier pour la mesure de la longueur L de la ligne de profil.

5) Résultats obtenus par profilométrie :

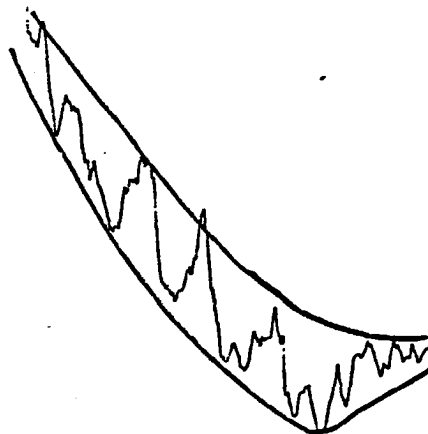
L'analyse sur la longueur de chaque contre-empreinte permet de suivre le relief sinueux que l'on observera selon le protocole suivant :

1) Tracé du relief général de la zone cutanée examinée :

On l'obtient en traçant les enveloppes de la courbe de profil obtenue.

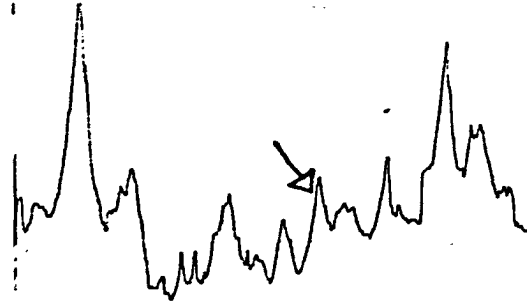
Ce relief correspond à la courbure de la zone cutanée testée.

Exemple : CAR Do



2) Observation des sillons primaires : I :

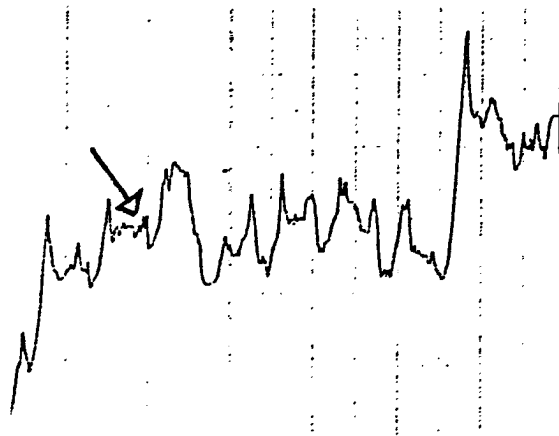
Exemple : BRI Do



Dans l'exemple montré, les sillons primaires bien arrondis avec de fortes dénivellations dénotent une main en mauvais état.

3) Mise en évidence de sillons secondaires : II: correspondant à ce qu'on a appelé le réseau microdépressionnaire de la peau :

Exemple : MART D 21



Ces sillons cutanés primaires sont visibles à l'oeil nu sur la peau ou sur les contre-empreintes en plâtre sous forme de triangles ou de losanges, dénommés sillons d'ordre un.

Les sillons secondaires constituant une structure fine, peu visible à l'oeil nu, seront bien repérés sur les macrophotographies.

L'expérience nous a montré que ces sillons n'existaient plus sur une peau fatiguée ou vieillie et que la réapparition de ces sillons était un signe de la revitalisation de la peau.

A chaque temps d'expérimentation, on déterminera :

- L : longueur ou développé de la ligne de profil
- n : nombre de pics correspondant aux sillons primaires et secondaires
- L/n : le rapport entre les deux valeurs.

Un coefficient relatif de l'évolution du profil est obtenu selon le calcul suivant :

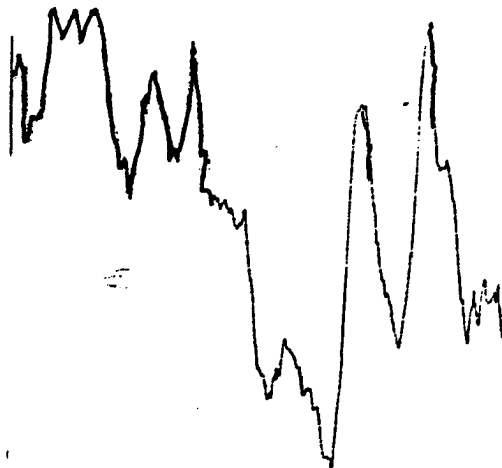
$$CR = \frac{\left(\frac{L}{n} \right)_o - \left(\frac{L}{n} \right)_{21}}{\left(\frac{L}{n} \right)_o}$$

Les coefficients relatifs sont comparés par un test non paramétrique ou test de Wilcoxon A.

Selon la table de Wilcoxon, pour un risque de 0,005, la différence sera significative dans les limites 70-140.

Analyses sujet par sujet, et main par main les résultats obtenus.

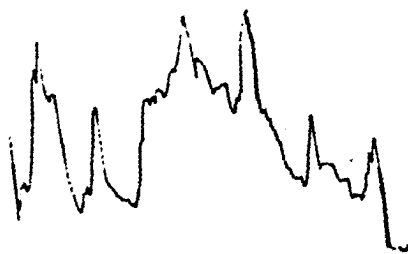
Sujet n° 1 : la peau est plus lisse avec une diminution de la longueur de L, phénomène plus net à J 14.



I D Jo



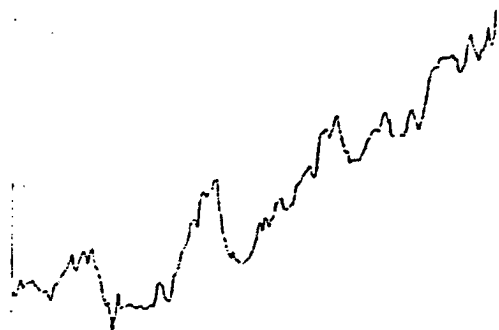
1 D J 14



1 D J 21

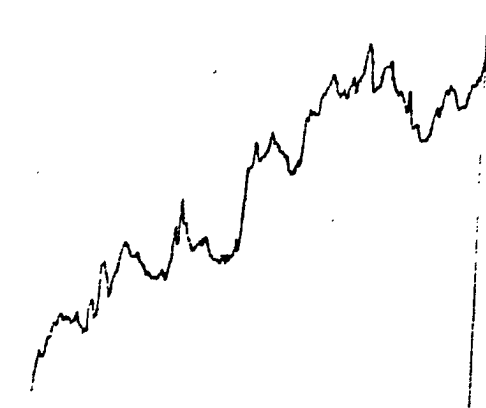
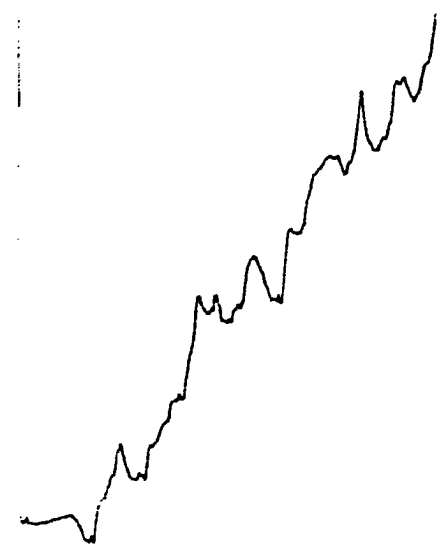
Sujet n° 2 :

La peau est plus régulière avec diminution de la longueur L et augmentation du nombre de pics, n :

2 D Jo2 D J142 D J 21

Sujet n° 3 :

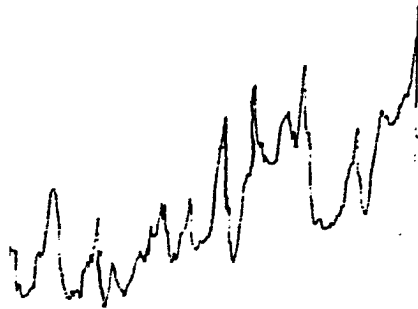
Au cours de l'expérimentation, diminution de L
et diminution de n :

3 D Jo3 D J143 D J21

Sujet n° 4 :

La peau est plus lisse :

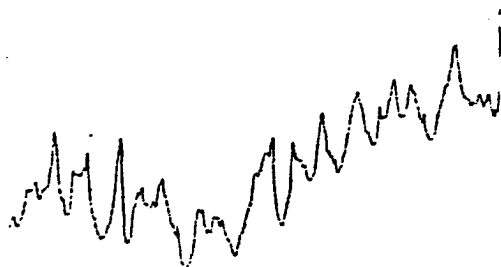
4 D Jo



4 D J14

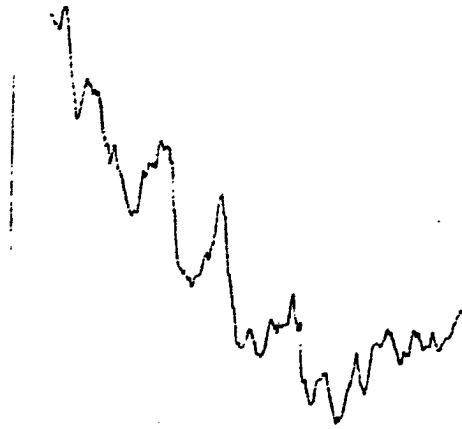
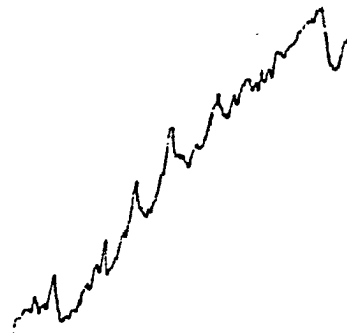


4 D J21



Sujet n° 5 :

Peau avec diminution de L et augmentation de n,
phénomènes plus nets à J14 :

5 D Jo5 D J14

Sujet n° 6 :

Augmentation de n plus net à J 14 :

6 D Jo



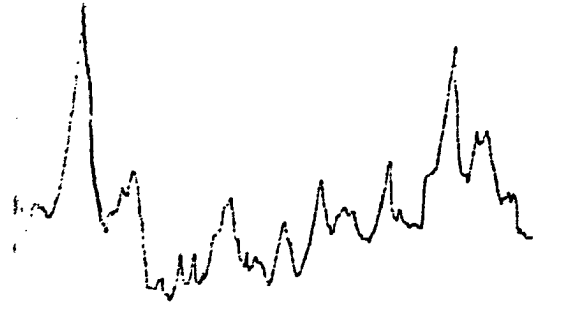
6 D J14



Sujet n° 7 :

Peau devenant plus régulière avec diminution
de la longueur L :

7 D Jo



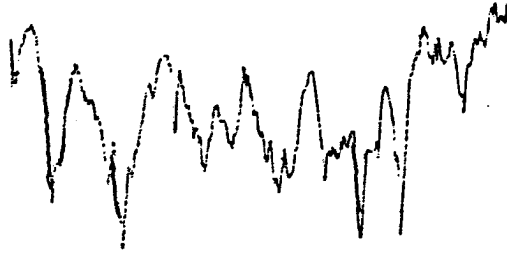
7 D J21



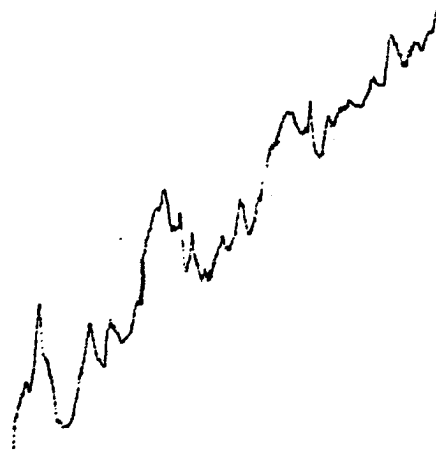
Sujet n° 8 :

Peau plus régulière avec diminution de L :

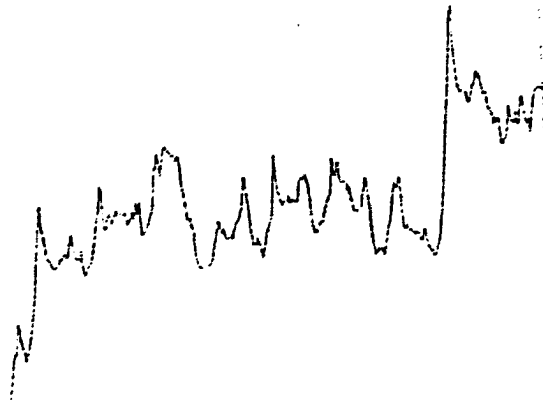
8 D Jo



8 D J14



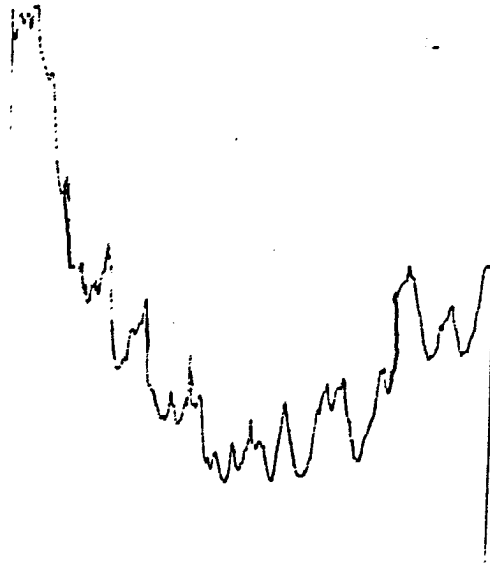
8 D J21



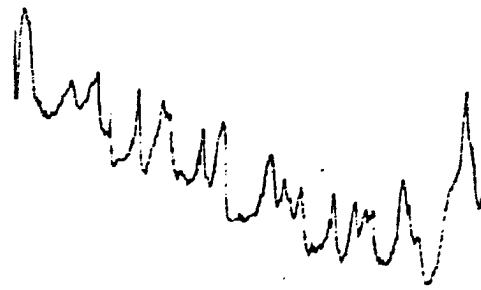
Sujet n° 9 :

à J14 : Diminution de L, augmentation de n plus net

9 D Jo



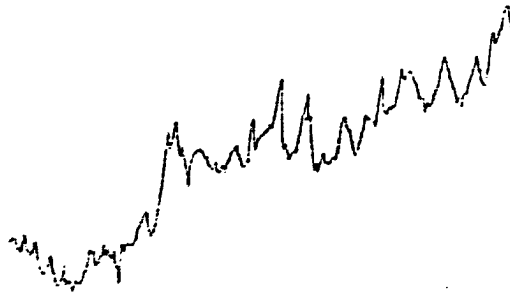
9 D J14



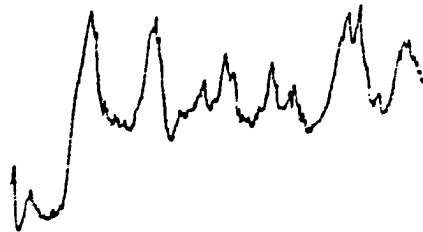
Sujet n° 10 :

Augmentation de n plus net à J 14 :

10 D Jo

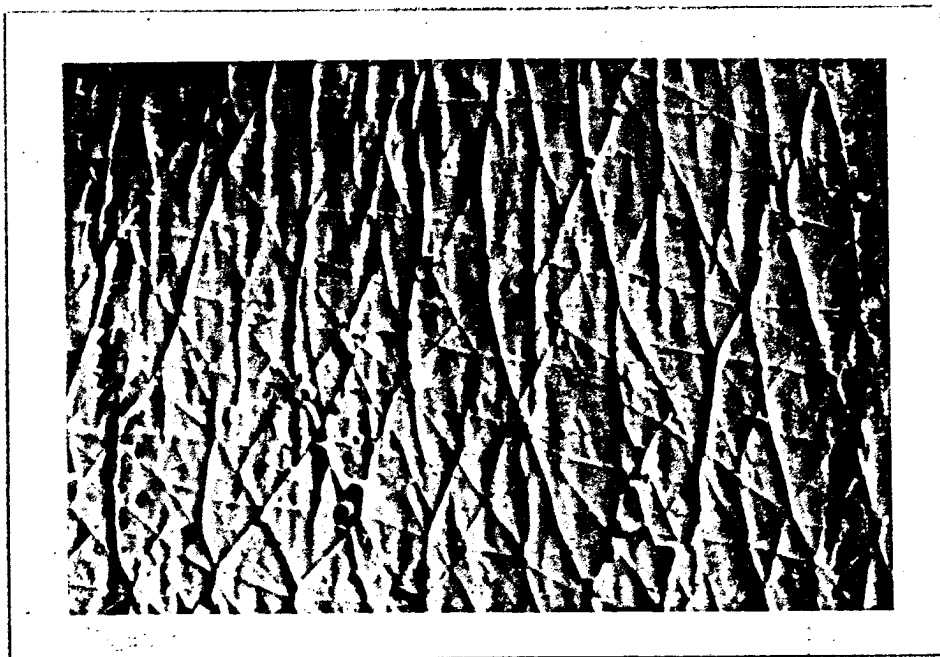


10 D J14

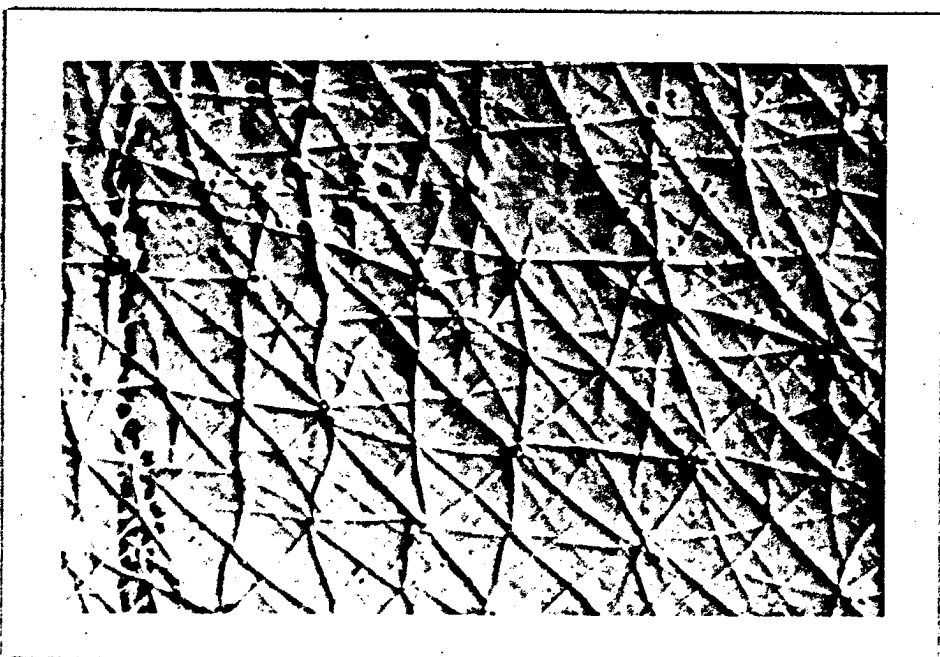


De même, nous aurions pu réaliser une analyse macrophotographique sur les contre-empreintes avec un grossissement de 10 en photographie Polaroid.

Les deux photos suivantes montrent, au temps zéro et après un certain nombre d'applications d'une crème active, l'effet restructurant sur le réseau microdépressionnaire de la peau, confirmant les résultats de l'étude profilométrique correspondante.



Temps zéro



Après X applications

Ces différentes études :

- base - main nue témoin
- crème à l'extrait de Sargasse - base
- crème à l'extrait d'Undaria - base

nous amènent à conclure de la façon suivante :

- la crème de base a une bonne efficacité sur la main traitée par rapport à la main témoin (Tableaux I, I bis, II)
- la crème à base d'extrait de Sargasse ou à l'extrait d'Undaria ne semble pas, dans nos conditions expérimentales, nettement plus efficace que la base choisie.

Cependant, l'observation approfondie des profils permet une régularisation de l'état de surface de la peau avec resserrement du grain de peau se traduisant par une diminution de L et un réseau plus fin se traduisant par une augmentation de n.

Une cure de 14 jours semble plus efficace que 21 jours ce qui est souvent le cas en cosmétologie, car il vaut mieux réaliser deux cures successives courtes qu'un traitement mené trop longtemps.

L'effectif de la population traitée n'était peut être pas assez important pour que les résultats soient significatifs ; par ailleurs, il serait intéressant de réaliser une autre expérimentation : crème Sargasse par rapport à une main non traitée.

N.B. : Nous prévoyons, dans notre recherche ultérieure, de réaliser une crème plus riche en extrait de Sargasse et testée comme crème active par rapport à une main témoin.

CONCLUSION :

Cette première approche de la valorisation cosmétique de l'algue Sargasse montre différentes voies à développer après ces travaux de recherche préliminaires :

- crème gommante,
- dentifrice,
- crème traitante.

De nouvelles formulations et surtout des tests d'efficacité systématiques sont à mener impérativement pour conforter ces idées de développement cosmétique.

TABLEAU I : INDICES CUTANES - MAIN DROITE

Main droite : Base
Main gauche : témoin

Réf.	0			14			21		
	L	n	L/n	L	n	L/n	L	n	L/n
MARG	32	17	1,882	30	17	1,765	32	20	1,60
DET F.	35	17	2,058	30	16	1,875	35	16	2,187
DET A.	39	19	2,052	30	15	2,000	31	19	1,632
AUL	35	15	2,333	30	14	2,143	28	18	1,556
MON	32	15	2,133	37	20	1,850	30	21	1,428
SEG	33	15	2,20	22	13	1,692	33	20	1,650
SIN	41	17	2,412	30	16	1,875	37	16	2,312
LEM	39	16	2,437	27	15	1,80	34	18	1,889
GUI	35	16	2,187	40	15	2,667	27	17	1,588
CHA	27	15	1,80	25	14	1,786	27	17	1,588
CENTRE ATLANTIQUE D'ETUDES EN COSMETOLOGIE									
Pr. Y. DE ROECK-HOLTZHAUER									

TABLEAU I Bis - INDICES CUTANES - MAIN GAUCHE

Main droite : base
Main gauche : témoin

Réf.	0			14			21		
	L	n	L/n	L	n	L/n	L	n	L/n
MARG	30	14	2,143	31	13	2,384	27	15	1,80
DET F.	33	16	2,062	27	17	1,588	35	18	1,94
DET A.	32	16	2,00	35	12	2,917	31	14	2,21
AUL	28	15	1,867	31	14	2,214	27	16	1,680
MON	35	17	2,058	32	17	1,882	42	15	2,80
SEG	31	15	2,066	32	13	2,461	32	16	2,0
SIN	40	16	2,50	26	16	1,625	32	16	2,0
LEM	40	16	2,50	34	14	2,428	41	16	2,56
GUI	40	16	2,50	40	17	2,353	44	15	2,93
CHA	30	16	1,875	30	20	1,50	33	17	1,94
CENTRE ATLANTIQUE D'ETUDES EN COSMETOLOGIE									
Pr. Y. DE ROECK-HOLTZHAUER									

TABLEAU II

TEST DE WILCOXON

Réf.	D				G			
	(L/n) _o	(L/n) ₂₁	CR _d	Rang d	(L/n) _o	(L/n) ₂₁	CR _g	Rang g
MARG	1,882	1,60	0,150	12	2,143	1,80	0,160	13
DET F.	2,058	2,187	-0,063	4	2,062	1,944	0,057	9
DET A.	2,052	1,632	0,205	15	2,00	2,214	-0,107	3
AUL	2,333	1,556	0,333	20	1,867	1,687	0,096	10
MON	2,133	1,428	0,331	19	2,058	2,80	-0,360	1
SEG	2,20	1,650	0,250	17	2,066	2,0	0,032	7
SIN	2,412	2,312	0,042	8	2,50	2,0	0,200	14
LEM	2,437	1,889	0,225	16	2,50	2,562	-0,025	6
GUI	2,187	1,588	0,274	18	2,50	2,933	-0,173	2
CHA	1,80	1,588	0,118	11	1,875	1,941	-0,035	5
<u>TOTAL DES RANGS</u>				140				70
CENTRE ATLANTIQUE D'ETUDES EN COSMETOLOGIE								
Pr. Y. DE ROECK- HOLTZHAUER								

TABLEAU III - INDICES CUTANES - MAIN DROITE

Main droite : crème à la Sargasse
Main gauche : base

Réf.	0			14			21		
	L	n	L/n	L	n	L/n	L	n	L/n
1	50	17	2,941	34	17	2,0	39	18	2,166
2	37	17	2,176	30	14	2,142	22	16	1,375
3	34	18	1,889	27	17	1,588	26	14	1,857
4	50	18	2,778	26	15	1,733	38	15	2,533
5	32	16	2,00	25	16	1,562	54	15	3,60
6	62	17	3,647	29	14	2,071	44	16	2,750
7	37	16	2,312	28	17	1,647	28	16	1,750
8	53	20	2,650	29	15	1,933	33	17	1,941
9	37	16	2,312	40	17	2,353	25	17	1,470
10	32	16	2,0	36	16	2,25	32	16	2,0
CENTRE ATLANTIQUE D'ETUDES EN COSMETOLOGIE									
Pr. Y. DE ROECK-HOLTZHAUER									

TABLEAU III BIS

INDICES CUTANES - MAIN GAUCHE

Main droite : crème à la Sargasse
Main gauche : base

Réf.	0			14			21		
	L	n	L/n	L	n	L/n	L	n	L/n
1	45	17	2,647	33	20	1,736	39	15	2,50
2	42	16	2,625	25	12	2,083	36	20	1,70
3	24	12	2,0	24	15	1,60	33	13	2,585
4	43	20	2,15	35	17	2,058	42	16	2,620
5	33	17	1,941	37	17	2,176	21	16	1,31
6	56	18	3,111	36	16	2,250	39	18	2,16
7	40	17	2,353	23	12	1,916	28	15	1,867
8	45	16	2,812	32	16	2,0	31	18	1,72
9	36	16	2,25	36	18	2,00	32	16	2,00
10	34	17	2,0	30	15	2,00	31	16	1,933
CENTRE ATLANTIQUE D'ETUDES EN COSMETOLOGIE									
Pr. Y. DE ROECK-HOLTZHAUER									

TABLEAU IV -

TEST DE WILCOXON

Réf.	D				G			
	(L/n) _o	(L/n) ₂₁	CR _d	Rang d	(L/n) _o	(L/n) ₂₁	CR _g	Rang g
1	2,941	2,166	0,263	13	2,647	2,60	0,018	6
2	2,176	1,375	0,368	5	2,625	1,80	0,314	16
3	1,889	1,857	0,017	5	2,0	2,538	-0,269	2
4	2,778	2,533	0,088	8	2,150	2,625	-0,221	3
5	2,0	3,60	-0,80	1	1,941	1,312	0,629	20
6	3,647	2,750	0,246	12	3,111	2,167	0,303	15
7	2,312	1,750	0,243	11	2,353	1,867	0,206	10
8	2,650	1,341	0,267	14	2,812	1,722	0,388	19
9	2,312	1,470	0,364	17	2,250	2,0	0,111	3
10	2,0	2,0	0	4	2,0	1,938	0,031	7
<u>TOTAL DES RANGS</u>				103				107
CENTRE ATLANTIQUE D'ETUDES EN COSMETOLOGIE								
Pr.Y. DE ROECK- HOLTZHAUER								

TABLEAU V - INDICES CUTANES - MAIN DROITE

Main droite : crème à l'Undaria
Main gauche : base

Réf.	0			14			21		
	L	n	L/n	L	n	L/n	L	n	L/n
LES	50	18	2,778	35	17	2,058	26	16	1,625
DEL	35	15	2,333	37	16	2,312	45	19	2,368
CAM	32	17	1,882	27	16	1,687	26	15	1,733
ZOU	28	16	1,75	27	15	1,80	25	15	1,667
NKO	35	19	1,842	35	20	1,75	39	20	1,95
NIA	42	20	2,10	27	18	1,50	42	17	2,470
CIS	41	20	2,05	22	16	1,375	23	15	1,533
TIF	48	20	2,46	38	16	2,375	35	20	1,75
SAI	43	18	2,389	39	16	2,437	32	18	1,778
CHA	38	18	2,111	28	13	2,154	55	13	4,23
CENTRE ATLANTIQUE D'ETUDES EN COSMETOLOGIE									
Pr. Y. DE ROECK-HOLTZHAUER									

TABLEAU V BIS - INDICES CUTANES - MAIN GAUCHE

Main droite : crème à l'Undaria
Main gauche : base

Réf.	0			14			21		
	L	n	L/n	L	n	L/n	L	n	L/n
LES	49	19	2,579	30	17	1,765	32	15	2,133
DEL	50	16	3,125	30	18	1,667	41	15	2,733
CAM	32	16	2,0	22	12	1,833	22	14	1,571
ZOU	37	15	2,467	20	13	1,538	38	15	2,533
NKO	40	19	2,105	63	18	3,50	34	20	1,70
NIA	41	19	2,157	30	15	1,667	37	16	2,312
CIS	40	16	2,50	28	14	2,0	24	15	1,60
TIF	35	14	2,50	37	15	2,467	38	18	2,111
SAI	38	17	2,235	42	17	2,470	41	17	2,412
CHA	37	16	2,312	43	17	2,529	42	15	2,80
CENTRE ATLANTIQUE D'ETUDES EN COSMETOLOGIE									
Pr. Y. DE ROECK-HOLTZHAUER									

TABLEAU VI -

TEST DE WILCOXON

Réf.	D				G			
	(L/n) _o	(L/n) ₂₁	CR _d	Rang d	(L/n) _o	(L/n) ₂₁	CR _g	Rang g
LES	2,778	1,625	0,415	20	2,579	2,133	0,173	13
DEL	2,333	2,368	-0,015	8	3,125	2,733	0,125	11
CAM	1,882	1,733	0,079	10	2,0	1,571	0,215	15
ZOU	1,750	1,667	0,047	9	2,467	2,533	-0,027	7
NKO	1,842	1,950	-0,059	6	2,105	1,70	0,192	14
NIA	2,10	2,47	-0,176	3	2,157	2,312	-0,072	5
CIS	2,05	1,533	0,252	16	2,50	1,60	0,360	19
TIF	2,4	1,750	0,271	18	2,50	2,111	0,156	12
SAI	2,389	1,778	0,246	17	2,235	2,412	-0,079	4
CHAR	2,111	4,230	-1,004	1	2,312	2,80	-0,211	2
<u>TOTAL DES RANGS</u>				108				102
CENTRE ATLANTIQUE D'ETUDES EN COSMETOLOGIE								
Pr.Y. DE ROECK- HOLTZHAUER								

CONCLUSION GENERALE DU CONTRAT SARGASSUM

En conclusion de l'étude qui nous a été confiée par IFREMER sur la teneur en vitamines et les possibilités de valorisation cosmétique de l'algue "Sargassum muticum", nous soulignerons plusieurs points qui ont été développés dans ce travail.

1) La détermination de la teneur en vitamines d'une algue donnée est un travail de longue haleine qui nécessite :

- une matière première conservée convenablement jusqu'à son analyse et le cryobroyage immédiat est une première réponse à ce problème. Dans certains cas, il faudra aller jusqu'à la lyophilisation de l'algue aussitôt après sa cueillette ce qui pose problème puisqu'il n'existe pas, à notre connaissance, d'installation de lyophilisation en France en zone côtière.
- des méthodes extractives spécifiques à chaque type de vitamine.
La méthode originale mise au point pour l'extraction de la vitamine K est un exemple de ce type de recherche pointue à mener vitamine par vitamine.
- des méthodes de détection par HPLC sur colonnes spécifiques permettant une évaluation très fine de très faibles quantités de vitamine, de l'ordre de 100 ppm.
- la richesse en vitamine C et K doit permettre des applications intéressantes en cosmétologie et en pharmacie, tandis que l'on recherchera la teneur en tannins, anthocyanes, coumarine...

2) Un certain pouvoir bactériostatique de l'extrait alcoolique de Sargasse serait à évaluer plus précisément, à un moment où l'on recherche des conservateurs naturels pour maintenir la propreté des produits cosmétiques au cours de leur stockage et de leur utilisation.

3) La poudre de Sargasse a un pouvoir gommant et abrasif à exploiter plus précisément dans des masques, crèmes gommantes et dentifrices, avec le souci d'une matière première correctement micronisée.

4) L'extrait d'algue Sargassum pourrait être incorporé dans des cosmétiques de soins, type lait ou crème, avec une expérimentation plus ample permettant de suivre l'évolution de l'état de surface cutanée, lors d'une utilisation en cure ponctuelle de ces types de cosmétiques.

Par cette recherche fondamentale, nous avons pu établir les taux des différentes vitamines présentes dans Sargassum muticum, richesse qui ne demande qu'à trouver son exploitation industrielle.

Par ailleurs, notre étude de screening cosmétique a montré différentes applications et utilisations possibles de cette algue, qu'il conviendra de développer.

Donc une étude longue mais très positive à poursuivre le plus rapidement possible pour valoriser cette matière première encore insuffisamment exploitée.

De Rouilhé

SARGASSUM MUTICUM : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 . ABADI, KOSHAK, ADRESI, MOHAMMAD :
Evaluation of carotene in a variety of Iranian carrot in conformity with the vitamin A content.
Sc. Pharm. Univ., 1977, Teheran, Iran
- 2 . ANONYME :
Dreying reagents for thin layer chromatography.
Merck.
- 3 . ALAN T., CRITCHLEY :
Sargassum Muticum : a morphological description of european material
J. Mar. Biol. Ass. U.K., 1983, 63, pp 813-824
- 4 . APRYDE, GILBERT M.T. :
Application of HPLC
Chapman and Hall, pp 163-167
- 5 . ASHWORTH M. :
R.F. Thin layer chromatography : a laboratory handbook.
Springer Verlag Berlin - Heidelberg New-York
- 6 . BJORNLAND TERJE :
Chlorophyll A and carotenoids of five isolated of Red Algae Antithamnion plumula.
Biochemicals Systematics and Ecology, 1983, Vol. II n° 2, pp 73-76
- 7 . BJORNLAND TERJE :
Chlorophyll A and carotenoids of Red Algae Erythrotrichia carnea.
Biochemicals Systematics and Ecology, 1984, Vol. 12 n° 3, pp 279-283
- 8 . BJORNLAND TERJE and TANGEN K. :
Observations on pigments and morphology of Gyrodinium aureolum (hulburt), a marine dinoflagellate containing I9'hexanoyloxyfucoxanthin as the main carotenoids.
Journal of Plancton Research, 1981, Vol. 3 n° 3
- 9 . BJORNLAND TERJE :
Chlorophylls and carotenoids of the marine algae Eutreptiella gymnastica.
Phytochemistry, 1982, Vol. 21, n° 7, pp 1715-1719
- 10 . BRITTON G., GOODWIN T.W. :
Vit. A, Biosynthesis of carotenoids - Methods in enzymology
Vitamins and Coenzymes, 1971, Vol. 28, Part C, pp 654-706

- 11 . CHAPMAN V.J. and CHAPMAN D.J. :
 "Seaweeds and their uses"
 3 Ed. London 1980
- 12 . CHARITE, KHAUSTROV :
 Bioch. J., 1934, t. 29, p. 35
- 13 . Congrès - Assemblée plénière Commission internationale pour l'exploration scientifique de la Méditerranée. Lucerne, Suisse, Octobre 1984 : BELSHERT., BUDOURESQUE C.F., DAVID P., LAURET M., RIOUALL R., PELLEGRINI M. :
 L'envahissement de l'étang de Thau (France) par la grande phaeophyceae *Sargassum Muticum*
- 14 . DAS GUPTA V., CADWALLADER D.E. :
 Vit. B₁: Acid Dye Method for the Analysis of Thiamine, 1970, Part A, pp 73-90
- 15 . DELUCA H.F., BLUNT J.W. :
 Vitamin D, Part C, pp 709-746
- 16 . DEYMIE, MULTON, SIMON :
 Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires
 Vol. 4, pp 243-263
- 17 . DRUJAN Boris D. :
 Determination of Vitamin A, Method in enzymology
 Part C, pp 565- 591
- 18 . EUJIHARA M., IIZINA N., YAMAMOTO I., NAGERMO T. :
 "Purification and chemical and physical characterisation of an antitumor polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum Fulvellum*"
 Carbohydr. Res., 1984, Vol. 125 (1), pp 97-106
- 19 . FAZEKAS ARPAD G., KAPOLY KOKAI :
 Vit. B₂: Extraction, purification and separation of Tissue Flavins for Spectrophometric Determination, 1971, Part B, pp 385-452
- 20 . FOGG G.E. :
 The extracellular products of algae
 Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., 1966, Vol. 4, pp 195-212
- 21 . GIRARD Professeur :
 Anonyme, *Sargassum Muticum*
 "Approche chimique et recherche de composés d'intérêts biologiques"
 Rapp. Lab. Chim. Org., Lab. Mat. Méd., ER Sc., Pharm. Montpellier,
 1984, p. 19

- 22 . GLOMBITZA K.W., FOSTER M., FARNHAM W.F. :
 Antibiotics from Algae Part 25
 Polyhydroxyphenyl Ethers from the Brown Algae *Sargassum Muticum*
 (Yends) Fensholt, Part II,
 Botanica Marina, 1982, Vol XXV, pp 449-453
- 23 . GOODWIN T.W., BRITTON G. :
 Methods in enzymology Biosynthesis of carotenoids.
 Vitamins and coenzymes, 1971, Vol. 28, Part C, pp 654-706
- 24 . GORHAM J., LEWEY S.A. :
 Seasonal changes in the chemical composition of *Sargassum Muticum*
 Marine Biology, 1984, 80, pp 103-107
- 25 . GUVEN K.C., GUVEMER B., CIRIK S. :
 "Extraction and separation of Vitamin B₁₂
 Marine Algae, pp 81-92
- 26 . HENSHALL, ALAN :
 New approaches to HPLC method development in the food and beverage industry.
 Liq. Chromatograph. Anal. Food Beverages , 1979, Vol. I
 Edited by Charalambous George Academic New York, pp 31-48
- 27 . HEROSHIMA, OSAMU, ABE, KOUICHI, IKENOIA and coll. :
 Determination of phyloquinone-2-3-epoxide and menaquinone-4-2-3-epoxide
 in biological materials by HPLC and fluorimetric methods.
 Yakugaku Zasshi, 1979, Vol. 99, (10) pp 1007-1013
- 28 . HEULBRON I.M., PARRY E.G., PHIPERS R.F. :
 Bioch. J., 1935, t. 29, p 1382
- 29 . HORTS, SHEPARD, JORGENSEN., DE LUCA :
 Assays for vitamin D and its metabolites
 Proc. Workshop Vitam. D, 4th Vitamin D Basic Res. Its clin. Appl., 1979
 pp 213-220
- 30 . JORTON J.A. :
 The growth and development of *Sargassum Muticum* (Yends) Fensholt
 J. exp. Mar. Biol. Ecol., 1977, 26, pp 41-53
- 31 . JORTON J.A. :
 The resistance to dislodgement of *Sargassum Muticum* gemmlings under defined
 hydrodynamic conditions
 J. Mar. Biol. Ann. U.K., 1983, 63, pp 181-193

- 32 . JORTON J.A., JETTER R. :
The settlement of Sargassum Muticum propagules in stationary and flowing water
J. Mar. Biol. Ann. U.K., 1981, 61, pp 929-940
- 33 . KAMMAN, LABUZA, WARTHESEN :
Thiamin and Riboflavin analysis by HPLC
Journal food Science, 1980, Vol. 45, n° 6, pp 1497-1504
- 34 . KANAZAWA A. :
Vitamins in Algae
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 1963, Vol. 29, pp 713-731
- 35 . KOZIOL, JACECK :
Fluorometric Analysis of Riboflavin and its coenzymes
Method in enzymology, 1971, Part B, pp 253-290
- 36 . KRAYNER-TOTH, MARTA, FUCHA :
HPLC determination of Vitamins
Intez. K kozl., 1980, Vol. 20 (hongrois) pp 31-41
- 37 . KWOK, RODERIC, ROSE, TABOR, RICK :
Simultaneous determination of vitamins B₁, B₂, B₆ and niacinamide in multi-vitamin pharmaceutical preparation by paired-ion reversed phase HPLC;
Journal Pharmaceutique Sciences, 1981, Vol. 70, n° 9, pp 1004-1017
- 38 . LAIDMAN D.L., GAUNT J.K., HALL G.S., BROAD O.T. :
Extraction of tocopherols from plants tissues.
Methods in enzymology. 1979, Vol. 18, Part C, Vitamins and coenzymes, pp 366-403
- 39 . LAIDMANN D.L., GAUNT J.K., HALL G.S., BROAD O.T. :
Absorption Column Chromatography of Tocopherols
Part C, pp 242-243 et 349-365
- 40 . LEVRING, HOPPE, SCHMID :
Marin Algae, 1969, p 421
- 41 . LEWEY S.A., GORHAM J. :
"Pigment composition and photosynthesis in Sargassum Muticum"
Mar. Biol., 1984, Vol. 80 (1), pp 109-115
- 42 . LIU C.Y. :
"Quality improvement of algin from Sargassum"
Proceed of Rep. of China U.S. Cooperative Science Seminar on cultivation and utilization of economic algae
Eds Tsuda, R.T., Chiang Y.M., Pulel Luy, Chiu of Guann
Marine Lab., Mangilao, 1982, 61-64, pp 51-53

- 43 . LIU C.Y., TSAI S.M., YANG S.S. :
"Total utilization of Sargassum produced in Taiwan"
Bull. Mar. Sci., 1983, 33(3), p. 780
- 44 . LOEWUS F., BAIG M.M. :
Biosynthesis and Degradation of Isotopically
Labeled A scorbic Acid (Plants), Part A, pp 22-28
- 45 . MACKAY, CHRISTEN, TILLMANN, BURNS :
Determination of vitamin D2 in multivitamin tablets by HPLC,
Analyst London, Vol. 104, n° 1240, pp 626-636
- 46 . MACLEOD, WIGGINS :
HPLC examination of vitamin A and D products.
Proc. Anal. Div. Chem. Soc., 1978, Vol. 15 n° 12, pp 329-332
- 47 . MAYER H., ISLER O. :
Isolation of Vitamin K
pp 469-479
- 48 . NURRIS R.E., SIMEON M.K., WILLIAMS H.B. :
J. Nurih., 1977, t. 13, p 425
- 49 . NAKAMURA, HISAO, INOUE, HIROSHI :
Determination of water-soluble vitamins by HPLC
Koshien Daigaku Kiyo, 1976, Vol. 5, pp 1-6
- 50 . ORHAM J., LEWEY S.A. :
Seasonal changes in the chemical composition of Sargassum Muticum
Mar. Biol., 1984, 80, pp 103-107
- 51 . PELLIGRINI M. :
Contribution à l'étude chimique des algues Méditerranéennes. Composition
en acides aminés du Callithamnion granulatum (Ducluzeau)
C. Agardl, Ann. Fac. Sci. Marseille, 1967, 39, pp 163-171
- 52 . PELLEGRINI M. :
Contribution à l'étude chimique des algues Méditerranéennes (fraction azotées-
acides aminés protidiques).
Thèse de spécialité, Marseille, Mai 1968
- 53 . RANDEPATH KURT :
Chromatographie couche mince
pp 186-190

- 54 . SHARKA, BEIZETSEROVA, RADEJOVA :
Isolation and determination of some B vitamins in extracts from corn and wheat sprouts.
Farm. Obs., 1976, Vol. 45, n° 4, pp 161-164
- 55 . SHEPPARD A.J. :
Gas chromatography of vitamin K1
Method in enzymology, Vol. XVIII, Part C, pp 461-464
- 56 . SHEPPARD A.J., HUBBARD W.D. :
Gas chromatography of Panthotenic acid.
Method in enzymology, 1970, Part A, pp 311-314
- 57 . SHEPPARD A.J., PROSSER A.R. :
Vit. B3, Gas chromatography of Niacin, Part B
- 58 . SIVA CELIO LOPES, IONEDA THUIOSHI :
Isolation and identification of menaquinone and acylglycerols in the acetone-soluble lipids from Nocardia Rhodochrons.
Rev. Microbiol. 1977, 8 (2), pp 39-42
- 59 . STEWART W.D.P. :
Algal physiology and Biochemistry
Botanical Monographs, Vol. 10, p 989
- 60 . SUY E., HUANG J.H., LING Y.E., CHEN F.A. :
"Pharmacological properties of some Taiwan seaweeds"
pp 51-53
- 61 . THRELFALL D.R., WHISTANCE :
Biosynthesis of Phylloquinone,
pp 559-562
- 62 . VANDERLICE, JOSEPH, MAIRE DOHERTY :
Sulfosalicylic acid as an extraction for vitamin B6 in food
Journal Agric. Food Chem., 1980, Vol. 28, n° 6, pp 1145-1149
- 63 . VAN ECKELON, EMMERIC :
Chem. zentr., 1936, t. 1, p 1650
- 64 . WALTER DE GRUYTER et co :
. Studies on the recently Introduced Brown Algae Sargassum Muticum (Yends) Fensholt, Botanica Marina, 1980, Vol. 23, pp 425-432
. Studies on the recently Introduced Brown Algae Sargassum Muticum (Yends) Fensholt, Botanica Marina, 1975, Vol. 18, pp 149-156

- 65 . WALTER DE GRUYTER - Berlin - New-York - :
"Marine Algae in Pharmaceutical Science"
Ed. Heinz A.HOPPE, T. LUVRING, Y. TANKA
- 66 . WHYTE J.N.C., ENGLAR J.R. :
Sargassum Muticum : analysis of Inorganic and Organic Bound Arsenic in
Marine Brown Algae
Botanica Marina, 1983, Vol. 26, pp 159-164
- 67 . WILLS, SHAW, DAY :
Analysis of water soluble vitamins by HPLC
Journal Chromato. Sciences, 1977, Vol. 15, n° 7, pp 262-266
- 68 . WITHERS R.G. and al. :
The epibiants of Sargassum Muticum in British waters,
Mar. Biol., 31, pp 79-86