

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

People's Democratic Republic of Algeria

The Minister of Higher Education and Scientific Research

†.⊙∧.∪ξ†.⊖:⊗∕⊖⊖:‡∑.∫∧ ∣†∩⊙∣.

ABOU BEKR BELKAID UNIVERSITY

TLEMCEM

FACULTY OF MEDICINE- Dr. B. BENZERDJEB

PHARMACY DEPARTMENT



جامعة أبو بكر بلقايد - تلمسان

كلية الطب - د. ب. بن زرجب

قسم الصيدلة

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES POUR
L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

THÈME :

**Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus
aurantium L.* sous sa forme libre et encapsulée**

Présenté par :

DAHMANI Sanaa

AHLOULI Nour El Houda

Soutenu le

03/06/2024

Jury

Président :

Dr. KENNICHE.A

Maitre de conférence classe A en chimie thérapeutique et
bioorganique

Membres :

Dr. EL YEBDRI. N

Maitre de conférence classe B en pharmacognosie

Dr. BENMEDDAH.S

Maitre-Assistante Hospitalo-Universitaire en Parasitologie

Encadrant :

Dr. BAGHLI. F

Maître-Assistante en pharmacie galénique

Année universitaire : 2023-2024

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dédicaces

الحمد لله على نعمة الإنجاز، والحمد لله عند البدء وعند الثمام

Ce travail symbolise la fin d'une étape précieuse de nos vies. Ces six années ont été remplies d'expériences enrichissantes, de labeur acharné et d'une montagne d'émotions partagées.

Avec beaucoup d'affection, je dédie ce travail et ces six années d'études à mes chers parents.

Mama, je me sens incroyablement chanceuse d'avoir été élevée par une femme incroyable comme toi. Tu es pour moi le symbole vivant de l'adoration maternelle et de la tendresse infinie. Tu m'as transmis tout ce que je souhaite transmettre à mon tour.

Papa, tes qualités exceptionnelles te rendent cher à tous. Tu as toujours été là pour m'encourager dans mon parcours d'études. Je te suis profondément reconnaissante pour la confiance que tu m'accordes et j'aspire à être digne de cette estime.

Papa, maman, vos prières sont exhaussées, me voilà en fin de cursus et cela n'aurait pas pu avoir lieu sans vous. Merci infiniment. Je vous aime.

À mes très chers frères et sœurs Mahieddine, Mehdi et Imene, je sais que la réussite de la petite dernière est très importante à vos yeux. Ce travail est aussi le vôtre.

À mes chères belles-sœurs Dyhia et Sihem, votre soutien constant est très précieux. Je vous en serai éternellement reconnaissante.

À mes petits neveux Assyl et Mohamed, qui éblouissent notre vie depuis leur existence.

À mes chers cousins et cousines : Samy, Amina, Asma, Lyna, Mohamed et Nesrine, je vous dédie ce travail en signe de ma profonde affection, en souvenir de notre indéfectible union forgée au fil du temps. Que Dieu nous garde toujours unis. Une dédicace particulière à ma future collègue, à qui je souhaite un parcours rempli d'expériences enrichissantes et une réussite emblématique.

À mes oncles et à ma chère tante Meriem ainsi qu'à l'ensemble des deux familles AHLLOULI et ABDOUN.

À ma très chère amie Nardjesse, que cette dédicace témoigne de tout l'amour que je porte pour toi tout au long de ces belles années que nous avons partagées ensemble.

À Youthink Family : Zineb, la voix de la sagesse et la source de délicatesse, Hocine, notre mentor, Zaki, l'ingénieur, Nadji l'inspirant, La douce Souha, Yasmine la warrior, El Hadi et ses gentil attention et Anes le nuage a fleur bleue. Partager cette expérience qui a métamorphosé ma vie estudiantine avec vous était une réelle bénédiction. Ce travail est aussi le vôtre.

À mes chers amis de promotion : Yousra, Izhar, Issam, Nazim, Sohaib, Rabie, Nabil, et Aymen. Tous ces moments vécus ensemble ont donné à ce parcours universitaire le goût d'une belle histoire à raconter. Je vous dédie ce travail qui symbolise l'accomplissement de ce récit.

À Tadjou, celle qui est là depuis le début de l'histoire. Sache que je crois fortement en toi et chez moi, t'aura toujours ta place, ma chère, car notre amitié vaut de l'or.

À Hadjer, on s'est connues qu'en fin de cursus mais tous les moments de joie parsemés de ton grain de folie ont forgé notre lien en peu de temps. Mes chères, je vous aime.

Dédicaces

« **Toute amour, toute amitié sincère est une histoire de transformation inattendue.** » Shams

À mon Shams, ma très chère binôme Sanaa DAHMANI, l'histoire de ma transformation t'en est grandement responsable et cela prouve que nous nous sommes aimés suffisamment. C'est l'impact de ta délicatesse sur ma mosaïque.

Je t'ai apprivoisée et tu es devenue pour moi unique au monde. Nous sommes devenus inséparables. On m'interroge souvent où est S quand je suis rarement que N. Ta présence à mes côtés tout au long de ce travail a rendu chaque moment plus précieux et chaque défi plus surmontable.

Je suis très fière et contente que tu fasses partie entière de mon histoire. Et j'en suis persuadée que tu seras de tous mes voyages.

Merci à tous

NOUR EL HOUDA AHLLOULI

Dédicaces

À toutes ces personnes qui m'ont marqué, telles des pièces précieuses d'une mosaïque.

Je dédie ce travail ainsi que ces six années de persévérance et de découvertes,

À mes parents ! À papa, qui m'as enseigné la valeur du travail acharné, de la résilience et m'a toujours enveloppé d'encouragements.

À maman, pour ta douceur et ton amour inconditionnel.

Vos sacrifices et votre soutien ont pavé le chemin de ma réussite, et je vous suis infiniment reconnaissante.

À mes sœurs, Hanane, ma source constante d'inspiration. Ton soutien et ta sagesse ont guidé chacun de mes pas.

Radja, pour ces éclats de rire partagés, ton humour et ta joie de vivre.

Tesnime, pour l'amour et la complicité que nous partageons, pour cette amitié qui transcende le temps et la distance.

À Abdennour, l'apprenti chimiste, dont la curiosité et la passion pour la science illuminent notre famille.

À Louai, qui remplit notre vie de joie !

À ma chère Zineb, une étoile qui a été là pour me guider et m'épauler depuis le tout début de ce parcours.

À Youthink family, merci pour les liens tissés, les événements organisés et les souvenirs partagés

À Zaki, Hocine, Nadji, Souha, Yasmine, Anes et Chawki, c'est grâce à vous que cette aventure a pris tout son sens. Même au seuil de la vie adulte, chaque réunion avec vous est une bouffée d'air frais.

À Leila, Boumediene, et Imad, mes chers amis du lycée, chacun de vous demeure gravé en moi, ce travail vous est dédié avec affection et gratitude.

À mes chers amis de la promotion, Yousra, Izhar, Ikram, Fadya, Nazim, Sohaib, Issam, Aymen et Nabil, merci d'avoir égayé ce chapitre de ma vie de vos rires et de votre amitié. Vous avez enrichi chaque instant de mon parcours, et je suis fière de chacun de vous !

À Tadjou et Hadjar, À celle dont la douceur reflète les vagues de la mer, et à celle dont la folie embrasse chaque aventure.

À tous mes enseignants, dont la passion pour l'enseignement a laissé une empreinte indélébile.

À ma binôme bien-aimée, Nour,

Je suis profondément reconnaissante que nos chemins se soient croisés, car en toi j'ai trouvé bien plus qu'une binôme, mais une amie précieuse, tout comme Shams à trouver son Rumi.

C'est ainsi que mon prénom résonnera toujours comme un synonyme du tien, un prénom que tu incarnes parfaitement, car ta présence a illuminé les moments sombres et a rendu les joies encore plus éclatantes.

Que notre complicité continue de fleurir et de nous guider vers de nouveaux horizons.

Avec tout mon amour

D.S

Remerciements

Nous rédigeons ces remerciements avec une immense gratitude qui nous habite le cœur envers Allah le tout puissant, qui nous a donné la santé, la force et le courage d'arriver à la fin de notre cursus et de mener ce travail de mémoire jusqu'au bout.

Nous tenons à témoigner notre reconnaissance aux personnes suivantes :

En premier à notre encadrante,

Docteur **BAGHLI. F**, nous vous admirons non seulement pour l'enseignante que vous êtes, mais aussi pour la femme remarquable et la mère dévouée que vous incarnez. Votre ambition et votre bienveillance sont une source d'inspiration pour nous. Nous vous remercions d'avoir toujours été présente lorsque nous avons besoin de vous, et d'avoir trouvé des solutions efficaces aux nombreux défis que nous avons rencontrés au cours de notre travail de mémoire.

Nous tenons aussi à exprimer notre reconnaissance et notre respect aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs recommandations,

À Docteur **KENNICHE. A** Directrice du Laboratoire de Recherche COSNA, pour nous avoir accueillis au sein de son laboratoire et qui nous fait l'honneur de présider notre jury. Nous lui exprimons notre reconnaissance et notre profond respect.

À Docteur **BENMEDDAH. S** qui nous fait l'honneur de participer à ce jury et de juger ce travail. Nous vous en remercions.

À Docteur **EL YEBDRI. N** de nous faire l'honneur de siéger parmi les membres de notre jury. Qu'elle trouve ici le témoignage de toute notre reconnaissance.

Nous exprimons aussi notre profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué dans la réalisation de ce travail

À **Yasmina** et **Amina** du laboratoire COSNA pour leurs aides et leurs bienveillances.

À **Dr BENAMMAR** du laboratoire LAMAAB d'avoir partagé ses connaissances avec nous, et de nous avoir orienté ainsi qu'à **Zahia** et **Nassima** de nous avoir dirigé et conseiller.

À nos collègues internes **Rym** et **Ismahene** avec qui nous avons bénéficié d'une précieuse entraide et d'un soutien mutuel tout au long de notre travail.

À toute l'équipe de la Librairie **TABET : Adil, Aymen, Issam, Tonton Mohammed et Djalal** Pour votre aide précieuse et votre bienveillance constante à notre égard. Vous avez simplifié tellement de choses pour nous, et nous vous en sommes infiniment reconnaissantes.

Nous adressons un remerciement particulier à l'école **DAHLIAS INSTITUTE**, sous la direction bienveillante de la famille **CHOUKCHOU-BRAHAM**, pour nous avoir constamment ouvert les portes de leur établissement. Ce lieu est devenu pour nous un véritable refuge et un foyer chaleureux. L'altruisme et la générosité dont vous faites preuve incarnent des valeurs inestimables et précieuses à nos yeux.

Nous tenons aussi à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à la réussite de ce travail, et que nous aurions omis de mentionner.

Table des matières

Dédicaces	I
Remerciements	IV
Table des matières	V
Liste des Figures	IX
Liste des Tableaux.....	XI
Liste des abréviations.....	XII
Introduction	1
Partie Théorique.....	4
Chapitre I : Bigaradier	5
I. Les agrumes :.....	6
II. Bigaradier <i>Citrus aurantium</i>.....	6
II.1. Description :.....	6
II.2. Utilisation :.....	7
III. Huile essentielle :	8
III.1. Qu'est-ce qu'une huile essentielle ?	8
III.2. Huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i> :.....	9
III.2.1. Huile essentielle d'orange amère (<i>Citrus aurantium L.</i>)	9
III.2.2. Huile essentielle de <i>Néroli</i> (<i>Citrus aurantium L.</i>)	10
III.2.3. Huile essentielle de petit grain bigarade (<i>Citrus aurantium L.</i>)	10
III.3. Méthodes d'extraction des huiles essentielles :	12
III.3.1. Hydrodistillation :.....	12
III.3.2. Entraînement à la vapeur d'eau :	13
III.4. Toxicité des huiles essentielles :	14
Chapitre II : Peau.....	16
I. La peau :.....	17
II. Types et organisation générale de la peau :	17
II.1. L'épiderme :.....	18
II.2. Jonction dermoépidermique :.....	18
II.3. Le derme :	19
II.4. Hypoderme :.....	19
II.5. Le stratum corneum :	20
III. Perméation cutanée :	21
III.1. Les voies du passage transcutané :.....	21
III.1.1. La voie intercellulaire :.....	22
III.1.2. La voie transcellulaire :	22
III.1.3. La voie pilo-sébacée :	22
III.2. Facteurs influençant l'absorption transcutanée :	23

Table des Matières

III.2.1. Influence des facteurs biologiques liés à la peau :.....	23
III.2.2. Influence des caractéristiques physico-chimiques de la molécule :	23
III.2.3. Influence de la forme galénique et des excipients :.....	24
Chapitre III : Candida Albicans	25
I. Epidémiologie :	26
II. Candida albicans :.....	26
II.1. Classification :	26
II.2. Morphologie :.....	27
III. Types de candidose :.....	28
III.1. Candidose invasive :	28
III.2. Candidose superficielle :.....	28
IV. Traitement :.....	29
IV.1. Les Inhibiteurs de la biosynthèse des acides nucléiques :	31
IV.1.1. La flucytosine :	31
IV.2. Antifongiques agissant sur l'ergostérol et sa biosynthèse :.....	31
IV.2.1. Les azolés :	31
IV.2.2. Les Polyènes :.....	32
IV.2.3. Autres :	32
IV.3. Inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi cellulaire :.....	33
IV.3.1. Les échinocandines :.....	33
V. Résistance :.....	33
Chapitre IV : Ethosomes	36
I. Nanotechnologie	37
II. Les nanopORTEURS :	37
III. Ethosomes :	39
III.1. Définition :	39
III.2. Types et structure d'éthosomes :.....	40
III.3. Mécanisme de pénétration :	43
III.3.1. Avantages et inconvénients :.....	45
Partie Pratique.....	47
Matériels et méthodes	48
I. Matériels, matières biologiques et produits chimiques utilisés :.....	49
I.1. Matériels :	49
I.1.1. Verreries et outillage :.....	49
I.1.2. Equipements :	50
I.2. Matériels biologiques :.....	51
I.2.1. Matériel végétal :.....	51
I.2.2. Les souches fongiques :.....	51
I.2.3. Milieux de culture :	52
I.2.4. Matières premières :	52
II. Méthodes :.....	52

Table des Matières

II.1.	Extraction des huiles essentielles :.....	52
II.1.1.	Extraction de l'HE de petit grain bigarade par entraînement à la vapeur d'eau : 52	
II.1.2.	Extraction de l'HE de petit grain bigarade par hydrodistillation :	53
II.1.3.	Détermination du rendement des différentes extractions :	54
II.2.	Analyse de l'huile essentielle des feuilles de Bigaradier :.....	55
II.2.1.	Caractéristiques organoleptiques :.....	55
II.2.2.	Propriétés physiques :.....	55
II.2.2.1.	Densité relative :	55
II.2.2.2.	Indice de réfraction :	56
II.2.3.	Propriétés chimiques :	57
II.2.3.1.	Indice d'acide :.....	57
II.2.3.2.	Indice d'ester :.....	57
II.2.3.3.	Indice de saponification :	58
II.3.	Evaluation de l'activité antifongique de l'HE de petit grain bigarade :.....	58
II.3.1.	Préparation des milieux :.....	59
II.3.2.	Mise en culture des souches :	59
II.3.3.	Préparation des suspensions fongiques :	60
II.3.4.	Méthodes d'étude du pouvoir antifongique des huiles essentielles :.....	60
II.3.4.1.	Diffusion sur milieu solide par la technique des puits :.....	60
II.3.4.2.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) :.....	61
II.4.	Préparation des éthosomes :.....	62
II.4.1.	Formulation des éthosomes :.....	62
II.5.	Mode opératoire :.....	63
II.5.1.	Préparation des éthosomes à blanc :.....	63
II.5.2.	Préparation des éthosomes en additionnant le cholestérol :	66
II.5.3.	Préparation des éthosomes classiques contenant HE de <i>Citrus aurantium</i> :...	67
II.6.	Caractérisation des éthosomes :.....	67
II.6.1.	Principe de système d'analyse Zetasizer :.....	67
II.6.2.	Efficacité d'encapsulation (EE%) :	68
II.7.	Evaluation de l'activité antifongique de l'HE de <i>Citrus aurantium</i> encapsulée en éthosome :	69
II.7.1.	Diffusion sur milieu solide par méthode des puits :	69
II.7.2.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) :	70
Résultat et discussion		71
I.	Extraction de l'HE de petit grain bigarade :	72
I.1.	Rendement :	72
I.2.	Résultat de l'analyse de l'HE des feuilles de <i>Citrus aurantium</i> :	72
I.2.1.	Caractères organoleptiques :	72
I.2.2.	Grandeurs physiques :	73
I.2.3.	Grandeurs chimiques :.....	74
I.2.3.1.	Indice d'acide :.....	75
I.2.3.2.	Indice d'ester :.....	75
I.2.3.3.	Indice de saponification :	76
I.3.	Evaluation de l'activité antifongique de l'HE :	76
I.3.1.	Diffusion sur milieu solide par la technique des puits :	77

Table des Matières

I.3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) :	78
I.4. Caractérisation des éthosomes :	79
I.4.1. Aspect des formulations éthosomales :	79
I.4.2. La taille des particules et le potentiel zéta :	80
I.4.2.1. Ethosomes à blanc :	80
I.4.2.2. Ethosomes additionnées de cholestérol :	81
I.4.3. Efficacité d'encapsulation :	81
I.5. Pouvoir antifongique de l'HE de petit grain bigarade encapsulée :	83
I.5.1. Diffusion sur milieu solide par la technique des puits :	83
I.5.2. Résultat de la CMI des formules éthosomales :	85
Conclusion Générale	86
Références Bibliographiques	88
Résumé :	95

Liste des Figures

Figure 1 : Systématique botanique de bigaradier	7
Figure 2 : Hydrodistillation appareil de Clevenger (18).	13
Figure 3 : (Gauche) Hydrodistillation à la vapeur (droite) Distillation à la vapeur.	14
Figure 4 : Structure de la peau (Laboratoires-Dermatologiques-Eucerin) (23).	17
Figure 5 : Illustration schématique de (a) Les trois couches de la peau et (b) la couche cornée (29).	21
Figure 6 : Les trois voies du passage transcutanée (23).	22
Figure 7 : Les transitions morphologiques, passant de la forme blastospore aux pseudo-hyphes et aux hyphes, sont réversibles (37).	27
Figure 8 : Les mécanismes d'action des agents antifongiques actuellement utilisés(40).	30
Figure 9 : Cibles principales et mode d'action de plusieurs agents antifongiques(35).	30
Figure 10 : Les trois principaux facteurs qui conduisent à la résistance clinique des antifongiques dans le traitement de la candidose superficielle (44).	35
Figure 11 : Les principaux types de nanosystèmes vésiculaires (53).	39
Figure 12 : Structure représentative de liposom et des différents types d'éthosomes.	41
Figure 13 : Représentation schématique du mécanisme de perméation cutanée des éthosomes (49).	45
Figure 14 : Arbre et feuilles de l'oranger amer.	51
Figure 15 : Appareil semi-industriel d'entraînement à la vapeur d'eau.	53
Figure 16 : Appareil d'hydrodistillation « dispositif de Clevenger ».	54
Figure 17 : Réfractomètre numérique modèle RX-5000i-plus ATAGO.	56
Figure 18 : Revivification des souches et leur incubation.	59
Figure 19 : Repiquage des souches sur boites de pétri.	60
Figure 20 : Résultat de mise en culture des souches isolées ATCC 1010, ATCC26, Cai.	76
Figure 21 : Mesure de la densité optique à l'aide du colorimètre.	60
Figure 22 : Préparation de la phase organique de la formule.	66
Figure 23 : Ultrasonication.	66
Figure 24 : Courbe d'étalonnage de l'HE de petit grain bigarade.	69
Figure 25 : Huile essentielle des feuilles de Citrus aurantium.	73
Figure 26 : Résultat de l'évaluation de l'activité antifongique par technique des puits.	77
Figure 27 : (gauche) : Aspect des formulations éthosomales à blanc.	79

Liste des Figures

- Figure 28:** Aspect des formules sur la ca26 et la ca10/10 qui n'ont montré aucune zone d'inhibition 83
- Figure 29 :** Effet des formules éthosomales F6, F7, F8, et F9 sur les souches de *C.albicans*. 84

Liste des Tableaux

Tableau I : Le risque de phototoxicité , l'irritation de l'huile non diluée, la DL50 aigue chez les lapins et les rats, et le niveau d'utilisation dermique maximal des HE de Citrus aurantium(13).	15
Tableau II : Différences entre les différents types d'éthosomes pour l'administration transdermique des médicaments(60).	42
Tableau III : Constituants des éthosomes et leurs intérêts.	43
Tableau IV : Composition des formulations à blanc.	65
Tableau V: Composition des éthosomes additionnés de cholestérol	67
Tableau VI: Concentration de l'HE dans les éthosomes classiques.....	67
Tableau VII: L'absorbance en fonction de la concentration des solutions.....	68
Tableau VIII: Résultats des rendements de l'extraction de l'huile essentielle des feuilles de Bigaradier par hydrodistillation et entrainement à la vapeur d'eau.	72
Tableau IX: Caractères organoleptiques de l'huile essentielle des feuilles de Citrus aurantium.....	73
Tableau X: Valeurs des grandeurs physiques.	73
Tableau XI: Résultats de quelques recherches précédentes sur l'huile essentielle du Citrus aurantium.....	74
Tableau XII: Valeurs des grandeurs chimiques.....	74
Tableau XIII: Diamètre en mm des zones d'inhibition vis-à-vis des trois souches de Candida albicans.....	77
Tableau XIV : La concentration minimale inhibitrice (CMI) de HECA contre les trois souches de Candida albicans.	78
Tableau XV: Résultats des mesures de la taille des particules et du potentiel zéta des formulations à blanc.	80
Tableau XVI: Résultat des mesures de taille des particules et le potentiel zéta des formulations additionnées de cholestérol	81
Tableau XVII : Les diamètres d'inhibition des formules éthosomales vis à vis CA10/10 et CA26.	84

Liste des abréviations

ATCC : American type culture collection

BHIB : Brain Heart Infusion Broth

C.albicans : *Candida albicans*

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CLSI : The Clinical and Laboratory Standards Institute

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité Optique

d20: densité relative 20°C

EE : Efficacité d'Encapsulation

g : Gramme

GRAS : Generally Recognized As Safe

HE : Huile Essentielle

HECA : Huile Essentielle de Citrus Aurantium

HD : Hydrodistillation

HV : Huile Végétale

IA : Indice d'Acide

IE : Indice d'Ester

IR : Indice de Réfraction

IS : Indice de Saponification

Mv : Masse de Matériel Végétal

MTCC : Microbial Type Culture Collection

Liste des abréviations

NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards

PDA : Potato Dextrose Agar

PG : Propylène glycol

% : Pourcentage

RHE : Rendement en Huile Essentielle

SC : Stratum corneum

Introduction

Introduction

Les champignons, en tant qu'un des plus grands royaumes eucaryotes présentent une variété de schémas de cycle de vie avec des adaptations dans le métabolisme et la morphogénèse qui leur permettent de s'adapter aux écosystèmes changeants (1). Actuellement, Près d'un milliard de personnes dans le monde souffrent d'infections fongiques de la peau, des ongles et des cheveux. Les maladies fongiques les plus courantes sont les infections fongiques des ongles, la teigne, la candidose vaginale et les infections à *Candida* du tractus gastro-intestinal (2). *Candida albicans*, un pathogène opportuniste, colonise les surfaces muqueuses humaines en tant que composant de la flore normale. Cependant, lorsque les défenses de l'hôte sont compromises ou lorsque l'environnement de l'hôte est perturbé, *C.albicans* peut devenir pathogène, causant un spectre d'infections allant des infections muqueuses aux infections systémiques souvent mortelles (3).

Ces infections sont particulièrement difficiles à traiter en raison de la nécessité pour les médicaments antifongiques de pénétrer le stratum corneum, ce qui est compliqué par la solubilité limitée des antifongiques et la difficulté de pénétration cutanée (2). De plus, l'émergence de la résistance à ces médicaments chez *Candida* sp, y compris *C. albicans*, rend la prise en charge clinique de la candidose de plus en plus difficile (3). Face à l'augmentation de ce phénomène et pour remédier à ce problème, la médecine traditionnelle et les remèdes à base de plantes médicinales sont explorés comme alternatives prometteuses.

L'étude des plantes aromatiques et médicinales ne cesse de s'étendre en raison de la demande croissante de produits naturels (4) de nombreuses thérapies à base de plantes sont actuellement largement utilisées en Algérie, offrant des applications anti-inflammatoires et antifongiques, particulièrement pour traiter la candidose (5).

Parmi les plantes médicinales, *Citrus aurantium* L, communément appelé oranger amer, est une plante appartenant à la famille des Rutacées, qui est largement cultivée et utilisée dans l'alimentation et la médecine. Les parties de cette plante, telles que l'écorce du fruit, les fleurs et les feuilles, sont utilisées pour leurs propriétés médicinales (3).

Ces plantes médicinales doivent leur efficacité à divers composés bioactifs qu'elles contiennent, notamment les huiles essentielles (HE). Les HE présentent un grand nombre d'activités biologiques, mais leur utilisation pratique est souvent limitée par plusieurs inconvénients qui peuvent survenir lors de la manipulation ou du stockage. Elles sont susceptibles de subir des réactions de conversion ou de dégradation chimique. Ces problèmes d'instabilité peuvent entraîner une réduction ou une perte d'efficacité. De plus, les HE présentent des propriétés physico-chimiques médiocres, ce qui les rend difficiles à manipuler et à utiliser. Dans cette direction, la technologie de nanoencapsulation représente l'un des plus

Introduction

grands défis, mais en même temps, des promesses, pour améliorer significativement la pénétration cutanée et l'efficacité thérapeutique des HE (6).

Dans cette perspective et dans le but de valoriser notre patrimoine végétal nous avons mené ce projet de mémoire qui consiste à évaluer l'activité antifongique de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus aurantium*. Pour qu'elle soit encapsulée par la suite dans des éthosomes en utilisant la méthode à froid, ceci afin de protéger l'huile essentielle contre l'oxydation, d'augmenter sa solubilité et de contrôler sa libération à partir des nanoparticules. Et au final de comparer le pouvoir antifongique de l'huile essentielle encapsulée vis-à-vis de l'huile essentielle non encapsulée.

Ce mémoire s'articule sur deux axes principaux : une partie théorique et une expérimentale.

La partie théorique de cette étude est répartie sur quatre chapitres, offrant un aperçu bibliographique essentiel à la partie expérimentale et à l'interprétation de nos résultats.

Quant à la partie expérimentale, elle est structurée comme suit :

La première étape est consacrée à l'extraction de l'huile essentielle de petit grain bigarade suivi d'une caractérisation physico-chimique.

Lors de la deuxième étape, nous avons entamé l'étude de l'activité antifongique in vitro, sur trois souches de *Candida albicans* afin de déterminer la CMI de l'HE de *Citrus aurantium*.

Par la suite, nous avons formulé des éthosomes avec différentes concentrations d'HE afin d'évaluer leur activité antifongique et les comparer avec nos résultats préalables. Les résultats sont analysés et discutés en tenant compte des recherches récentes, pour clôturer enfin par une conclusion et des perspectives.

Partie Théorique

Chapitre I : Bigaradier

I. Les agrumes

Appartenant à la famille des *Rutacées* c'est le groupe de fruits le plus largement cultivé à l'échelle mondiale, représentant plus de 90 millions de tonnes en 1999, est principalement cultivé pour ses fruits destinés à la consommation fraîche ou à la transformation, notamment l'extraction de jus (oranges, mandarines, citrons). Leur richesse en vitamines A, B et C, ainsi que leur teneur équilibrée en jus et en fibres, contribuent à l'équilibre nutritionnel de base.

Ces fruits peuvent également être utilisés pour la fabrication de confitures ou de fruits confits. Les variétés les plus aromatiques, telles que les bigaradiers à fleurs, les bergamotiers et les citronniers, voient leurs fleurs et feuilles distillées, et les huiles essentielles ainsi obtenues sont utilisées par l'industrie de la parfumerie. Les tourteaux, produits dérivés de la transformation, peuvent également être employés dans l'alimentation animale (7). On s'intéressera dans notre recherche sur l'huile essentielle de petit grain bigarade.

II. Bigaradier *Citrus aurantium* L.

II.1. Description :

Le *Citrus aurantium*, également connu sous le nom d'oranger amer ou bigaradier, est un arbre appartenant à la famille des *Rutacées*, atteignant généralement une hauteur de 5 à 10 mètres (8). Il se caractérise par sa saveur amère, âcre, aigre et chaude (9). Bien que sa résistance au froid soit notable, supportant des températures allant de -8°C et -10°C , Il est très tolérant au calcaire, il s'adapte à beaucoup de sols mais craint les excès d'eau en sol lourd. Il prospère principalement dans des climats méditerranéens. L'importance du bigaradier réside dans l'huile essentielle extraite de ses fleurs, feuilles, graines et écorce (8).

La figure suivante résume la classification botanique de la plante étudiée :

	• Règne	Plantae
	• Classe	Magnoliopside
	• Ordre	Sapindales
	• Famille	Rutacées
	• Genre	<i>Citrus</i>
	• Espèce	<i>aurantium. L</i>

Figure 1 : Systématique botanique de bigaradier

II.2. Utilisation

Dès le Moyen Âge, la bigarade était connue pour son écorce à l'odeur intensément poivrée, son parfum d'une délicieuse suavité et sa fleur blanche aromatique (8). Le Bigaradier riche en composés bioactifs, trouve des applications diverses, allant de la parfumerie à la cosmétique, en passant par l'aromathérapie. C'est cette richesse en molécules aux propriétés aromatiques et thérapeutiques qui confère au *Citrus aurantium* une importance significative, dépassant ainsi son attrait visuel et ornemental.

Il trouve son utilisation en cuisine comme agent aromatisant et acidifiant pour les aliments (9). Son fruit n'est consommable que sous forme de confiture (7). Par ailleurs, des études approfondies ont mis en lumière le potentiel de bioactivité de *Citrus aurantium*. Les fleurs, les fruits, les huiles essentielles et les phytoconstituants de cette plante ont été identifiés comme exerçant divers effets biologiques. Comprenant des activités antimicrobiennes, antioxydantes, cytotoxiques, anxiolytiques, antidiabétiques, anti-obésité et anti-inflammatoires (9). Ainsi, au-delà de leur contribution sensorielle dans la cuisine et la parfumerie, les composants de *Citrus aurantium* révèlent un potentiel thérapeutique significatif, ouvrant la voie à des applications variées dans le domaine de la santé et du bien-être.

Les feuilles, les racines, les fruits, les écorces et les fleurs ont été mentionnés dans la médecine traditionnelle pour le traitement de la toux, de la bronchite, des maux d'oreilles, des maux d'estomac, des vomissements, de l'hypertension artérielle, de la dysenterie, de la diarrhée, des douleurs abdominales et de la fièvre (3).

III. Huile essentielle

III.1. Qu'est-ce qu'une huile essentielle ?

Selon l'Association Française de Normalisation (AFNOR) et la Pharmacopée Européenne (Ph. EUR.), une huile essentielle est clairement définie comme un produit manufacturé à partir de matières premières végétales pures et identifiées, obtenues par hydrodistillation et distillation à la vapeur, des processus mécaniques (HE de Citrus), ou par distillation "sèche" pour certains bois (10).

Les huiles essentielles (HE) sont des liquides aromatiques huileux extraits de matériaux végétaux, généralement présentes dans les sacs ou les glandes d'huile situés à différentes profondeurs de l'écorce des fruits principalement dans la partie flavedo et les cuticules. Elles sont généralement lipophiles solubles dans l'alcool, l'éther et les huiles naturelles, mais insolubles dans l'eau (11,12). Les huiles essentielles peuvent être biosynthétisées dans différents organes végétaux en tant que métabolites secondaires et sont extraites par différentes méthodes. En raison de leur nature hydrophobe et de leur densité souvent inférieure à celle de l'eau, elles peuvent être séparées de la phase aqueuse par décantation. En outre, leurs rendements d'extraction varient en fonction des espèces et des organes. Ils restent cependant très faibles (environ 1%), ce qui en fait des substances rares et précieuses. Parmi les espèces végétales, seules 10% contiennent des huiles essentielles et sont appelées plantes aromatiques (plus de 17 000 espèces végétales, réparties dans le monde entier). Les genres dans lesquels elles peuvent être trouvées sont regroupés dans un petit nombre de familles : Lamiacées, Lauracées, Astéracées, Rutacées, Myrtacées, Poacées, Cupressacées et Pipéracées (11).

Certains auteurs estiment qu'il est nécessaire de faire la distinction entre l'essence végétale et l'huile essentielle. Le premier terme correspond aux sécrétions naturelles produites dans la plante par des cellules sécrétoires spécialisées. Quant au second désigne l'extrait obtenu par distillation à la vapeur ou hydrodistillation, ce qui signifie que les HE sont l'essence végétale distillée. Par exemple, l'extrait obtenu à partir du zeste d'agrumes par expression à froid est l'essence, tandis que celui obtenu par distillation à la vapeur est l'huile essentielle (13).

Les différents tissus spécialisés dans le stockage et l'accumulation d'HE offrent une protection idéale à ces produits fragiles contre les facteurs externes auxquels ils sont

vulnérables (lumière, chaleur, humidité et oxydation). Ils libèrent leur contenu en cas de variation d'humidité ou d'action mécanique. C'est le cas lors de l'extraction des HE.

Les rôles biologiques des HE dans les plantes restent hypothétiques, cependant, les spécialistes considèrent les HE comme une source de signaux chimiques permettant à la plante de contrôler et de réguler son environnement. Les extraits d'HE peuvent varier en qualité, quantité et composition en fonction du climat, de la composition du sol, de l'organe de la plante, de son âge et de son stade de cycle végétatif (11).

III.2. Huile essentielle de *Citrus aurantium*

Le *Citrus aurantium L* est une plante qui offre une diversité d'huile essentielle selon la partie anatomique de la plante utilisée, chacune caractérisée par des propriétés chimiques distinctes et des utilisations spécifiques. Désignant trois types de produits :

III.2.1. Huile essentielle d'orange amère (*Citrus aurantium L.*)

Extraite de l'écorce du fruit, présente diverses propriétés bénéfiques. Sur le plan psychologique, elle agit comme sédatif léger et hypnotique, améliorant la qualité du sommeil et traitant l'insomnie. Des études sur des rongeurs ont démontré son fort potentiel anxiolytique sans perturber la motricité, tandis qu'elle a également favorisé les interactions sociales. Son efficacité anti-anxieux chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique est attribuée à la régulation des récepteurs de la sérotonine. Sur le plan physique, elle agit comme agent anticonvulsivant, antispasmodique, et stimule le désir sexuel (13).

L'huile d'orange amère montre des effets gastroprotecteurs grâce au limonène, favorisant la production de mucus gastrique, bénéfique dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques. Elle est utilisée pour traiter divers troubles digestifs tels que la digestion lente, la constipation, et les flatulences. Des propriétés hépatoprotectrices ont également été observées, réduisant les lésions pré-néoplasiques au cours de l'hépatocarcinogénèse chez les rats (13).

Sur le plan antioxydant, l'huile présente une forte activité de piégeage des radicaux libres, attribuée à sa teneur élevée en d-limonène. Cette propriété se traduit par des effets néphroprotecteurs et une réduction du stress oxydatif.

Son activité antibactérienne s'étend à diverses souches, notamment *Listeria innocua*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* et *Aeromonas hydrophila*, ainsi qu'une efficacité contre les biofilms multi-espèces (13).

III.2.2. Huile essentielle de Néroli (*Citrus aurantium L.*)

L'huile essentielle de Néroli, issue de la distillation des fleurs de bigaradier, tire son nom de l'hommage rendu à la princesse de Nérole au XVIII^e siècle (8). Cette huile est reconnue pour ses propriétés sédatives, offrant des effets apaisants, calmants et relaxants moteurs. Elle est également efficace contre les palpitations cardiaques liées à des chocs ou à la peur. De manière similaire à l'huile d'écorce de fruit, l'odeur de Néroli diminue les symptômes d'anxiété, améliore l'humeur et génère une sensation de bien-être (13).

Elle a également montré des résultats positifs chez les femmes post-ménopausées en régulant les récepteurs de la sérotonine. Le Néroli offre des avantages étendus, tels que la réduction du stress, l'amélioration du système endocrinien, et la diminution des symptômes liés à la ménopause et au syndrome prémenstruel. Ses propriétés vasodilatatrices dépendent de l'endothélium et des muscles lisses, apportant un soulagement des symptômes cardiovasculaires. De plus, des mélanges d'huiles essentielles, dont le Néroli, ont montré une réduction immédiate et continue de la pression artérielle chez des sujets pré-hypertendus et hypertendus (13).

Sur le plan de la santé mentale, le Néroli agit comme un antioxydant puissant, démontrant une activité significative de capture de l'oxygène singulet. Ses propriétés anti-amnésiques suggèrent un potentiel dans le traitement de troubles de la mémoire, d'apprentissage, et de comportement, y compris la maladie d'Alzheimer. En outre, le Néroli présente une action inhibitrice sur la croissance de diverses bactéries et champignons, soulignant son rôle polyvalent en matière de santé et de bien-être (13).

III.2.3. Huile essentielle de petit grain bigarade (*Citrus aurantium L.*)

L'huile essentielle de petit grain est extraite des feuilles et des bourgeons de l'oranger amère. Cependant, il est possible d'extraire de l'huile de petit grain à partir de n'importe quelle plante d'agrumes (14).

Cette huile réputée pour ses vertus thérapeutiques et cela dans bien des cas, représente une alternative intéressante aux traitements chimiques. Elle a montré une activité antioxydante remarquable, supérieure à celle de l'huile de fleur (néroli) et de l'huile d'écorce du fruit (orange amère) de la même plante. Cette effet antioxydant puissant pourrait être attribué à la teneur élevée en d-limonène (13). Elle a également inhibé la croissance de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor*

ramannianus, *Fusarium culmorum*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *C. albicans*, et *C. krusei* (3,13).

III.3. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont obtenues à partir de matières premières végétales par plusieurs méthodes d'extraction (11). Ces dernières ont un impact significatif sur les constituants chimiques et la composition des huiles essentielles (HE). Dans les sections suivantes on présente les méthodes conventionnelles basées sur la distillation à l'eau par chauffage pour récupérer les huiles essentielles (HE) de la matrice végétale.

Mais d'abord, il est important de mettre le point sur la différence entre distillation et évaporation, et l'intérêt porté aux produits séparés. Dans la distillation, c'est la phase vapeur qui a de la valeur car elle contient le ou les constituants à séparer, alors que dans l'évaporation, c'est le résidu solide ou liquide obtenu par vaporisation du solvant, qui est le produit intéressant (8).

III.3.1. Hydrodistillation

Cette méthode est la plus simple utilisée pour l'extraction des huiles essentielles. Dans ce processus, le matériel végétal est complètement immergé dans de l'eau bouillante. La caractéristique de ce processus est le contact direct entre l'eau bouillante et la matière première (15). Le dispositif d'extraction comprend une source de chauffage surmontée d'un récipient (alambic) dans lequel on peut mettre le matériel végétal et de l'eau. Le dispositif comprend également un condenseur et un décanteur pour recueillir le condensat et séparer les HE de l'hydrolat. Le principe de l'extraction est basé sur la distillation azéotropique. En fait, à pression atmosphérique et pendant le processus d'extraction (chauffage), les molécules d'eau et de l'HE forment un mélange hétérogène qui atteint sa température d'ébullition à un point inférieur proche de 100 °C, tandis que pour les composants des HE, ce point est très élevé. Le mélange HE/eau est ensuite distillé simultanément comme s'il s'agissait d'un composé unique. L'avantage de l'eau est qu'elle est immiscible avec la majorité des molécules terpéniques des HE et, par conséquent, après la condensation, les HE peuvent être facilement séparées de l'eau par simple décantation (11).

Cette technique est couramment réalisée à l'aide d'un dispositif appelé appareil de Clevenger qui est recommandée par la troisième édition de la Pharmacopée européenne pour la détermination des rendements en HE. Elle permet le recyclage des condensats à travers un système de cohobage (11) (Figure 2). Ce processus présente l'avantage de permettre le traitement des matériaux solides finement pulvérisés ou de petites parties de plantes telles que les feuilles, les fleurs, les écorce...Etc (16).

Du point de vue économique, cette technique ne nécessite pas l'utilisation de solvants organiques, ce qui en fait une option souhaitable lorsque le coût de l'extraction est important (17).

Cependant, l'hydrodistillation présente plusieurs inconvénients :

- Temps d'extraction long (3-6 heures), altérations chimiques des molécules terpéniques par un contact prolongé avec l'eau bouillante (hydrolyse, cyclisation, etc.) et surchauffe et perte de certaines molécules polaires dans l'extraction à l'eau (11).

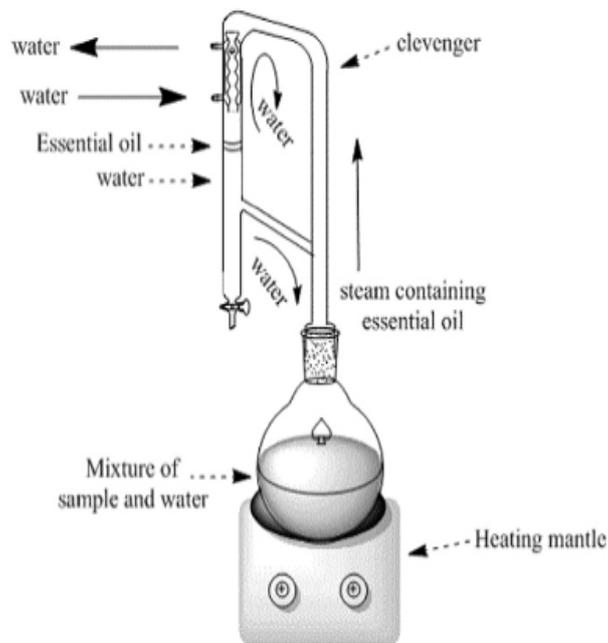


Figure 2 : Hydrodistillation appareil de Clevenger (18).

III.3.2. Entraînement à la vapeur d'eau

Il s'agit de l'une des méthodes officielles pour l'obtention d'huiles essentielles (HE). C'est une méthode largement utilisée pour l'extraction des HE. Elle repose sur le même principe que l'hydrodistillation, à la différence qu'il n'y a pas de contact direct entre la plante et l'eau. La durée de l'extraction est raccourcie, réduisant ainsi les altérations chimiques (11).

Il existe plusieurs variantes :

1. Hydrodistillation à la vapeur : L'extraction se fait à l'intérieur de l'alambic, à la différence qu'il y a un système de plaque perforée ou de grille maintenant la plante suspendue au-dessus de la base du récipient contenant de l'eau, évitant ainsi leur contact direct. L'extraction est effectuée par injection de vapeurs d'eau qui traversent

la matière végétale de bas en haut et emportent les composés volatils (11). (Figure 3 droite)

2. Distillation à la vapeur : Cette méthode présente les mêmes principes et avantages que l'hydrodistillation à la vapeur, à la seule différence que la vapeur provient de l'extérieur de l'alambic de distillation. Cette vapeur est introduite dans la partie inférieure de l'extracteur et traverse ainsi la charge de matière végétale. Cette technique évite certaine altération par rapport à l'hydrodistillation (11). (Figure 3 gauche)
3. Hydrodiffusion : Il s'agit d'un cas particulier de l'hydrodistillation à la vapeur où dans ce cas le flux de vapeur se produit vers le bas. On l'appelle également hydrodiffusion ou hydrodiffusion avec gravité (11).

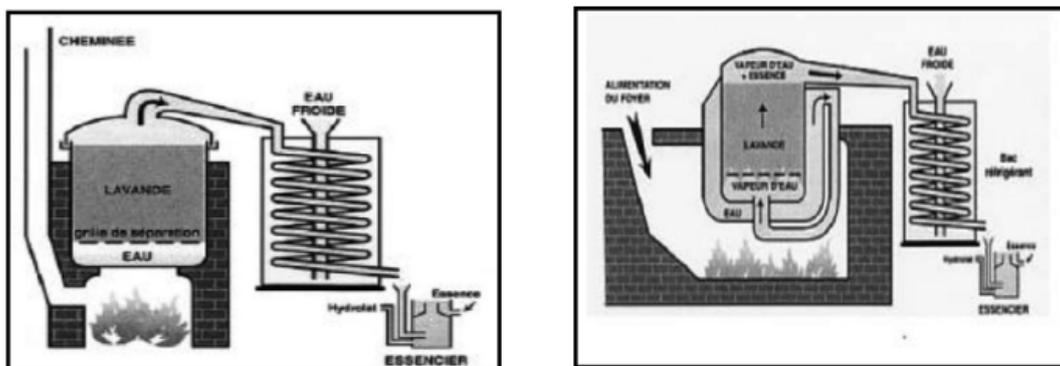


Figure 3 : (Gauche) Hydrodistillation à la vapeur.

(Droite) Distillation à la vapeur.

III.4. Toxicité des huiles essentielles

Dans des conditions normales d'utilisation établie, la plupart des huiles semblent présenter un bon profil de sécurité (19).

Concernant les huiles essentielles d'agrumes, elles sont en générale non toxiques, non mutagènes et non carcinogènes. Elles ne présentent pas de risques pendant la grossesse et n'altèrent pas les résultats de la reproduction maternelle. Les huiles d'orange amère, de néroli, de petit grain, ont le statut GRAS (Generally Recognized As Safe). Cependant, il peut y avoir un problème de sensibilisation de la peau en cas d'utilisation d'une huile ancienne ou oxydée.

Les huiles distillées ne sont pas phototoxiques, tandis que les huiles extraites présentent un risque faible à modéré de phototoxicité (Tableau I) en raison de la présence de furanocoumarines. En cas d'application d'huiles extraites sur la peau à une dose dépassant le

niveau d'utilisation dermique maximal, il est recommandé d'éviter l'exposition au soleil pendant au moins 12 heures (13).

L'huile de néroli n'est ni irritante ni sensibilisante. L'HE d'orange amère n'était ni irritante ni sensibilisante pour 25 volontaires lorsqu'elle était testée à 10%, tandis qu'elle provoquait une sensibilité chez 1,5% des patients atteints de dermatite totale lorsqu'elle était testée à 2%. Quant à l'huile essentielle de petit grain bigarade est légèrement irritante pour les lapins mais non pas pour les souris (13).

Tableau I : Le risque de phototoxicité , l'irritation de l'huile non diluée, la DL50 aigüe chez les lapins et les rats, et le niveau d'utilisation dermique maximal des HE de *Citrus aurantium* (13).

Toxicité aigüe	Phototoxicité Risque	Irritation de l'huile non diluée	DL50 cutanée aigüe chez les lapins (g/kg)	DL50 orale aigüe chez les rats (g/kg)	Niveau d'utilisation dermique maximal
HE d'Orange amère	faible risque	Irritation modérée chez les lapins	>10	>5	1,25%
HE de néroli	Non phototoxique	Non irritante	>5	4,55	-
HE de petit grain	Non phototoxique	Légèrement irritante pour les lapins, mais non irritante pour les souris ou les cochons	<2	>5	-

Chapitre II : Peau

I. La peau

Elle constitue l'enveloppe du corps, représentant le plus vaste organe de l'organisme humain, équivalant à environ 15% de son poids et couvrant une superficie d'environ 2 m² chez l'adulte. La peau, ainsi que ses annexes, exerce diverses fonctions essentielles : elle assure la protection contre les agressions mécaniques et les radiations lumineuses, participe aux réponses immunitaires, régule la température corporelle et réceptionne les informations sensibles (20).

La peau se distingue en tant qu'organe extrêmement complexe, partageant une origine embryonnaire commune avec le système nerveux, tous deux dérivant de l'ectoderme. Cette origine partagée explique le rôle significatif de la peau dans la sensibilité et la perception de l'environnement (21).

II. Types et organisation générale de la peau

La peau est segmentée en quatre couches allant de la superficie vers la profondeur : l'épiderme externe ,dérivé de l'ectoderme, la jonction dermo-épidermique, le derme, plus profond dérivé du mésoderme et l'hypoderme ou tissu sous cutanée (22).

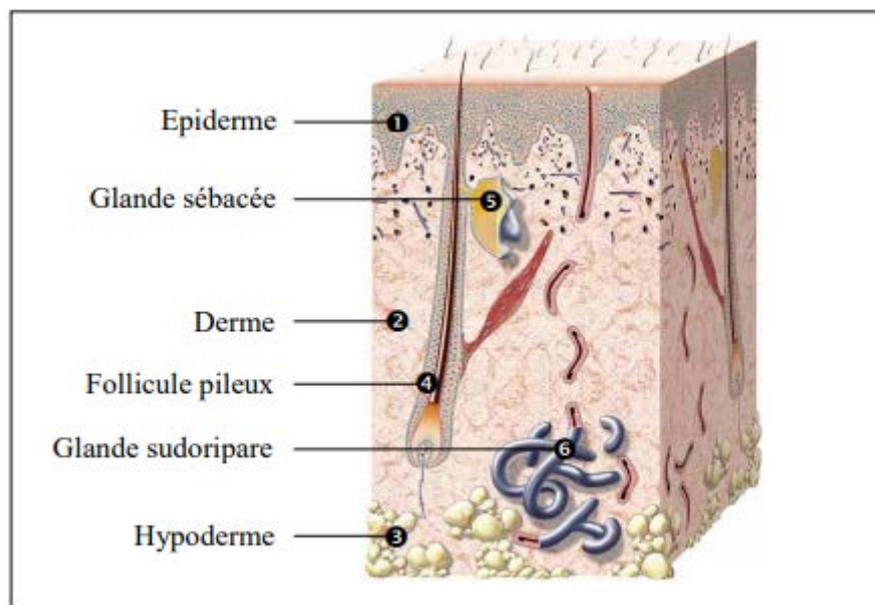


Figure 4 : Structure de la peau (Laboratoires-Dermatologiques-Eucerin) (23).

II.1. L'épiderme

Il est en constant renouvellement. C'est un épithélium stratifié pavimenteux orthokératosique, L'épiderme se compose de quatre types de cellules distincts, chacun remplissant une fonction spécifique. Les kératinocytes, cellules prédominantes de l'épiderme, assurent principalement une fonction barrière et participent au renouvellement cutané. Les autres types de cellules, dispersées entre les kératinocytes, comprennent les mélanocytes, responsables de la pigmentation et de la photoprotection, les cellules de Langerhans, impliquées dans l'immunité cutanée, et les cellules de Merkel, contribuant à la sensibilité (21).

Au cours du phénomène de la kératinisation, les cellules vont se transformer progressivement pour former différentes couches, ce qui explique l'aspect stratifié de l'épiderme. On retrouve de la profondeur à la superficie :

- La couche germinative également appelée couche basale car elle repose sur la membrane basale.
- La couche épineuse.
- La couche granuleuse.
- La couche cornée.
- La couche claire qui n'est présente que dans la peau épaisse retrouvée au niveau des pieds et des mains.

Les kératinocytes migrent depuis la couche basale vers la surface de la peau en environ 3 semaines pour une peau normale, assurant ainsi un renouvellement constant de l'épiderme. Cependant, cette vitesse de migration peut varier selon l'âge, la pression partielle en oxygène et la quantité de radicaux libres dans la peau (24).

II.2. Jonction dermoépidermique

La jonction dermoépidermique est responsable de l'adhérence entre le derme et l'épiderme, assurant ainsi la liaison structurale entre ces deux couches de la peau (25).

Elle fonctionne également comme une barrière et un filtre sélectif, régulant les échanges entre les deux compartiments (24). Cette fine couche acellulaire, positionnée sous la couche basale, se compose de deux feuillets minces : la lame basale, principalement constituée de fibres de collagène de type IV et de glycoprotéines, et la lame réticulaire, composée de collagène de type III. La structure ondulée distinctive de la couche basale dermoépidermique

est caractéristique des peaux jeunes. Au fil du vieillissement, cette structure s'aplatit, entraînant une distension de la peau (25).

II.3. Le derme

Le derme, un tissu conjonctif abondant en fibres, présente généralement une structure relâchée en surface, devenant plus dense et fibreuse en profondeur. Il constitue une couche épaisse, fortement innervée et vascularisée, avec une épaisseur moyenne variant entre 1 et 5 mm. Sa fonction principale est de fournir un soutien structurel aux tissus, assurant la résistance, l'élasticité et la fermeté de la peau en agissant comme une charpente. De plus, le derme agit comme un réservoir d'eau grâce à la présence de gel de protéoglycanes (21).

Le derme se divise en deux parties distinctes : le derme papillaire, situé le plus près de la jonction avec l'épiderme, et le derme réticulaire, plus profond, constituant environ 80% de l'épaisseur totale du derme. Ces deux composants sont des tissus conjonctifs (25).

Ils se composent de cellules fixes telles que les fibroblastes, ainsi que de cellules mobiles comme les cellules sanguines. Ces cellules sont associées à des fibres de collagène, d'élastine et de réticuline. La cohésion globale est maintenue par la substance fondamentale, principalement composée de mucopolysaccharides, dont l'acide hyaluronique (26).

II.4. Hypoderme

L'hypoderme, la couche la plus profonde de la peau. Composé d'un tissu conjonctif lâche, il renferme des adipocytes, des fibres de collagène et d'importants vaisseaux sanguins qui assurent l'irrigation et le drainage de la vascularisation dermique. Les cellules graisseuses, appelées adipocytes, sont regroupées en lobules adipeux et séparées par des septa interlobulaires (21).

Son épaisseur varie en fonction des régions corporelles, présentant une épaisseur plus notable au niveau des fesses, plus fine sur le front, voire absente sur les paupières. Cette épaisseur connaît des variations en lien avec le genre, étant plus prononcée chez les femmes que chez les hommes. Par ailleurs, le mode de vie et la génétique jouent également un rôle dans cette diversité d'épaisseurs cutanées (24).

La fonction principale de la couche hypodermique est d'agir comme un amortisseur pour absorber les chocs et de fournir une isolation contre le froid. Elle constitue la zone ciblée lors de l'utilisation de fillers (26).

II.5. Le stratum corneum

Représente la couche la plus externe de la peau, le stratum corneum (également appelée couche cornée), est considérée comme la barrière physique de la peau protégeant contre la pénétration cutanée de substances étrangères. Elle semble constituer l'étape limitante pour la délivrance de médicaments à travers la peau. En effet, la différenciation et la migration des cornéocytes, ainsi que la desquamation, contrent le passage des médicaments à travers la peau (27).

La couche cornée (SC) est une fine couche ayant une teneur en eau très basse. Elle est composée d'environ 20 couches de cellules épidermiques mortes anucléées (cornéocytes), remplies de filaments de kératine et intégrées dans une matrice lipidique multilamellaire continue. Le modèle schématique en briques et mortier saisit les principaux éléments constitutifs du SC et sert d'outil pour prédire les principales voies de perméation. Dans une structure hétérogène, le transport suivra principalement le trajet présentant la plus faible résistance au flux, dépendant à la fois des propriétés chimiques des composés diffusants et de leur impact sur l'organisation moléculaire du SC (28).

En plus d'avoir une faible perméabilité tant pour les composés hydrophiles que hydrophobes, la couche cornée est forte, souple et tolère la déformation causée par les contraintes physiques et le stress (25,28). Dans l'ensemble, la couche cornée répond à plusieurs exigences essentiellement différentes qui ne sont pas évidemment faciles à combiner dans un seul matériau (28).

En outre, on peut envisager la couche cornée comme un tamis, car seules les particules de petite taille ont la capacité de la traverser. Il est important de noter que les jonctions intercellulaires (desmosomes) et la jonction dermoépidermique ne jouent pas un rôle significatif en tant que barrières à la diffusion, limitant uniquement le passage de molécules volumineuses, à savoir celles dont la taille est supérieure respectivement à 50 kDa et 40 kDa. Par conséquent, l'absorption percutanée est principalement régulée par la couche cornée (23).

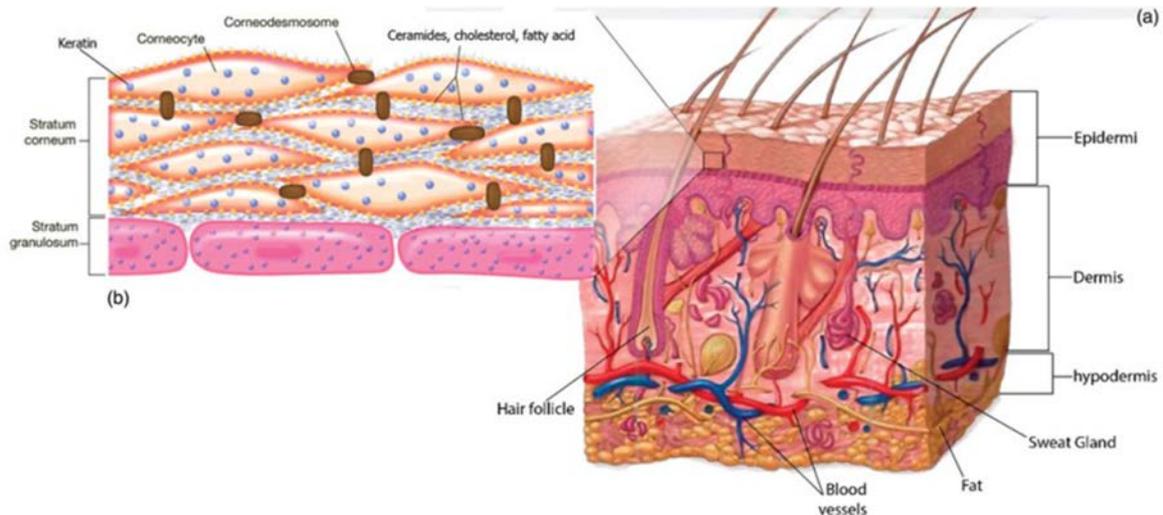


Figure 5 : Illustration schématique de (a) Les trois couches de la peau et (b) la couche cornée (29).

III. Perméation cutanée

La perméation cutanée fait référence au trajet d'une molécule à travers les diverses couches de la peau, débutant par son adhérence au stratum corneum et se poursuivant par son absorption transcutanée. Ce processus repose sur une diffusion passive, influencée par plusieurs facteurs tels que le véhicule (l'excipient qui transporte le principe actif), l'état de la peau et les propriétés physicochimiques de la molécule appliquée (21).

Ce trajet est caractérisé par le transfert d'une substance déposée sur la peau vers la circulation sanguine. Ce processus se décompose en trois étapes majeures : la pénétration, marquant l'entrée de la substance dans la couche superficielle de la peau, la perméation, représentant le passage de la substance à travers les différentes couches de la peau, et enfin, l'absorption ou la résorption, correspondant à l'entrée de la substance dans le système vasculaire (23).

III.1. Les voies du passage transcutané

L'épiderme et le derme sont les couches de la peau impliquées dans les processus de pénétration, mais la composition et les propriétés de la couche cornée (SC) sont principalement responsables de la fonction barrière de la peau humaine (20).

Il existe trois voies d'absorption transcutanée : l'absorption transcellulaire, l'absorption paracellulaire (également appelée intercellulaire), et l'absorption transannexielle (également appelée pilo-sébacée) (Figure 6).

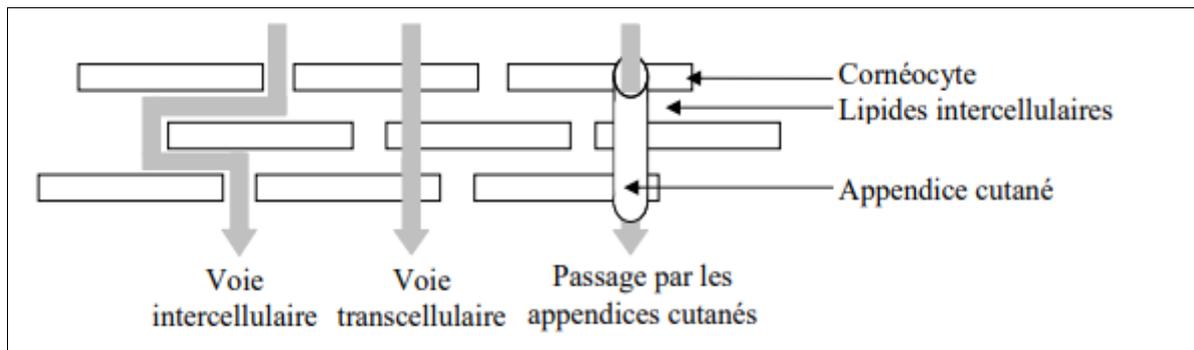


Figure 6 : Les trois voies du passage transcutané (23).

III.1.1. La voie intercellulaire

L'absorption intercellulaire s'effectue à travers les masses lipidiques situés entre les cornéocytes. Le passage se fait selon un chemin tortueux. Il s'agit de la voie la plus fréquemment empruntée par toutes les molécules amphiphiles ou lipophiles non chargées et de faible poids moléculaire. Les espaces entre les cellules peuvent être élargis par l'ajout de co-solvants agissant en tant que promoteurs d'absorption, tels que l'éthanol ou le propylène glycol (21).

III.1.2. La voie transcellulaire

Le passage direct par la voie transcellulaire se fait à travers les kératinocytes. Il est spécifique aux molécules lipophiles, car elles doivent avoir la capacité de s'intégrer à la double couche de phospholipides formant les membranes cellulaires pour pouvoir y pénétrer. Cette voie est principalement empruntée par les molécules de petite taille (21).

La distance que parcourt une molécule pour traverser la couche cornée par cette voie est d'environ l'épaisseur du stratum corneum, soit de 10 à 40 μm (23).

III.1.3. La voie pilo-sébacée

Cette voie facilite le transport des molécules actives jusqu'au derme réticulaire, étant donné que les follicules pilosébacés se trouvent dans des creux profonds (30). Elle est particulièrement utilisée par les molécules ionisées, qui ne pourraient pas franchir la barrière autrement (21). Cependant, elle rencontre divers obstacles, notamment celui des glandes sébacées qui ont tendance à retenir les substances lipophiles, ainsi que le flux de sébum qui s'écoule de l'intérieur vers l'extérieur, entravant l'introduction de molécules exogènes (25).

III.2. Facteurs influençant l'absorption transcutanée

III.2.1. Influence des facteurs biologiques liés à la peau

Les propriétés de barrière de la peau humaine varient considérablement selon le site anatomique, car il influence fortement la majorité des caractéristiques de la peau, telles que l'épaisseur de la couche cornée, la densité des annexes cutanées et le niveau d'hydratation. La perméabilité cutanée est facilitée lorsque la couche cornée est plus mince, en raison d'une plus petite distance à parcourir par les substances pénétrantes (20).

Le niveau d'hydratation de la peau peut varier considérablement entre les différentes parties du corps. Une hydratation renforcée entraîne une augmentation du taux de pénétration, car l'eau peut agir comme un promoteur d'absorption (20).

L'absorption cutanée des substances à travers une peau altérée est considérablement accrue. Par exemple, l'eczéma (peau sèche et squameuse) peut rendre la peau 8 à 10 fois plus perméable que dans le cas d'une peau normale et saine (20).

Il a été constaté que la transpiration et une hydratation cutanée élevée entraînent une augmentation de l'absorption d'eau. Ces deux paramètres sont réduits chez les sujets plus âgés (20). Il a également été constaté que la présence de poils rend le visage des hommes plus perméable que celui des femmes. Les hommes transpirent davantage que les femmes (800 ml/h pour les hommes contre 450 ml/h pour les femmes pendant l'activité physique), ce qui peut également entraîner une plus grande perméabilité cutanée chez les hommes. Les hormones sexuelles influencent la composition chimique de la couche cornée de la peau et peuvent également influencer la perméabilité cutanée (20,31).

III.2.2. Influence des caractéristiques physico-chimiques de la molécule

Le transport des substances à travers la structure de la peau humaine dépend fortement des substances elles-mêmes, ainsi que des excipients qui les accompagnent. Il a été rapporté que les particules élastiques peuvent migrer à travers la peau humaine de manière plus efficace que les particules rigides, en raison de la différence de déformabilité. De plus, la taille et la forme de la molécule, le pH de la solution, ainsi que d'autres descripteurs physico-chimiques, sont des facteurs décisifs pour la capacité des substances à migrer à travers la structure de la peau, sa profondeur de pénétration, le trajet possible et le coefficient de diffusion (20).

La perméation à travers la peau se produit par diffusion passive. Les substances amphiphiles, petites et non chargées, sont les mieux absorbées. L'amphiphilie est cruciale car elle combine la lipophilie nécessaire pour traverser la couche cornée avec l'hydrophilie favorisant la diffusion dans le derme, l'hypoderme et dans le système vasculaire (21).

III.2.3. Influence de la forme galénique et des excipients

Le véhicule est chargé de transporter le principe actif jusqu'à la couche cornée tout en facilitant sa pénétration. Le principe actif doit ensuite diffuser hors du véhicule et franchir la barrière cutanée pour atteindre son site d'action. Les fonctions du véhicule incluent la solubilisation du principe actif, l'augmentation de l'hydratation par occlusion pour favoriser la perméabilité, et la modification du degré d'ionisation du principe actif (21).

Le véhicule et les constituants de ce dernier doivent être choisis en fonction du degré de pénétration cutanée et de la vitesse de délivrance de la molécule souhaités. Ainsi, les formes galéniques ont été classées en trois catégories en fonction du degré de pénétration de la molécule atteint grâce à son véhicule : les formes cosmétiques qui permettent une délivrance de substances limitée à la surface de la peau, les formes topiques qui délivrent les composés dans les structures cutanées et enfin les formes transdermiques qui permettent la traversée de la peau et la résorption par la circulation systémique (23).

Chapitre III : *Candida*

Albicans

I. Epidémiologie

Au cours des dernières années, le nombre d'infections fongiques a considérablement augmenté, touchant actuellement environ 150 millions de personnes chaque année et entraînant 1,5 million de décès. Ces infections vont des éruptions cutanées superficielles sur les muqueuses, la peau ou les ongles, aux infections systémiques, au cours desquelles les cellules fongiques se disséminent dans la circulation sanguine et peuvent finir par coloniser n'importe quel organe interne majeur. Les espèces de *Candida* figurent parmi les agents étiologiques les plus pertinents causant des infections fongiques superficielles et invasives (32).

Candida albicans est l'espèce pathogène la plus fréquemment isolée. Cependant, d'autres espèces telles que *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. famata*, *C. guilliermondii* et *C. lusitaniae* ont été isolées de plus en plus fréquemment, principalement chez les individus infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (33).

II. Candida albicans

Candida albicans est une levure commensale de l'homme, agissant également comme un pathogène opportuniste. Il réside généralement dans le tractus gastro-intestinal et génito-urinaire, ainsi que dans la flore buccale et conjonctivale. Cependant, il provoque des infections lorsque l'hôte devient affaibli ou immunodéprimé (34). Ces infections peuvent être superficielles et affecter la peau ou les muqueuses ou bien elles peuvent envahir la circulation sanguine et se disséminer dans les organes internes. Les facteurs de risque de candidose invasive comprennent la chirurgie (surtout la chirurgie abdominale), les brûlures, un séjour prolongé en unité de soins intensifs, et l'administration préalable d'antibiotiques à large spectre et d'agents immunosuppresseurs. Les progrès dans la gestion médicale tels que la chimiothérapie antinéoplasique, la transplantation d'organes, l'hémodialyse, la nutrition parentérale et l'utilisation de cathéters veineux centraux contribuent également à l'invasion et à la colonisation fongiques (35).

II.1. Classification

Courtecuisse & Van Halluwyn (1992) ont proposé une classification de *Candida albicans* (36). Dans cette dernière, cette levure appartient au :

-
- **Règne** : Fungi
-
- **Phylum** : deutéromycètes
-
- **Division** : Eumycota
-
- **Sous-division** : Deuteromycotina
-
- **Classe** : Blastomycète
-
- **Ordre** : Cryptococcales
-
- **Genre** : Candida
-
- **Espèce** : albicans
-

II.2. Morphologie

Une particularité de *C. albicans* réside dans le fait qu'il puisse exister sous plusieurs formes morphologiques en fonction des conditions environnementales (blastospores : levures ovoïdes bourgeonnantes, pseudohyphes: cellules allongées jointes les unes aux autres avec une division synchronisée, et d'hyphes: cellules à bords parallèles attachées les unes aux autres en croissance apicale ou en ramifications latérales) (34,37) (Figure 7). Les blastospores se divisent de manière asexuée par bourgeonnement (37) formant ainsi des colonies blanches crémeuses sur milieu Sabouraud additionné de Chloramphénicol et d'actidione (38).

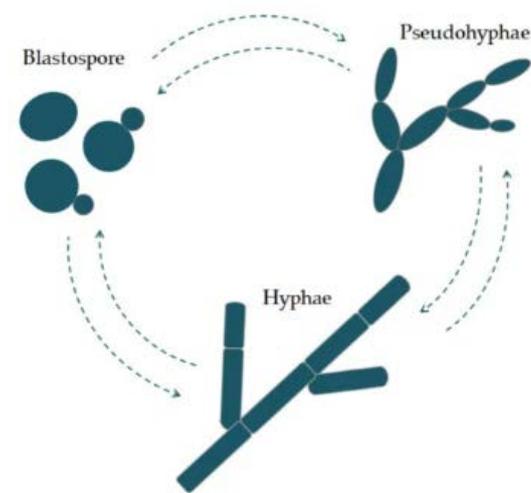


Figure 7 : Les transitions morphologiques, passant de la forme blastospore aux pseudohyphes et aux hyphes, sont réversibles (37).

III. Types de candidose

Il existe plusieurs types de candidoses comme la candidose des muqueuses, la candidose cutanée, l'onychomycose et la candidose systémique. Il est à considérer que la candidose est une infection pouvant affecter à la fois les personnes immunodéprimées et les personnes en bonne santé (33). La candidose cutanée survient sur une peau humide et occluse, tandis que la candidémie disséminée se produit chez les patients immunodéprimés (39).

III.1. Candidose invasive

La candidose invasive fait référence aux infections sanguines causées par *Candida* spp. Elles surviennent le plus souvent après avoir franchi la barrière intestinale. Par exemple, après une chirurgie, elle pourrait se propager dans la cavité abdominale, pénétrer dans le flux sanguin et provoquer une candidose. La prolifération de *C. albicans* peut déclencher une altération de la réponse immunitaire, entraînant des infections opportunistes dans divers organes. Par conséquent, la maladie invasive est généralement le résultat d'une colonisation accrue ou anormale, associée à un déficit local ou généralisé de la défense de l'hôte. La candidose invasive n'est pas une entité clinique unique, mais un trouble avec d'innombrables manifestations cliniques qui peuvent potentiellement affecter n'importe quel organe (37).

III.2. Candidose superficielle

La candidose cutanéomuqueuse présente un large éventail de manifestations cliniques qui dépendent du site atteint, de l'âge du patient et de divers facteurs prédisposants. Les caractéristiques cliniquement pertinentes de la candidose sont l'érythème, les érosions et les plaques blanches caséuses facilement détachables, ces dernières seront observées le plus souvent sur les muqueuses que sur la peau, contrairement à l'érythème et les érosions qui sont des présentations largement non spécifiques (37).

Les sites les plus couramment touchés sont les zones intertrigineuses, telles que les plis sous-mammaires, inguinaux, inter-fessiers et les plis du pannus chez les patients en surpoids. Les infections à *Candida* se manifestent par des plaques érythémateuses nettement délimitées, parfois érosives, avec une légère desquamation de la surface, ainsi que des papules et des pustules satellites sur la périphérie (37).

Candida peut également causer une périonyxis chronique et aiguë ainsi qu'une onychomycose. La périonyxis est une inflammation de la peau autour d'un ongle (zone périunguéal), également appelée panaris, et est généralement due à une infection bactérienne par *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas spp.* L'onychomycose est une infection fongique de l'ongle, et lorsqu'elle est causée par Candida, elle est généralement secondaire à une paronychie chronique (37).

Outre les défauts héréditaires des mécanismes d'immunité de l'hôte, de nombreux facteurs externes contribuent aux infections à Candida. Comme mentionné précédemment, elles sont couramment observées chez les patients atteints de diabète sucré, les patients immunodéprimés tels que les patients atteints du VIH/SIDA, les patients en oncologie recevant une chimiothérapie et les patients transplantés d'organe sous antibiothérapie systémique à large spectre (37).

IV. Traitement

La candidose récurrente peut toucher différentes parties du corps, notamment les parties superficielles, telles que la muqueuse buccale et vaginale. Le traitement implique généralement l'utilisation prolongée d'antifongiques topiques et, dans les cas graves, l'association avec des antifongiques par voie orale. Cependant, le nombre de classes antifongiques est inférieur à celui des agents antibiotiques, et seules quatre classes principales de médicaments antifongiques sont actuellement utilisées pour la prise en charge de candidose (40). Le développement de médicaments antifongiques est limité par la similitude entre les cellules fongiques et humaines, rendant ainsi difficile l'identification de molécules ciblant spécifiquement la cellule fongique sans endommager l'hôte (32).

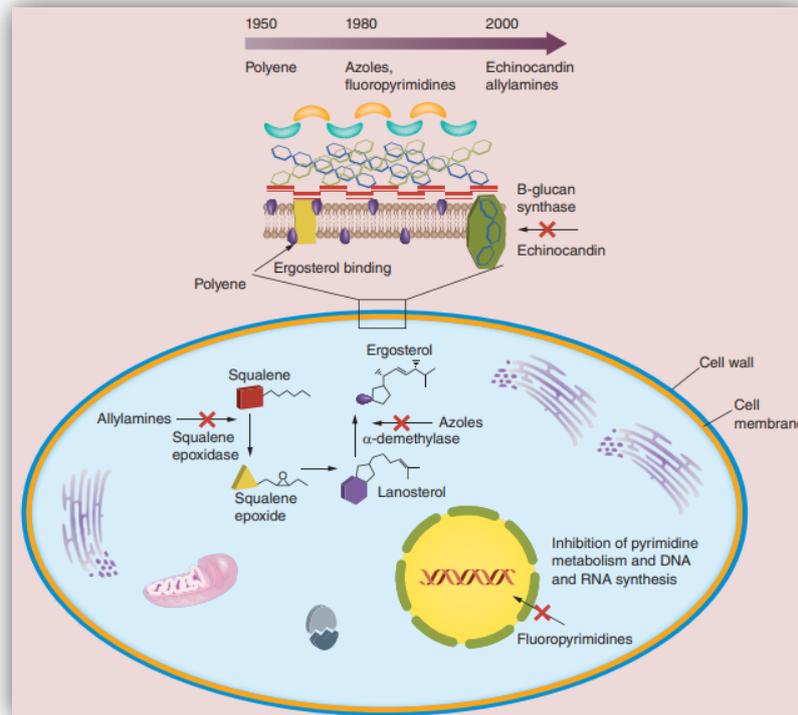


Figure 8 : Les mécanismes d'action des agents antifongiques actuellement utilisés(40).

Antifungal class	Mode of action	Drugs
Azoles	Inhibitors of lanosterol 14- α -demethylase	Miconazole Econazole Clotrimazole Ketoconazole Fluconazole Itraconazole Voriconazole Posaconazole
Echinocandins	Inhibitors of (1,3)- β -D-glucan synthase	Caspofungin Micafungin Anidulafungin
Polyenes	Binding ergosterol	Nystatin Amphotericin B
Nucleoside analogues	Inhibitor of DNA/RNA synthesis	Flucytosine
Allylamines	Inhibitors of squalene-epoxidase	Terbinafine Amorolfine Naftifine
Thiocarbamates	Inhibitors of squalene-epoxidase	Tolnaftate Tolciclate
Antibiotic	Interaction with β -tubulin	Griseofulvin

Figure 9 : Cibles principales et mode d'action de plusieurs agents antifongiques(35).

IV.1. Les Inhibiteurs de la biosynthèse des acides nucléiques

IV.1.1. La flucytosine

La flucytosine présente une large activité antifongique contre la plupart des espèces de *Candida*, à l'exception de *C. krusei*. Le composé n'est disponible que sous forme orale. La flucytosine est généralement administrée en association avec un autre agent antifongique en raison d'un taux élevé d'apparition de résistance lors d'une monothérapie. L'utilisation la plus courante de la flucytosine dans le cadre d'une infection à *Candida* est en association avec Amphotéricine B (41).

La flucytosine est un analogue de la pyrimidine. Elle est transportée dans les cellules fongiques par des perméases à la cytosine. Ensuite, elle est désaminée en 5-fluorouracile et phosphorylée en monophosphate de 5-fluorodéoxyuridine. Ce nucléotide fluoré inhibe la thymidylate synthase et interfère ainsi avec la synthèse de l'ADN, comme il peut ensuite être phosphorylé davantage et incorporé dans l'ARN, provoquant une terminaison prématurée de la chaîne, affectant ainsi la synthèse de l'ARN et des protéines (32,35).

Les enzymes qui permettent la conversion du 5-FC en 5-FU ne sont pas présentes dans les cellules mammifères. Cependant, il a été démontré que les bactéries vivant dans l'intestin humain convertissent efficacement le 5-FC en 5-FU, ce qui explique les effets toxiques observés chez les patients traités par 5-FC. En raison de ces effets, le 5-FC est administré aux patients à faible concentration et en association avec d'autres agents antifongiques (32).

IV.2. Antifongiques agissant sur l'ergostérol et sa biosynthèse

IV.2.1. Les azolés

Les azolés constituent la plus grande famille d'antifongiques utilisés contre *Candida*. Cette famille comprend les imidazolés (miconazole, éconazole, clotrimazole et kétoconazole) et les triazolés (fluconazole, itraconazole, ainsi que le dernier agent, le voriconazole (dérivé synthétique de deuxième génération des triazolés, dérivé du fluconazole) et le posaconazole (analogue hydroxylée de l'itraconazole)). Ils sont généralement efficaces à la fois pour une utilisation topique et pour le traitement et la prophylaxie des infections fongiques invasives (35).

Aujourd'hui, les imidazolés sont principalement utilisés pour le traitement de la candidose superficielle, tandis que les triazolés sont préférés pour le traitement de la candidose invasive. Indépendamment de la famille à laquelle ils appartiennent, les azolés

agissent en inhibant l'activité de l'enzyme lanostérol-14 α -déméthylase (codée par le gène ERG11) impliquée dans la biosynthèse de l'ergostérol. En conséquence de cette inhibition, les cellules fongiques exposées aux azolés accumulent des stérols toxiques dans la membrane plasmique, affectant considérablement sa perméabilité (32).

IV.2.2. Les Polyènes

Les polyènes sont des composés naturels dérivés de la fermentation par Streptomyces. La nystatine, la natamycine et l'amphotéricine B sont trois principaux médicaments utilisés dans le traitement des mycoses (42). Cette classe de médicaments est fongicide et cible l'ergostérol dans la membrane plasmique. Ils se lient à l'ergostérol et forment des pores qui entraîne une fuite rapide d'ions monovalents (K^+ , Na^+ , H^+ et Cl^-) et la mort cellulaire fongique subséquente (43).

Les infections cutanées superficielles à Candida peuvent être traitées localement avec de l'amphotéricine B ou de la nystatine. La candidose cutanée congénitale peut se résoudre avec un traitement topique et oral à la nystatine (42).

La toxicité de tous les polyènes résulte de leur affinité pour le cholestérol, qui est l'homologue humain de l'ergostérol. Les effets secondaires toxiques de l'amphotéricine B incluent des frissons, de la fièvre, des maux de tête, des nausées et des vomissements, ainsi qu'une néphrotoxicité limitant la dose (42).

IV.2.3. Autres

D'autres antifongiques qui inhibent la croissance d'une grande variété de champignons mais ne sont pas utilisés pour traiter la candidose sont énumérés ci-dessous (43) :

- **Allylamines:** Ces antifongiques perturbent la membrane cellulaire en inhibant la squalène-époxydase, enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'ergostérol (35).
- **Morpholines:** Cette classe de médicaments comprend le fenpropimorphe, le tridémorphe et l'amorpholine. Ils ciblent l'enzyme de biosynthèse de l'ergostérol, la réductase stérol C-14. Les morpholines sont couramment utilisées en agriculture et présentent une forte toxicité chez les humains (42).

IV.3. Inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi cellulaire

IV.3.1. Les échinocandines

Les échinocandines sont regroupés dans une classe de composés antifongiques lipopeptidiques semi-synthétiques dérivés synthétiquement de lipopeptides naturels produits par *Aspergillus rugulovalvus*, *Zalerion arboricola* et *Papularia sphaerosperma* (42).

Les échinocandines constituent la seule nouvelle classe d'antifongiques découverte ces dernières années. Elles sont commercialisées sous trois formes : la caspofungine, l'anidulafungine et la micafungine utilisées par voie parentérale (41). La rezafungine et la bialfungine, ont récemment été décrites, mais leur utilisation en milieu clinique n'est pas encore établie, car leur efficacité est toujours en cours d'évaluation par des essais cliniques (32).

Les échinocandines agissent en inhibant les sous-unités catalytiques de la β -(1,3)-D-glucane synthase, essentielles à la synthèse de la paroi cellulaire. Par conséquent, aucune élongation de (1,3)- β -D-glucanes n'est observée dans les cellules fongiques exposées aux échinocandines, les rendant très sensibles à la lyse. Cette classe présente une efficacité contre toutes les espèces de *Candida*, bien que *C. parapsilosis* ait été trouvée intrinsèquement moins sensible. En raison de leur profil de sécurité et de leur activité fongicide, les échinocandines sont fréquemment utilisées comme traitement principal de la candidose invasive (32).

Ces médicaments sont généralement fongicides et sont couramment choisis car ils présentent une faible toxicité pour les humains. Ils sont généralement administrés aux patients atteints d'une maladie modérément grave à sévère ou aux patients ayant déjà été exposés aux azolés (43).

V. Résistance

Similairement aux antibiotiques pour les infections bactériennes, l'émergence de la résistance aux antifongiques parmi les espèces de *Candida* constitue une menace sérieuse pour la santé publique à l'échelle mondiale. Cependant, les agents pathogènes fongiques posent un défi particulièrement intéressant : en tant qu'hôte humain, les champignons sont également des eucaryotes et partagent donc de nombreux processus biochimiques similaires à leur hôte (44).

Parmi les différentes classes d'antifongiques, le pourcentage le plus élevé de résistance est observé pour les azolés. On pense que cette émergence croissante de résistance aux azolés

est liée à l'utilisation massive de fluconazole en prophylaxie chez les patients considérés à risque de contracter une infection causée par *Candida*. L'utilisation de fongicides agricoles structurellement similaires aux azolés cliniques a exercé une autre pression pour la sélection de souches de *Candida* plus tolérantes à cette classe médicamenteuse (32,33).

Le développement d'une résistance clinique est un processus complexe qui implique trois facteurs principaux (Figure 10) : les susceptibilités de l'hôte, le manque d'efficacité du médicament et la résistance fongique en raison de la surexpression des transporteurs d'efflux du médicaments (pompes) et de biofilms (45), qui restreignent l'entrée du médicament. Ensemble, ces trois facteurs contribuent collectivement à l'échec thérapeutique. Le mécanisme de résistance sera différent selon le mode d'action des composés antifongiques (35,44).

Le premier facteur englobe plusieurs situations conduisant à des susceptibilités de l'hôte, principalement liées à des altérations du système immunitaire. Les patients avec un système immunitaire compromis ont plus de chances de voir leur succès thérapeutique réduit, car certains antifongiques nécessitent l'assistance d'une réponse immunitaire robuste (44).

Le deuxième facteur est lié aux éléments affectant l'efficacité du médicament, où une thérapie appropriée nécessite que le médicament atteigne le site de l'infection à une concentration suffisante pour une action antifongique. Les variations de biodisponibilité du médicament en fonction des tissus cibles peuvent expliquer la différence de résultats des mêmes schémas thérapeutiques (44). En effet, la biodisponibilité du fluconazole a été démontrée être 12 fois plus basse dans la cavité vaginale que dans d'autres tissus, ce qui peut exposer les micro-organismes à des niveaux suboptimaux de médicaments, entraînant la sélection d'espèces résistantes (44).

Ainsi, la résistance fongique est directement liée à un manque d'efficacité du médicament, ce qui peut conduire à la persistance de cellules infectieuses capables de former des réservoirs ensemençant de nouvelles infections. La résistance fongique peut être définie comme la non-susceptibilité d'un agent pathogène fongique à un agent antifongique déterminée par des tests de susceptibilité *in vitro* comparés à d'autres isolats de la même espèce (44).

Le pathogène peut être soit une souche primairement résistante, résistante sans exposition préalable aux médicaments (également appelée résistance intrinsèque), soit, alternativement, le microbe peut acquérir un attribut ou un trait de résistance dans une souche par ailleurs susceptible après exposition au médicament (résistance acquise) (33,44).

Les mécanismes de résistance responsables des deux conditions sont bien caractérisés, en particulier ceux liés à la réduction du niveau intracellulaire du médicament, comprenant la présence de biofilm. La production de biofilms fongiques crée un refuge sûr pour les champignons et entraîne un haut niveau de résistance à la plupart des agents antifongiques (44).

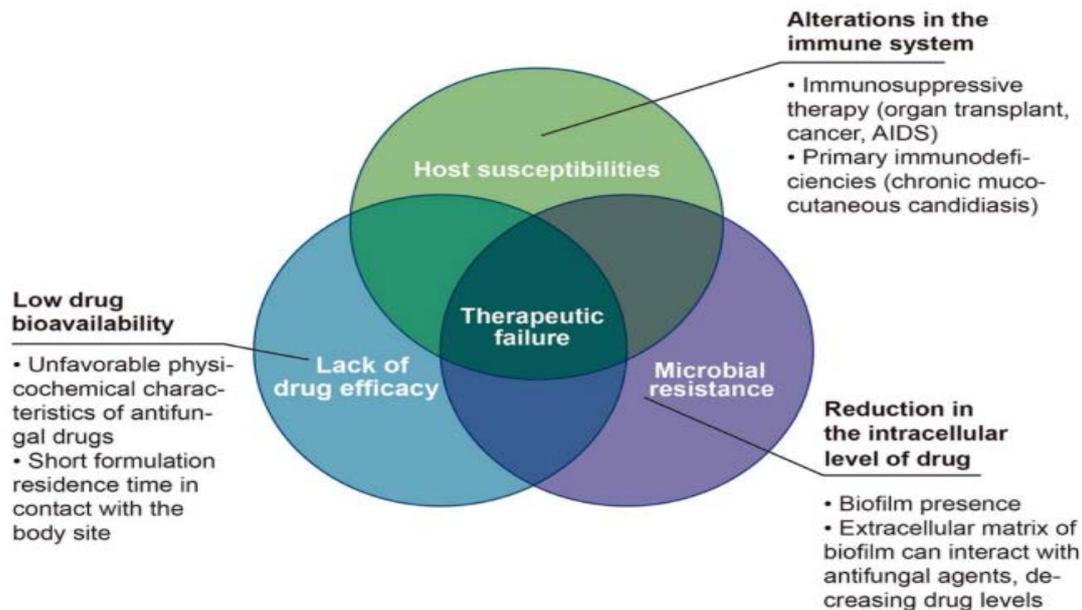


Figure 10 : Les trois principaux facteurs qui conduisent à la résistance clinique des antifongiques dans le traitement de la candidose superficielle (44).

Chapitre IV : Ethosomes

I. Nanotechnologie

En 1959, Feynman fut le premier physicien à introduire la notion de nanotechnologie dans la conférence intitulée "There's Plenty of Room at the Bottom". Ce concept a initié des développements novateurs dans le domaine de la nanotechnologie (46). de nombreuses recherches ont été consacrées au développement de systèmes de délivrance de médicaments à base de nanomatériaux, et le terme nanomédecine a été largement utilisé dans de nombreuses publications (47).

La nanotechnologie se définit comme l'étude des entités extrêmement petites et constitue essentiellement le centre de toutes les disciplines scientifiques, y compris la physique, la chimie, la biologie, l'ingénierie, l'informatique, l'électronique et la science des matériaux (46).

Les structures mesurées avec la nanotechnologie vont de 1 à 100 nm à l'échelle nanométrique. Les nanoparticules présentent différentes caractéristiques matérielles en raison de leur taille submicroscopique et offrent également des mises en œuvre pratiques dans un large éventail de domaines, notamment l'ingénierie, la délivrance de médicaments, la nanomédecine, la protection de l'environnement et la catalyse, ainsi que pour cibler des maladies telles que le mélanome et les maladies cardiovasculaires, les maladies de la peau, les maladies du foie et bien d'autres (46,47).

Les nanovecteurs, en raison de leur petite taille, ont le potentiel d'améliorer la délivrance spécifique au site et l'effet thérapeutique des médicaments souffrant de faible solubilité, de faible stabilité et de toxicité indésirable en modifiant leur distribution tissulaire et en améliorant leur pharmacocinétique (47).

II. Les nanopORTEURS

Malgré d'importants efforts de recherche et de développement dans les systèmes transdermiques et les avantages de ces voies, la faible perméabilité du stratum corneum limite l'utilité de la livraison de médicaments topiques. Pour surmonter cela, diverses méthodes ont été évaluées pour augmenter la perméabilité du stratum corneum. À ce jour, de nombreuses approches physiques et chimiques ont été appliquées pour augmenter l'efficacité du matériau à traverser la peau intacte (48).

Il existe différents types de nanopORTEURS, notamment ceux à base de lipides, de polymères et de tensioactifs. Ces dernières vont faciliter la délivrance cutanée en améliorant à

la fois la pénétration et la perméation à travers la couche cornée dans les traitements locaux et systémiques.

Parmi les nanopORTEURS à base de lipides on trouve des systèmes vésiculaires tels que :

- **Les liposomes:** composés d'une double couche lipidique renfermant une cavité aqueuse (49), Les liposomes une fois appliqués sur la surface de la peau, ils restent uniquement dans la couche supérieure du SC, agissant comme un réservoir de médicaments. Ainsi, en raison de leur nature instable et de leur faible perméabilité cutanée, ils conviennent uniquement à la délivrance topique de médicament (50–52).
- **Les niosomes:** composés de tensioactifs non ioniques et de composés amphiphiles conférant une charge neutre. Ils offrent une meilleure stabilité chimique et de stockage que les liposomes et permettent une délivrance contrôlée des composés actifs, favorisant une pénétration cutanée améliorée. Des études ont montré que les niosomes peuvent être utilisés pour améliorer la délivrance de médicaments anti-inflammatoires et favoriser la cicatrisation des plaies (53).
- **Les éthosomes :** (titre suivant)
- **Les transférosomes:** ce type de vésicule a été introduit pour la première fois en 1992, contenant un activateur de bord et des lipides à double chaîne (49). Les transférosomes se distinguent par leur capacité à traverser la barrière cutanée par différents mécanismes pour une perméation cutanée améliorée (54).
- **Les cubosomes :** sont des nanoparticules de phase cubique liquide qui offrent une alternative prometteuse aux liposomes conventionnels pour la libération de médicaments. Ils se caractérisent par leur capacité à s'auto-assembler dans une structure bi-continue avec des propriétés uniques. Les cubosomes sont généralement composés de systèmes binaires d'eau et de mono-oléate de glycéryle, ce qui les rend biodégradables. Ils présentent une grande compatibilité biologique et peuvent encapsuler efficacement des médicaments hydrophiles, lipophiles et amphiphiles. Des études ont montré leur efficacité dans le traitement des brûlures infectées, avec des résultats de guérison améliorés par rapport aux traitements conventionnels, et une meilleure tolérance par les patients (53).

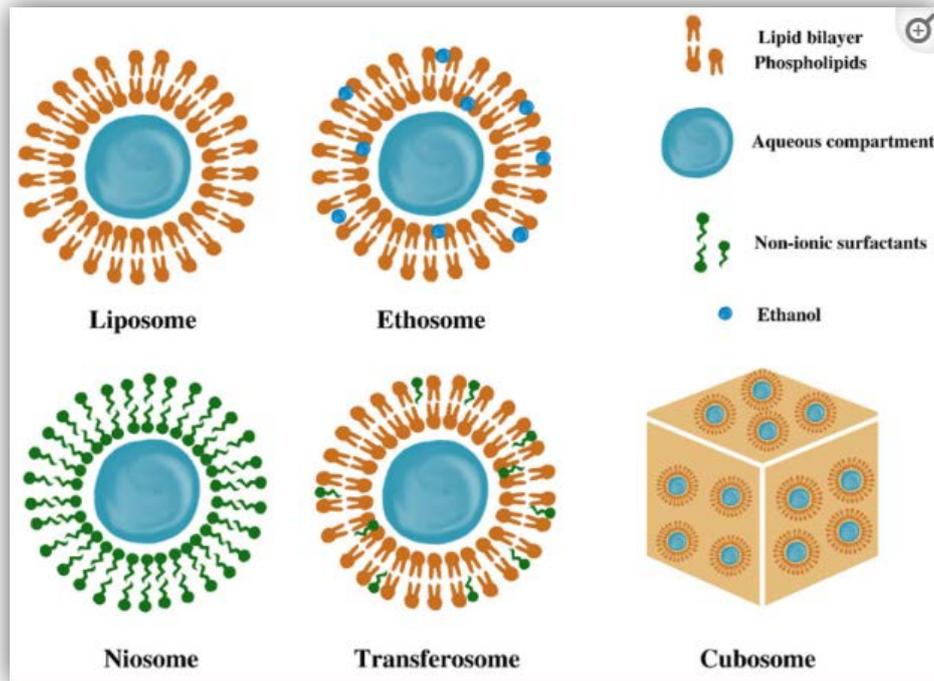


Figure 11 : Les principaux types de nanosystèmes vésiculaires (53).

III. Ethosomes

III.1. Définition

Constituent une forme modifiée de liposomes (49,50). Les éthosomes sont des vésicules lipidiques contenant des phospholipides, des concentrations relativement élevées d'alcools et de l'eau (49–51,54,55). La taille des éthosomes varie de quelques dizaines de nanomètres à des microns, ce qui les rend plus petits que les liposomes (50,52,55). Il s'agit d'un système intéressant qui présente des caractéristiques importantes liées à sa capacité à augmenter la perméabilité cutanée qui peut être due au mécanisme synergique entre une concentration élevée d'éthanol, des vésicules de phospholipides et des lipides cutanés (55). Les caractéristiques physico-chimiques des éthosomes permettent à ce vecteur vésiculaire de transporter de manière plus efficace les substances actives à travers la peau, tant en termes de quantité que de profondeur(52). Les éthosomes ont la capacité de piéger efficacement diverses molécules, telles que des molécules hydrophiles, lipophiles et amphiphiles. Cela s'explique par le degré élevé de lamellarité et la présence d'éthanol dans les vésicules, ce qui permet une meilleure solubilité de nombreux médicaments. De plus, les formulations éthosomales présentent une capacité de piégeage supérieure à celle des liposomes (50,55).

Il est connu que l'étape principale limitant la pénétration des médicaments à travers la peau est représentée par le stratum corneum (56). Dès lors les éthosomes sont devenus un domaine d'intérêt en recherche dans les formulations à base de plantes en raison de leur amélioration de la perméation cutanée (52).

Les médicaments d'origine végétale sont considérés comme sûrs en raison de leur origine naturelle. Même après avoir présenté des effets thérapeutiques prometteurs, la plupart des phytoconstituants échouent à atteindre une biodisponibilité en raison d'une absorption médiocre. Les grandes tailles moléculaires et les faibles solubilités lipidiques sont des facteurs importants provoquant une mauvaise absorption des phytoconstituants, entraînant une réduction de la biodisponibilité. L'incorporation de ces actifs végétaux ou extraits dans des vecteurs vésiculaires améliore considérablement leur absorption et, par conséquent, leur biodisponibilité. Ces nouveaux vecteurs ont été exploités à travers presque toutes les voies d'administration, la voie topique en étant une. De plus, les systèmes vésiculaires basés sur la voie topique d'administration ont déjà été utilisés dans les traitements médicaux pour améliorer la sécurité et la biodisponibilité des médicaments et également pour éviter l'effet de premier passage hépatique de l'administration orale (57).

III.2. Types et structure d'éthosomes

Sur la base des composants utilisés dans les formulations, les éthosomes se divisent en 2 types (58) :

- ✓ **Les éthosomes classiques** qui sont des modifications de liposomes contenant des phospholipides, de l'eau et une concentration élevée d'éthanol (58). En 2010, Zhou et al. Ajoutèrent un autre type d'alcool aux éthosomes classiques et présentèrent ainsi les **éthosomes binaires**. En plus de l'éthanol, les éthosomes binaires incluent dans leur formulation un autre alcool, généralement le propylène glycol (PG) et l'alcool isopropylique. Le PG est un agent de pénétration bien connu, offrant une faible toxicité, une irritation cutanée réduite, ainsi qu'une viscosité et une hygroscopicité supérieures par rapport à l'éthanol, conférant également une stabilité (49). Cela offre une approche novatrice pour administrer le tensioactif plus profondément dans la peau, en améliorant l'affinité du médicament pour la couche dermique et augmente la rétention du médicament dans les couches profondes de la peau (49,59).

La combinaison de l'éthanol avec d'autres alcools confère aux éthosomes binaires une taille de vésicule plus petite, une perméation cutanée plus élevée, une efficacité

d'encapsulation accrue et une stabilité améliorée, tout en minimisant l'agrégation. Néanmoins, il est très important d'ajuster le rapport entre l'éthanol et le PG afin d'optimiser la perméation du médicament (49).

- ✓ **Les transéthosomes** : sont une nouvelle génération d'éthosomes qui a été décrite par Song et al. (2012). Les transéthosomes partagent la même composition que les éthosomes, contenant en plus un agent de pénétration ou un activateur de bord (tensioactif). Des études antérieures ont rapporté des résultats améliorés par rapport aux éthosomes classiques. Les transéthosomes présentent une taille plus petite, une élasticité et une déformabilité supérieures, ainsi qu'une perméation cutanée améliorée, probablement en raison d'un effet synergique entre l'éthanol et le tensioactif, favorisant un réarrangement dans la bicouche lipidique de ces vésicules (49,58).

La figure suivante montre la structure du liposome et les différents types d'éthosomes (49).

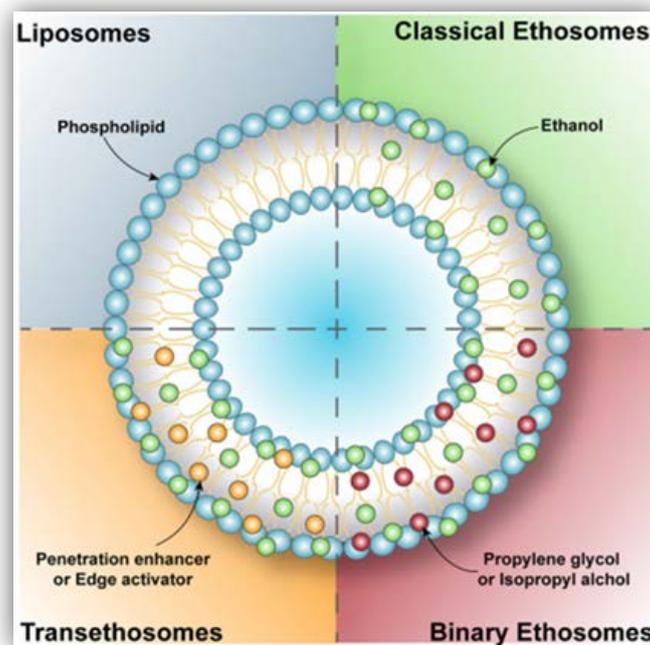


Figure 12 : Structure représentative de liposomes et des différents types d'éthosomes.

Les principales différences entre les différents éthosomes pour l'administration transdermique de médicaments sont présentées dans le tableau suivant (60) :

Tableau II : Différences entre les différents types d'éthosomes pour l'administration transdermique des médicaments (60).

N°	Paramètre	Éthosomes classiques	Éthosomes binaires	Transéthosomes
1	Composition	1. Phospholipides 2. Éthanol 3. Stabilisateur 4. Inducteur de charge 5. Eau 6. Médicament/agent	1. Phospholipides 2. Éthanol 3. Glycol propylénique (PG) ou autre alcool 4. Inducteur de charge 5. Eau 6. Médicament/agent	1. Phospholipides 2. Éthanol 3. Activateur de bord (tensioactif) ou améliorateur de pénétration 4. Inducteur de charge 5. Eau 6. Médicament/agent
2	Morphologie	Sphérique	Sphérique	Formes sphériques régulières ou irrégulières
3	Taille	Plus petite que les liposomes classiques	Égale ou plus petite que les éthosomes classiques	Taille basée sur le type et la concentration de l'améliorateur de pénétration ou de l'activateur de bord utilisé
4	Efficacité d'encapsulation	Supérieure aux liposomes traditionnels	Souvent supérieure aux éthosomes traditionnels	Supérieure à la majorité des éthosomes typiques
5	Permeation cutanée	Généralement supérieure aux liposomes traditionnels	Généralement comparable ou supérieure aux éthosomes traditionnels	Souvent supérieure aux éthosomes traditionnels
6	Stabilité	Plus robuste que les liposomes traditionnels	Plus stable que les éthosomes classiques	Aucune tendance claire n'a été trouvée

Le tableau ci-dessous met en évidence les constituants des différents types d'éthosomes ainsi que leurs intérêts (58) :

Tableau III : Constituants des éthosomes et leurs intérêts.

Classe	Types	Concentration %	Utilisation
Alcool	Éthanol	20-50%	Améliore la perméation
Autres alcools	Alcool isopropylique (IPA)	5-20%	Dans la préparation d'éthosomes binaires avec de l'éthanol, améliorants de la perméation efficace
Glycols	Glycol propylène (PG)		
Phospholipides	Phospholipon 90G, 90H, 80H, Lipoid S100, S75, S75-3, E80, soja phosphatidylcholine (SPC50)	0.5-10%	Agents de formation de vésicules
Cholestérol		0.1-1%	Fournir une stabilité et une rigidité vésiculaires
Activateur de bord	Tween 60, 80, 20 Span 80, 60, 40, 20 Cremophor RH-40	10-50% de la concentration totale de phospholipides	Dans la formulation de transéthosomes pour augmenter la perméabilité cutanée
Améliorants de pénétration	Acide oléique L-Menthol DMSO SPACE (peptide pénétrant la peau et entrant dans les cellules)	0.5- 3 3 10 2-10 mg/ml	Dans la formulation de transéthosomes comme améliorants de la pénétration

III.3. Mécanisme de pénétration

La recherche a régulièrement démontré que les liposomes classiques ne peuvent pas pénétrer dans les couches les plus profondes de la peau.

Par conséquent, le nouveau système éthosomal permet une libération améliorée des ingrédients actifs (49). Afin d'élucider les mécanismes impliqués dans la pénétration des éthosomes, Tuitou et ses collaborateurs ont dosé les phospholipides et l'éthanol qui pourraient pénétrer les couches cutanées murines sur 24 heures d'exposition aux éthosomes. Étonnamment, 10,5 % des phospholipides et 2 % de l'éthanol ont été retrouvés dans toutes les couches de la peau et ont été facilement dosés dans le compartiment récepteur de la cellule de diffusion de Franz (60).

De nombreux facteurs influent sur la distribution des médicaments dans la peau à partir de vésicules appliquées topiquement. La taille des vésicules et l'efficacité d'encapsulation sont des paramètres importants régissant la distribution topique des médicaments. Les vésicules les plus petites pénètrent facilement dans les couches les plus profondes de la peau. La concentration de phospholipides et d'éthanol affecte la taille des éthosomes. Il a été constaté qu'une augmentation de la concentration en éthanol diminue la taille des éthosomes, tandis qu'une augmentation de la concentration en phospholipides augmente la taille des vésicules (58).

Bien que l'éthanol soit largement connu comme un améliorant de la perméation, des études antérieures ont montré une amélioration de la perméation des ingrédients actifs induite par les éthosomes, comparativement aux solutions hydro-éthanoliques. Cela suggère un effet synergique causé par l'interaction entre l'éthanol et la bicouche lipidique présente à la fois dans la couche cornée et dans les éthosomes (49,50,60).

La première étape de pénétration des éthosomes est appelée « l'effet de l'éthanol », au cours duquel l'éthanol perturbe la conformation des lipides de la couche cornée, qui sont extrêmement compactés et ordonnés dans des circonstances physiologiques. L'interaction de l'éthanol avec la région de la tête polaire des lipides augmente la fluidité des lipides et diminue la densité de la multicouche lipidique, conférant ainsi aux vésicules des caractéristiques souples et flexibles qui leur permettent de pénétrer dans les couches plus profondes de la peau (49,58,60). Il est à noter que la teneur en éthanol semble influencer significativement le flux de perméation des éthosomes. De manière générale, plus la teneur en éthanol est élevée, plus le flux de perméation est important (60). L'effet de l'éthanol est suivi par « l'effet éthosomal ». Ces vésicules souples et malléables pénètrent plus facilement dans les bicouches lipidiques de la couche cornée désorganisées. La libération des médicaments se produit par fusion de ces vésicules dans les couches les plus profondes de la peau (49,58).

Un mécanisme plausible supplémentaire suggère le passage des éthosomes par la voie folliculaire. À ce jour, aucune preuve corroborant ce dernier n'a été rapportée dans la littérature (60).

En conclusion, l'effet de l'éthanol sur les lipides de la couche cornée et sur la fluidité des vésicules, ainsi que la possibilité d'interaction des éthosomes avec la couche cornée, peuvent conduire à une distribution supérieure des médicaments (58). Le mécanisme de la pénétration des médicaments à travers la peau par les éthosomes est illustré dans la figure 13 ci-dessous :

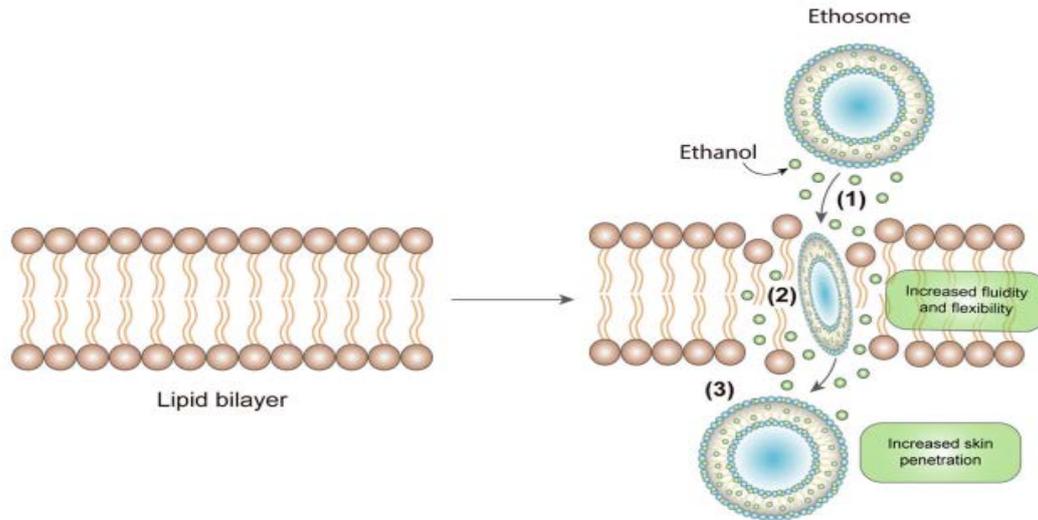


Figure 13: Représentation schématique du mécanisme de perméation cutanée des éthosomes (49).

- 1) La teneur en éthanol des éthosomes perturbe l'organisation des lipides de la couche cornée ;
- 2) L'éthanol confère aux éthosomes une fluidité et une flexibilité accrues ;
- 3) Les éthosomes présentent une pénétration améliorée à travers les couches plus profondes de la peau (49).
- 4) Les éthosomes présentent une pénétration améliorée à travers les couches plus profondes de la peau (49).

III.3.1. Avantages et inconvénients

La livraison de médicaments par voie cutanée présente des avantages significatifs par rapport aux méthodes de distribution traditionnelles. Tout d'abord, elle permet d'éviter le métabolisme de premier passage, assurant ainsi une biodisponibilité accrue des médicaments. De plus, cette méthode offre une durée d'action prévisible et prolongée, ce qui contribue à une meilleure observance du traitement par les patients. De par sa capacité à cibler les sites d'action locaux ou systémiques, la livraison cutanée présente également l'avantage d'améliorer l'efficacité pharmacologique tout en réduisant les effets indésirables (48,49,60).

D'autre part, la technologie des éthosomes présente des avantages spécifiques dans le domaine de la livraison de médicaments. Les éthosomes permettent une administration efficace de protéines et de peptides, offrant ainsi une plus grande polyvalence dans le choix des médicaments à livrer. De plus, leur capacité à pénétrer facilement la peau et à transporter des ingrédients actifs dans les couches profondes en fait une option prometteuse pour les applications pharmaceutiques, cosmétiques et vétérinaires. L'observance élevée des patients

avec cette technologie est également un avantage clé, favorisée par l'administration sous forme de gel ou de crème, ce qui améliore la conformité du patient (60).

Cependant, malgré ces avantages, la livraison de médicaments par éthosomes présente certaines limitations. Notamment, des niveaux accrus de médicaments sont souvent nécessaires, ce qui peut limiter l'utilisation de composés moins puissants. De plus, la solubilité du médicament doit être adéquate pour permettre une pénétration cutanée efficace, et tous les types de peau ne réagissent pas de manière optimale à cette méthode de livraison. En outre, des préoccupations concernant le coût et le rendement limité peuvent également limiter la viabilité commerciale des éthosomes (60).

En conclusion, la livraison de médicaments par éthosomes présente des avantages significatifs, notamment une meilleure pénétration cutanée et une observance accrue des patients. Cependant, ces avantages doivent être pesés contre les limitations telles que les exigences de dosage élevées et les préoccupations liées à la solubilité du médicament et à la variabilité de la réponse cutanée.

Partie Pratique

Matériels et méthodes

Problématique et objectifs

Ce chapitre se concentre sur la mise en pratique des différentes techniques expérimentales utilisées dans cette étude, visant à surmonter les divers problèmes liés à l'utilisation des antifongiques conventionnels tels que l'aggravation de phénomène de résistance et les défis de pénétration au niveau de la couche cornée (SC).

L'objectif central de notre étude, est d'évaluer l'activité antifongique de l'huile essentielle *Citrus aurantium* sous sa forme libre et encapsulée dans des éthosomes.

Notre travail de recherche poursuit également ces objectifs secondaires :

1. Valoriser notre patrimoine végétal, en particulier l'utilisation de *Citrus aurantium* L.
2. Procéder à l'extraction de l'huile essentielle et à sa caractérisation physico-chimique.

Cette étude vise à démontrer que l'encapsulation de l'huile essentielle de petit grain bigarade dans des éthosomes peut offrir une solution innovante et efficace pour pallier les limitations des antifongiques conventionnels.

I. Matériel, matières biologiques et produits chimiques utilisés

I.1. Matériel

I.1.1. Verreries et outillage :

- Eprouvette 1000ml.
- Erlen Meyer 2000ml.
- Tubes en verre stériles.
- Flacons en verre.
- Entonnoir.
- Bec bunsen.
- Boîtes de Pétri.
- Anse de platine.
- Micro pipette (100 μ L, 1000 μ L) + embouts.
- Pipettes Pasteur.
- Eau distillée stérilisée.
- Microplaques à 96puits.

Matériels et méthodes

I.1.2. Equipements

Appareillage	Références
Balance analytique	OHAUS Pioner
Autoclave vertical	Raypa
Agitateur magnétique chauffant	yellow line MSH basic
Four "Pasteur	
Etuves réglées à 30 °C et 35°C	Memmert
Colorimètre	WPA CO7500
Vortex	ISOLAB
Lecteur de microplaques à 96 puits	BioTek Elx808
Réfractomètre numérique	RX-5000i-plus ATAGO
Hydrodistillateur Clevenger.	
Appareil d'hydro-diffusion semi industriel	INOX pro (made in Algeria)
Agitateur à plaque chauffante	OVAN
Ultrasonicateur	Haver USC
Centrifugeuse	Sigma 2-16K
Spectrophotomètre	Optizen
Zetasizer	MALVERN

I.2. Matériel biologiques

I.2.1. Matériel végétal

Feuilles d'oranger amer *Citrus aurantium* L.



Figure 14 : Arbre et feuilles de l'oranger amer.

- Identification de la plante



C'est un rameau de bigaradier (*Citrus aurantium* L.) d'après la clé de Rebour H 1950 les agrumes en Afrique du nord. Union des syndicats de producteurs d'agrumes d'Algérie.

KAZI TANI Choukry, Mtr. De Conf, Univ AbouBekr Belkaïd Tlm.(kazi_tc@yahoo.com).

I.2.2. Les souches fongiques

L'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* a été évaluée sur trois souches fongiques au total, deux d'entre elles proviennent de l'American Type Culture Collection ATCC (ATCC 26 ; ATCC 10 10), et la troisième a été isolée d'une onychomycose

et a été identifiée par le service de parasitologie du CHU de Tlemcen. Il s'agit de *Candida albicans*.

I.2.3. Milieux de culture

- Milieu Sabouraud Dextrose.
- Milieu Potato Dextrose Agar PDA.
- Milieu BHIB (brain heart infusion).

I.2.4. Matières premières

- Emulsifiant : L'émulsifiant utilisé c'est le Diméthyle Sulfoxyde (DMSO), qui est un solvant organique polaire miscible à l'eau et utilisé pour la dilution des huiles essentielles testées et pour avoir une meilleure diffusion des huiles dans le milieu. Le DMSO est inerte sur l'activité antifongique(61).
- L'antifongique pris comme témoin dans notre étude est le Fluconazole provenant de chez MERINAL.
- Lécithine de soja (acheté chez Aroma Zone N°Lot : 21 EMU0065/2-00969).
- Cholestérol 95% C₂₇H₄₆O.
- Ethanol absolu.
- Eau distillé.

II. Méthodes

II.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction de l'huile essentielle a été faite par hydrodistillation et entrainement à la vapeur d'eau. Les feuilles du bigaradier ont été récoltées dans les régions d'Ain Defla et Abou Tachfine (Brea) Tlemcen en Algérie. Les coordonnées géographiques du lieu de la récolte sont respectivement [34°54'46.3"N 1°17'23.7"W], [WM3F+4QX Tlemcen]. Les échantillons ont ensuite été acheminés au laboratoire de chimie organique, substances naturelles et analyse « COSNA », où a eu lieu l'extraction.

II.1.1. Extraction de l'HE de petit grain bigarade par entrainement à la vapeur d'eau

- ✓ Quantité récoltée : 4210 grammes.
- ✓ Extraction proprement dite :
 - Remplissage de l'alambic par les feuilles préalablement découpées.
 - Remplissage du condensateur de vapeur par de l'eau distillée.

- Montage et mise en marche de l'appareil.
- Durée de l'extraction : 2 jours.
- Récupération de l'huile essentielle mélangée à l'hydrolat dans des flacons en verre couverts de papier aluminium.
- Congélation des flacons, puis récupération de l'huile essentielle dans des flacons opaques à l'aide d'une pipette pasteur.
- Pesée de l'huile essentielle à l'aide d'une balance analytique.
- Calcul du rendement.
- Conservation de l'huile essentielle au réfrigérateur à 4°C.



Figure 15: Appareil semi-industriel d'entraînement à la vapeur d'eau.

II.1.2. Extraction de l'HE de petit grain bigarade par hydrodistillation

Nous avons réalisé plusieurs extractions par hydrodistillation. Le protocole pour chaque extraction était le suivant :

- Quantité récoltée : 600 grammes.
- Extraction proprement dite :
 - Remplissage du ballon par les feuilles soigneusement nettoyées.
 - Ajout de 3000 ml d'eau distillée.
 - Montage et mise en marche de l'appareil.
 - Durée de l'extraction : 3heures à partir de la première goutte.
 - Récupération de l'huile essentielle mélangée à l'hydrolat dans des flacons en verre couverts de papier aluminium.

- Congélation des flacons, puis récupération de l'huile essentielle dans des flacons opaques à l'aide d'une pipette pasteur.
- Pesée de l'huile essentielle à l'aide d'une balance analytique.
- Calcul du rendement.
- Conservation de l'huile essentielle au réfrigérateur à 4°C.



Figure 16 : Appareil d'hydrodistillation « dispositif de Clevenger ».

II.1.3. Détermination du rendement des différentes extractions

Le rendement en huiles essentielles (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). le rendement est exprimé en pourcentage par la formule suivante(62) :

$$\text{RHE}\% = (M'/M) \times 100$$

Avec :

- RHE : Rendement en huile essentielle en %
- M' : Masse d'huile essentielle en gramme.
- M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme.

II.2. Analyse de l'huile essentielle des feuilles de Bigaradier

II.2.1. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques : aspect, odeur, couleur des huiles essentielles obtenues sont notés.

II.2.2. Propriétés physiques

II.2.2.1. Densité relative

La densité relative à 20°C est le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile essentielle à 20°C à la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20°C selon ISO 279 :1998 F Essential oils — Determination of relative density at 20 °C — Reference method. Cette grandeur est sans dimension et son symbole est $d_{20\ 20}$:

$$d_{20\ 20} = m_1/m_2$$

m_1 : masse en gramme de l'huile essentielle.

m_2 : masse en gramme de l'eau.

L'évaluation de la densité sert d'indicateur pour mesurer la pureté d'une huile, dépendant de sa composition chimique et des variations de température.

- **Méthode**

La manipulation a été effectuée au sein du laboratoire de chimie organique, substances naturelles et analyse "COSNA".

Le protocole se déroule comme suit :

- Mesurer la température ambiante.
- Peser le flacon vide, puis tarer l'appareil.
- Prélever un volume d'1 ml d'eau à l'aide de la micropipette.
- Effectuer la pesée de ce volume dans le flacon vide et enregistrer la masse comme m_1 .
- Répéter la même opération en remplaçant l'eau par l'huile à caractériser et enregistrer la masse comme m_2 .
- Répéter l'ensemble de ces démarches trois fois pour assurer la précision des résultats.

Il est à noter que la mesure de la densité relative a été effectuée sur l'huile extraite par hydrodistillation et celle extraite par entraînement à la vapeur d'eau pour une comparaison exhaustive.

II.2.2.2. Indice de réfraction

L'indice de réfraction d'un milieu rapporté à l'air est égal au rapport du sinus de l'angle d'incidence d'un rayon lumineux dans l'air, au sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré à une température de référence (63). La température de référence est de 20°C, sauf pour les huiles essentielles qui ne se trouvent pas à l'état liquide à cette température, et la longueur d'onde de référence est la raie D du sodium ($\lambda=589$ nm).

L'indice de réfraction (IR) est utilisé :

- ✓ Pour identifier une huile essentielle.
- ✓ Comme critère de pureté des huiles essentielles.
- ✓ Pour vérifier la qualité de distillation.



Figure 17: Réfractomètre numérique modèle RX-5000i-plus ATAGO.

• Méthode

La mesure a été réalisée au laboratoire d'hydro-bromatologie, département de pharmacie, faculté de médecine, Tlemcen.

Le protocole opératoire est le suivant :

- Un nettoyage préalable de l'appareil à l'éthanol est nécessaire avant de débiter toute mesure.
- L'étalonnage du réfractomètre est vérifié en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée qui est de 0,00% en °Brix.
- Dépôt de quelques gouttes d'huile essentielle sur la partie centrale du prisme principal.
- La lecture de la mesure, affichée sur l'écran, se fait à une température stable de 20°C.

II.2.3. Propriétés chimiques

II.2.3.1. Indice d'acide

L'indice d'acide d'une huile végétale est le nombre de mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides gras libres (AGL) contenus dans 1 g de corps gras. Il mesure la quantité d'AGL présents dans la matière grasse (64).

- **Principe**

La détermination de l'indice d'acide est basée sur le titrage des acides gras libres présents dans une prise d'essai à l'aide d'une solution d'hydroxyde de potassium en milieu non aqueux, selon l'équation suivante :



- **Mode opératoire**

- Peser 1gr d'huile essentielle dans une fiole conique.
- Ajouter 5ml d'éthanol à 95% et 5 gouttes de phénolphtaléine (PP) à 0.2%.
- Titrer à l'aide de la solution alcoolique de KOH (0.1N) jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle persistante durant au moins 10s.

L'indice d'acide est donné par la formule suivante :

$$\text{Ia} = V \times C \times \frac{56.11}{m}$$

Où :

- 56,11 : Masse molaire, exprimée en grammes par mole, de l'hydroxyde de potassium.
- V : Volume, en millilitres, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisé.
- C : Concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée.
- m : Masse, en grammes, de la prise d'essai.

II.2.3.2. Indice d'ester

L'indice d'ester d'un lipide est la masse d'hydroxyde de potassium (KOH), exprimée en milligrammes, nécessaire pour saponifier les acides gras estérifiés contenus dans un gramme de corps gras.

- **Mode opératoire**

- Peser 5ml d'huile essentielle dans un ballon puis ajouter 15ml de potasse alcoolique de concentration (0,5N).
- Adapter le réfrigérant ascendant. Agiter pour dissoudre et porter à l'ébullition au bain-marie bouillant pendant 30minutes. La réaction de saponification est terminée lorsque la solution est devenue transparente et homogène.
- Après refroidissement, Ajouter 5 gouttes de phénolphaléine.
- Titrer l'excès de potasse par l'acide chlorhydrique de concentration 0,5 N tout en agitant constamment jusqu'à décoloration de la solution.
- On effectue dans les mêmes conditions un essai à blanc.

L'indice d'ester est calculé selon la relation suivante :

$$IE = 28,05 / m \times (V0 - V1)$$

- V0 : Volume en ml de HCl utilisé pour l'essai à blanc.
- V : Volume en ml de HCl utilisé pour l'échantillon à analyser.
- m : Prise d'essai en grammes.
- N : Normalité de la solution d'HCl.

II.2.3.3. Indice de saponification

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides gras libres et saponifier les acides gras combinés (esters) présents dans un gramme de corps gras (64).

L'indice de saponification est la somme de l'indice d'acide et l'indice d'ester, d'après la relation suivante :

$$IS=IA+IE$$

II.3. Evaluation de l'activité antifongique de l'HE de petit grain bigarade

La recherche de l'activité antifongique consiste à estimer l'inhibition de croissance des micro-organismes par l'utilisation de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*. La détermination du pouvoir antifongique de l'huile est réalisée vis-à-vis de trois souches de *Candida Albicans* en appliquant la méthode de diffusion sur disque et la méthode de microdilution.

Matériels et méthodes

La manipulation a eu lieu dans le laboratoire de microbiologie appliqué à l'agro-alimentaire au biomédical et à l'environnement (LAMAABE).

- **Méthode**

II.3.1. Préparation des milieux

- Milieu Sabouraud Dextrose :15g/500ml d'eau distillée.
- Milieu Potato Dextrose Agar (PDA) :21g/500ml d'eau distillée.
- Les milieux obtenus ont été mis dans des flacons en verre.
- Stérilisation à l'autoclave des deux milieux (PDA et Sabouraud Dextrose), répartis sur 06 flacons avec 02 flacons d'eau distillée à 121°C pendant 60 min.
- Stérilisation au four pasteur des tubes en verre et des pipettes pasteur.

II.3.2. Mise en culture des souches

- La revivification des 3souches de *Candida albicans* s'est faite par ajout d'un milieu liquide BHIB au milieu de conservation contenant les souches et incubation à 37°C pendant 24h.

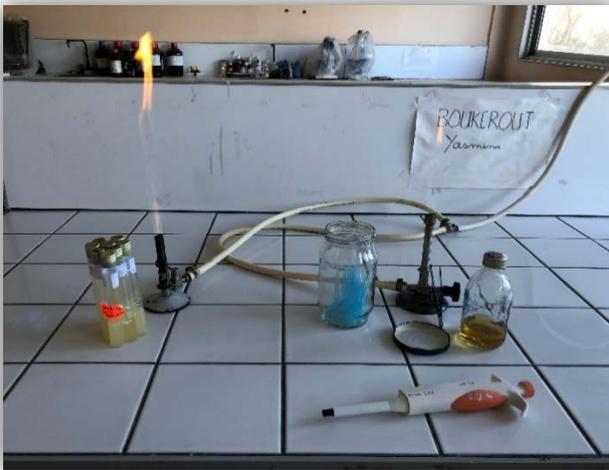


Figure 18 : Revivification des souches et leur incubation.

- L'inoculum de chaque souche a été repiqué par la suite sur des boîtes de Pétri remplies de PDA, ensemencé par méthode d'épuisement puis incubé à 30°C pendant 48h. Les cultures jeunes isolées obtenues ont servi ultérieurement pour la préparation des solutions fongiques.



Figure 19: Repiquage des souches sur boîtes de pétri.

II.3.3. Préparation des suspensions fongiques

Les suspensions fongiques ont été préparées à partir des colonies isolées des boîtes de pétri, une colonie de chaque souche a été prélevée à l'aide d'une anse de platine pour être déchargée dans des tubes contenant le bouillon Sabouraud dextrose, puis incubées à 37°C pendant 24h.

Une mesure de la turbidité a été réalisée à l'aide d'un colorimètre, afin d'obtenir une turbidité comprise entre 0.08 et 0.1 ($\lambda=590\text{nm}$) ce qui correspond à une concentration de 10^8 UFC/ ml.



Figure 20: Mesure de la densité optique à l'aide du colorimètre.

II.3.4. Méthodes d'étude du pouvoir antifongique des huiles essentielles

II.3.4.1. Diffusion sur milieu solide par la technique des puits

Matériels et méthodes

La technique des puits est l'une des méthodes de diffusion en milieu solide la plus utilisées et la plus simple pour évaluer l'activité antifongique des HE. Le principe de cette technique repose sur la création des puits creusés stérilement sur la gélose ensemencée. Après incubation, à une température optimale de croissance du germe, il se produit un développement des colonies. La formation d'un halo clair autour du puits indique l'absence de croissance fongique dont le diamètre dépend de la sensibilité à l'extrait testé (65).

Le milieu de culture utilisé était le PDA coulé en boîtes de Pétri. Ensuite, 10 µL de chaque suspension de *Candida* est étalé à la surface de la gélose par méthode des quatre quadrants. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrés. L'opération est répétée quatre fois en tournant la boîte de 90° à chaque fois.

Après séchage, quatre puits sont réalisés au niveau des boîtes pour y introduire 50 µl de l'huile essentielle, 50 µl de Fluconazole dilué au ½ et 50 µl de Fluconazole dilué au ¼ utilisés comme contrôles positifs, et 50 µl de DMSO utilisé comme contrôle négatif.

Deux boîtes de pétri ont été réalisées pour chaque souche, enfin, après une fermeture hermétique des boîtes de Pétri, celles-ci sont mises dans une étuve à 30°C pendant 48h.

L'effet de l'HE des feuilles de *Citrus aurantium* sur la cible est déduit par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

Les résultats sont exprimés et peuvent être représentés par des symboles + ou - en fonction de la sensibilité des souches à l'huile essentielle (66) :

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

II.3.4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

a. Préparation de l'HE

100 µl de l'HE à tester sont placés dans un tube à hémolyse contenant 900 µl de DMSO puis homogénéisés en utilisant un Vortex afin d'obtenir 1ml d'un mélange à 10% V/V.

b. Méthode de microdilution

Le test de micro-dilution dans des microplaques à 96 puits a été utilisé pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), utilisant comme témoin positif le Fluconazole. Elle consiste à réaliser une gamme décroissante de concentration en HE dans des

puits (67) contenant un milieu liquide (Sabouraud Dextrose) ainsi qu'une quantité de suspension fongique, cette technique s'effectue comme suit:

Un volume de 100 μL du milieu Sabouraud Dextrose a été déposé dans 6 rangées des puits de la microplaque. La première rangée contenant uniquement le milieu de culture et la seconde uniquement le DMSO servant de témoin négatif. Pour l'HE un volume de 100 μL du mélange à 10% V/V a été déposé dans les premiers puits de la 3^{ème} et 4^{ème} rangée suivi de 100 μL de la solution mère de Fluconazole de concentration égale à 128mg/mL dans les 1ers puits de la 5^{ème} et 6^{ème} rangée respectivement. L'opération a été répétée deux fois pour chaque échantillon pour une reproductibilité des résultats.

Après mélange dans les puits contenant l'HE et ceux contenant le Fluconazole, 100 μl ont été prélevés et déposés dans le puits suivant ainsi de suite jusqu'au 10^{ème} puits de sorte à obtenir une gamme de concentration décroissante (dilution au $\frac{1}{2}$). Ensuite, 20 μL de la suspension fongique de densité équivalente à 10^8 CFU/ml ont été ajoutés dans chaque puits contenant les échantillons, ainsi que dans les puits de la 6^{ème} rangée servant de témoin positif.

Les microplaques ont été incubées à 30 °C pendant 48 heures.

La CMI envers une souche est la concentration des échantillons dans le dernier puits n'ayant pas montré de croissance fongique.

Selon Koba (68), On peut classer le pouvoir inhibiteur d'une huile essentielle par rapport à une souche selon les catégories suivantes :

- CMI < 50 $\mu\text{l/ml}$: pouvoir inhibiteur excellent.
- 50 $\mu\text{l/ml}$ < CMI < 250 $\mu\text{l/ml}$: pouvoir inhibiteur intéressant.
- 250 $\mu\text{l/ml}$ < CMI < 500 $\mu\text{l/ml}$: pouvoir inhibiteur faible.
- CMI > 500 $\mu\text{l/ml}$: pouvoir inhibiteur nul.

II.4. Préparation des éthosomes

La manipulation a eu lieu dans le laboratoire de pharmacie galénique département de pharmacie- la faculté de médecine de Tlemcen Dr Benzerdjeb Benaouda – université Abou Bekr Belkaid.

II.4.1. Formulation des éthosomes

La préparation de différents types d'éthosomes se fait à travers des processus simples et facilement réalisables, sans nécessiter un équipement complexe et sophistiqué. La méthode à

chaud et la méthode à froid sont deux techniques souvent utilisées pour préparer des éthosomes (60), mais d'autres méthodes ont également été rapportées, telles que la méthode classique de dispersion mécanique et la méthode de gradient de pH transmembranaire (49).

- **Méthode à froid**

La méthode à froid est un procédé largement utilisé pour la préparation d'éthosomes, se déroulant en deux étapes distinctes :

Dans la première étape, la phase organique est préparée en dissolvant les phospholipides et d'autres composants lipidiques dans de l'éthanol à température ambiante. Ce mélange est ensuite vigoureusement agité et chauffé à 30 °C dans un bain-marie. Parallèlement, la phase aqueuse est préparée en chauffant de l'eau à la même température (30°).

Une fois la phase organique prête, la phase aqueuse est introduite à un débit constant, tout en continuant l'agitation pendant cinq minutes. Le mélange est ensuite refroidi à température ambiante, puis soumis à une sonication ou à une extrusion pour obtenir la taille de vésicules désirées. Enfin, la formulation finale est conservée dans des conditions réfrigérées. Cette méthode offre la flexibilité d'incorporer l'ingrédient actif soit dans la phase organique, soit dans la phase aqueuse, en fonction de ses propriétés physico-chimiques (49,60,69).

II.5. Mode opératoire

II.5.1. Préparation des éthosomes à blanc

Les éthosomes ont été préparés en utilisant la méthode à froid.

Afin de connaître la formule optimale, des formules ont été préparées à blanc en variant les paramètres suivant (Tableau IV) :

Le système éthosomal est composé de 2 à 5% de phospholipides, de 20 à 50% d'éthanol et de phase aqueuse pour atteindre 100% en poids. Les quantités correspondantes sont exprimées dans le tableau IV.

- **Paramètres de formulation**
 - Ethanol : 20%, 35% et 50%.
 - Phospholipide : 2%, 3.5% et 5%.
- **Paramètres de procédé**
 - Temps de sonication : 15min ,22.5min et 30min.

Matériels et méthodes

Tableau IV : Composition des formulations à blanc.

		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Paramètre de formulation	Ethanol	20%	35%	50%	20%	35%	50%	20%	35%	50%
	Phospholipide Lécithine de Soja	2%	2%	2%	3.5%	3.5%	3.5%	5%	5%	5%
Paramètre de procédé	Temps de sonication (min)	15	15	15	15	15	15	15	15	15
		22.5	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5
		30	30	30	30	30	30	30	30	30

Pour commencer, nous avons procédé à la pesée précise de l'éthanol et du phospholipide (lécithine de soja) selon les quantités requises. Ensuite, le mélange ainsi obtenu a été placé dans un bain-marie, monté sur un agitateur à plaque chauffante réglée à 700 rpm, à une température constante de 30°C, et ce pendant une durée de 10 min. Pour éviter toute évaporation, le mélange a été soigneusement couvert avec de la paraffine.

Simultanément, nous avons chauffé la quantité nécessaire d'eau distillée (q.s.p ...10ml) jusqu'à atteindre une température de 30°C. Une fois les 10min se sont écoulées, nous avons procédé à l'ajout de l'eau distillée, goutte à goutte, à la solution d'éthanol et de phospholipide, tout en maintenant une agitation constante et cela de façon continue pendant une durée de 15 min. Après l'ajout complet de l'eau distillée, l'agitation a été poursuivie à une vitesse de 700 rpm à température ambiante, pendant une durée supplémentaire de 5 minutes.

La formulation a été ensuite laissée à température ambiante, pendant une période de 30 minutes. Une fois ce temps écoulé, chaque formulation a été soumise à une sonication, respectivement pendant 15, 22.5 et 30 minutes, obtenant ainsi un total de 27 formulations distinctes.



Figure 21: Préparation de la phase organique de la formule.



Figure 22: Ultrasonication.

II.5.2. Préparation des éthosomes en additionnant le cholestérol

Nous avons choisi trois formulations optimales, sélectionnées en fonction de la taille des particules et du potentiel zêta : F1 (22,5 minutes), F2 (15 minutes) et F2 (22,5 minutes).

Les formulations ont été préparés à nouveau en ajoutant 0,5% de cholestérol (0,05 g) à chaque formulation afin d'améliorer la stabilité des particules.

Le processus de préparation des formulations est similaire à celui précédemment décrit (méthode à froid), à la différence que la masse de cholestérol a été dissoute dans l'éthanol avant son incorporation dans le mélange.

Tableau V: Composition des éthosomes additionnés de cholestérol

Formulation	F1	F2	F2
Ethanol	20%	35%	35%
Phospholipide	2%	2%	2%
Cholestérol	0.5%	0.5%	0.5%
Eau distillé	Q.s.p 100%	Q.s.p 100%	Q.s.p 100%
Temps de sonication	22.5min	15min	22.5min

II.5.3. Préparation des éthosomes classiques contenant HE de *Citrus aurantium*

Après mesure de la taille des particules et le potentiel zéta ; la F2 (15min) est sélectionnée comme la formule optimale.

Nous avons préparé des formules avec une variabilité de concentrations d'huile essentielle (Tableau VI).

Tableau VI: concentration de l'HE dans les éthosomes classique.

Formulation	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
CMI	×0.25	×0.5	CMI	×1.5	×2.5	×5	×10	×15	×25
Concentration [HE] mg/ml	1.32	2.65	5.3	7.95	13.25	26.5	53	79.5	132.5
Masse en HE (g)	0.0132	0.0265	0.053	0.0795	0.1325	0.265	0.53	0.795	1.325

II.6. Caractérisation des éthosomes

II.6.1. Principe de système d'analyse Zetasizer

Le système d'analyse Zetasizer fonctionne sur la base de deux principes : la détermination de la taille des particules et la mesure du potentiel zéta.

- **La taille**

La taille des particules est l'un des paramètres clés influençant le comportement des nanoparticules dans le système biologique. Le Zetasizer est utilisé pour sa mesure avec la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS), qui est une méthode spectroscopique non destructive. Lorsque les particules sont exposées à un faisceau lumineux, la lumière se diffuse dans différentes directions en fonction de la taille des particules. L'appareil mesure

ensuite l'intensité de la lumière diffusée à différents angles, ce qui permet de déterminer le diamètre hydrodynamique des particules en suspension (70).

- **Potentiel zéta**

Il représente la mesure de la charge électrostatique à la surface des nanoparticules. Cette mesure est basée sur la mobilité électrophorétique des particules, permettant de détecter le potentiel électrique à la double couche électrique située à leur surface. Son amplitude varie fortement avec le pH et donne une indication de la stabilité colloïdale des particules en suspension (70).

II.6.2. Efficacité d'encapsulation (EE%)

L'EE % a été déterminé par ultracentrifugation. Les 10 ml de formulation éthosomale optimale (F6) chargée d'une concentration de 0.0265 g/ml HE ont été agité vigoureusement pendant 45min à 15000tr/min à une température de 4°C selon d'étude de Kampanart Huanbutta et ses associées (2). Le surnagent est récupéré et dilué 200X dans de l'eau distillée. L'absorbance a été mesurée par spectrophotomètre UV-Vis à une longueur d'onde de 250 nm, et pour la concentration d'huile non encapsulée, elle est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage HECA dans une solution d'éthanol (Figure 24). A partir de ces données, l'efficacité d'encapsulation (EE) est calculée par la formule suivante :

$$(EE\%) = \frac{\text{quantité totale de HE} - \text{quantité non encapsulée de l'HE}}{\text{quantité totale de l'HE}} \times 100$$

La courbe d'étalonnage réalisé suite à une série de dilution de l'huile essentielle dans l'éthanol, comme indiqué sur le tableau suivant :

Tableau VII: L'absorbance en fonction de la concentration des solutions.

Solution	1	2	3	4	5	6
Concentration HE g/ml	4×10^{-4}	5×10^{-4}	7×10^{-4}	8×10^{-4}	11×10^{-4}	13×10^{-4}
Absorbance à 250nm	0,592	0,704	0,978	1,192	1,578	1.891

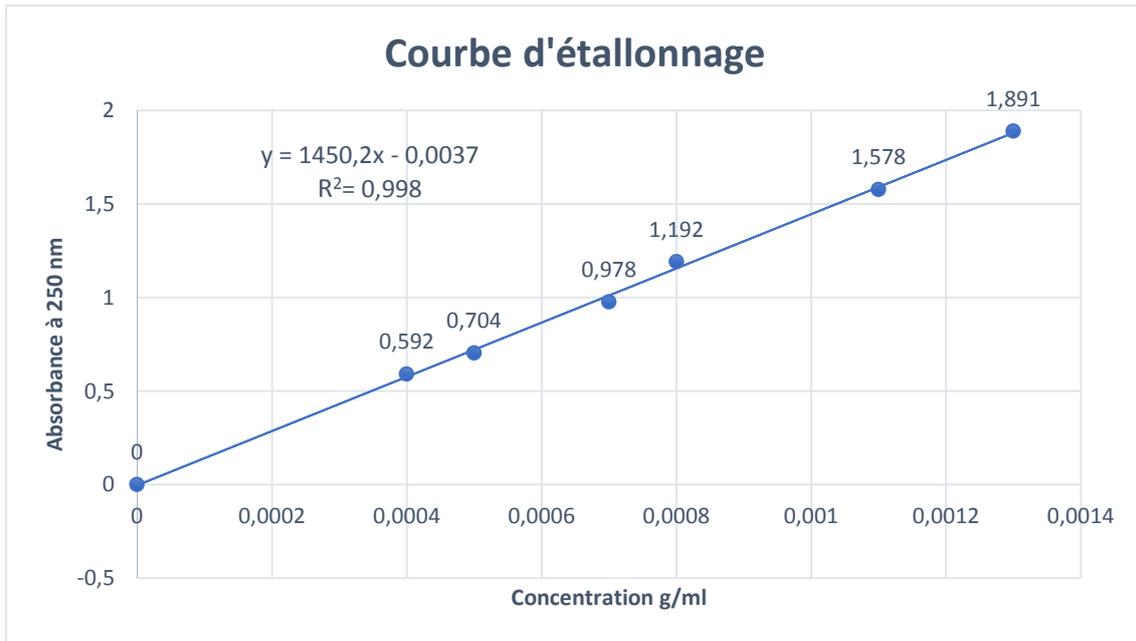


Figure 23 : Courbe d'étalonnage de l'HE de petit grain bigarade.

II.7. Evaluation de l'activité antifongique de l'HE de *Citrus aurantium* encapsulée en éthosome

L'activité antifongique des éthosomes chargés avec différentes concentrations d'HECA a été examinée. L'HECA chargée variait de 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 5, 10, 15 et 25X la concentration minimale inhibitrice (CMI= 5.3mg/ml) de l'HECA, déterminée dans notre étude précédente. Nous avons suivi la même procédure que le protocole précédent pour tester la sensibilité de *Candida albicans* aux éthosomes formulés.

Pour étudier l'effet antifongique des éthosomes .Nous avons utilisé les 3 souches de référence ATCC 10/10 et ATCC 26 de *C.albicans* et la souche identifiée par le service de parasitologie CHU Tlemcen en suivant les même étapes et en appliquant les 2 méthodes préalablement utilisées pour l'HE non encapsulée qui sont :

II.7.1. Diffusion sur milieu solide par méthode des puits

Nous avons appliqué les mêmes étapes du protocole précédent de la méthode des puits sur milieu gélosé (PDA), visant à étudier l'effet de l'huile essentielle de petit grain bigarade encapsulée sur la souche *C.albicans*.

Nous avons d'abord commencé par évaluer l'effet des 5 premières formules correspondant à 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2.5 de la CMI de notre HE.

a. Evaluation de l'effet antifongique des formules : F1, F2, F3, F4, F5 vis-à-vis *C. albicans*

Les boîtes de pétri ont été coulées etensemencées en ATCC 10/10, ATCC 26 et CAI.

Après séchage, quatre puits sont réalisés au niveau des boîtes pour y introduire :

- 50 µl de l'huile essentiel a 10% dans du DMSO.
- 50 µl de la formule à tester.
- 50 µl de formulation F2 (15min) à blanc utilisés comme témoin négatif pour les formules.
- 50 µl de Fluconazole dilué au ½ utilisé comme témoin positif.

Chaque boîte de pétri correspondant a une formule a fait l'objet de 3 réplication.

b. Evaluation de l'effet antifongique des formules : F6, F7, F8, et F9 vis-a-vis *C.albicans*

Les boîtes de pétri ont été coulé etensemencé en ATTC 10/10, ATCC 26 et CAI.

Nous avons effectué 5 puits dans chaque boîte de pétri afin d'y mettre :

- 50 µl de la formule F6.
- 50 µl De la formule F7.
- 50 µl De la formule F8.
- 50 µl De la formule F9.
- 50 µl De la formule à blanc.
- Chaque souche a fait l'obejt de 3 réplication.
- Incubation 30°C pendant 48h.

Seules les souches fongiques montrant une sensibilité à nos formulations éthosomales sont sélectionnées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI).

II.7.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La détermination de la CMI s'est effectuée selon la méthode des macro-dilutions dans des microplaques a 96 puits , Le principe est le même qui a été utilisé pour la détermination de la CMI de l'HE non encapsulée qui consiste à réaliser une gamme décroissante de concentration en formulation dans des microplaques contenant un milieu liquide (PDA) ainsi qu'une quantité de la suspension fongique ayant une DO comprise entre 0.08 et 0.1 ($\lambda=590\text{nm}$). La lecture des microplaques s'est faite en mesurant la DO à 48h après une incubation à 30°C.

Résultat et discussion

I. Extraction de l'HE de petit grain bigarade

I.1. Rendement

Tableau VIII: Résultats des rendements de l'extraction de l'huile essentielle des feuilles de Bigaradier par hydrodistillation et entraînement à la vapeur d'eau.

Méthode d'extraction de l'huile essentielle	Hydrodistillation	Entraînement à la vapeur d'eau
Moyenne des différents Rendement %	0.35%	0.30%

La méthode d'hydrodistillation, utilisée dans environ 80% des cas, constitue généralement la principale approche d'extraction. Nous avons confirmé cette tendance en comparant deux méthodes d'extraction, à savoir l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau, dont les rendements des échantillons d'huile essentielle des feuilles *Citrus aurantium* sont apportés dans le tableau VIII. Nous avons constaté que le procédé d'entraînement à la vapeur d'eau présente un rendement d'environ 0,30%, tandis que l'hydrodistillation affiche un rendement moyen légèrement plus élevé de l'ordre de 0,35%. C'est pour cette raison que nous avons opté pour cette dernière méthode.

Cependant, en utilisant la méthode d'hydrodistillation Hamdani et Allem ont obtenu un rendement de petit grain Bigarade de 0.73% (71). Alors que Bendali et al ont exprimés un rendement de l'ordre de 0,57%(62).

Dans une autre recherche, Nidhi et ses collègues ont également obtenu un rendement en huile essentielle des feuilles de *C. aurantium* provenant d'Andhra Pradesh, en Inde, qui était similaire à celui que nous avons trouvé, soit 0,396%(3).

Cette variabilité pourrait être expliquée par plusieurs facteurs notamment, le choix de la période de récolte, la localisation géographique, la saison, l'organe ainsi que les conditions pédoclimatiques, le stress biotique et l'influence du génotype (3).

I.2. Résultat de l'analyse de l'HE des feuilles de *Citrus aurantium*

I.2.1. Caractères organoleptiques

Les caractères organoleptiques de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* sont groupés dans le tableau IX.

Tableau IX: Caractères organoleptiques de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus aurantium*.

Spécification	Aspect	Couleur	Odeur
Huile essentielle petit grain Bigarade	Liquide, mobile, limpide	Incolore à Jaune citronné claire	Fraiche, brute, au note fruitée et fleuries

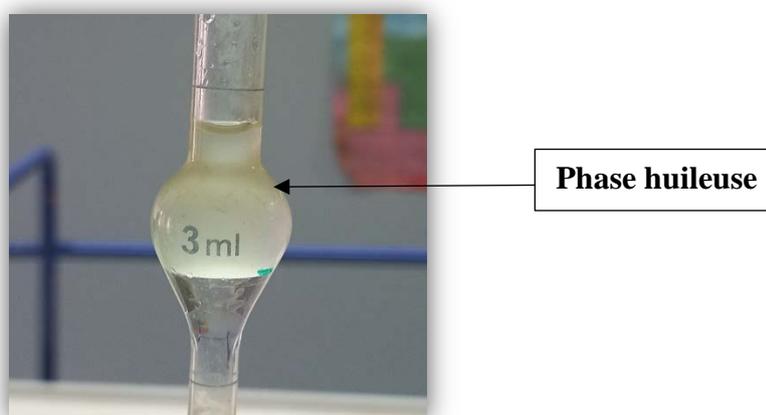


Figure 24: Huile essentielle des feuilles de *Citrus aurantium*.

I.2.2. Grandeurs physiques

Les résultats de la détermination des grandeurs physiques des huiles essentielles de *Citrus aurantium*, obtenues par hydro-distillation et par entrainement à la vapeur d'eau à partir des feuilles, sont regroupés dans le tableau X.

Tableau X: Valeurs des grandeurs physiques.

Spécifications	Hydro-distillation	Entrainement à la vapeur d'eau
Densité	0.87	0.86
Degré Brix	68.38%	66.62%
Indice de réfraction²⁰_D	1.46153	1.45732

Au vu des résultats obtenus, on observe que les paramètres physiques déterminés se rapprochent de ceux de la littérature.

Tableau XI: Résultats de quelques recherches précédentes sur l'huile essentielle du *Citrus aurantium*.

Référence	Densité (20°C)	Indice de réfraction	Région
(72)	0.863	1.475	Chlef
(73)	0.892	1,4773	Gherdaya
(74)	0.86	1,457	Mascara

Dans notre étude, l'indice de réfraction de HE des feuilles l'oranger amère était conforme aux normes internationales, et il concorde également avec les résultats obtenus par différentes études.

C'est un paramètre d'identification qualitatif, permettant de vérifier la pureté des huiles essentielles. Un indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en mono terpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en mono terpènes donnera un indice élevé. Les faibles indices de réfraction des huiles essentielles indiquent leur faible réfraction de la lumière, ce qui pourrait favoriser leur utilisation dans les produits cosmétiques (75).

L'indice de réfraction obtenu par l'étude menée à Mascara (74) était de 0.86, ce qui correspond au même l'indice de réfraction que nous avons obtenu dans notre étude pour l'huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur d'eau.

Et les valeurs de densité des huiles essentielles sont pratiquement identiques ; cela indique que les propriétés physiques de ces huiles sont assez voisines.

I.2.3. Grandeurs chimiques

Chaque test a été réalisé deux fois dans les mêmes conditions expérimentales et les résultats indiqués représentent la moyenne de ces deux tests.

Tableau XII: Valeurs des grandeurs chimiques.

	IA	IS	IE
Hydrodistillation	1.122	96.555	95.435
Entraînement à la vapeur d'eau	1.9638	45.661	43.69

I.2.3.1. Indice d'acide

D'après le tableau précédent, les huiles essentielles obtenues par les méthodes d'hydrodistillation et d'entraînement à la vapeur d'eau présentent des indices d'acide de 1,112 et 1,96 respectivement.

Ces résultats attestent que l'huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur d'eau a une proportion d'acidité plus élevée que celle obtenue par HD type Clevenger. Nous pouvons constater alors que la méthode d'extraction peut avoir une grande influence sur les valeurs d'indices obtenues et ceci a été appuyé par l'étude de Benseddik (76) menée sur l'huile essentielle de *Citrus aurantium* extraite de l'écorce.

De plus, la norme AFNOR pour les huiles essentielles a établi une valeur d'indice d'acide inférieure à 2 (77). Ainsi, ces échantillons sont considérés comme intacts, car l'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acides libres et constitue un paramètre déterminant l'état de détérioration des huiles essentielles au fil du temps.

La valeur de l'indice d'acide obtenu par HD type Clevenger semble être moins élevée que le taux de 1.69 rapporté par Boukhenoufa dans son étude (74) utilisant la même méthode d'extraction.

I.2.3.2. Indice d'ester

L'indice d'ester constitue un indicateur direct de la qualité de l'huile essentielle étudiée. En réalité, les huiles essentielles de qualité exceptionnelle renferment une quantité significative d'esters, et proportionnellement, la qualité d'une huile est d'autant plus élevée que sa concentration en esters est importante (78).

Selon les données présentées dans le tableau IX, il est observé que l'huile essentielle extraite par HD de type Clevenger affiche le plus haut indice d'ester, indiquant ainsi une meilleure qualité par rapport à celle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau. Cette constatation est confirmée par la valeur la plus basse de son indice d'acide, suggérant que cette huile essentielle n'a pas subi de dégradation oxydative avant son analyse.

95.435 > 43.69

Ces valeurs obtenues sont supérieures à celle rapportée par l'étude de Boukhenoufa (74) ayant un résultat de 12,55.

I.2.3.3. Indice de saponification

On note également que l'huile essentielle du *Citrus aurantium* extraite par HD type Clevenger révèle un indice de saponification supérieur à celui obtenu par entraînement à la vapeur d'eau et ceci ne fait qu'appuyer les résultats précédents.

L'évaluation des propriétés physico-chimiques telles que la densité, l'indice d'acide et l'indice de réfraction... constitue une étape cruciale, bien qu'insuffisante, dans la caractérisation des huiles essentielles. Afin de compléter cette caractérisation, il est indispensable d'opter pour des analyses chromatographiques, notamment la CPG/SM utilisée pour l'analyse structurale des composés volatils, jouant ainsi un rôle essentiel dans l'identification qualitative des huiles essentielles extraites de plantes.

I.3. Evaluation de l'activité antifongique de l'HE

- Lecture des boîtes de pétri



Figure 25: Résultat de mise en culture des souches isolées ATCC 1010, ATCC26, Cai.

I.3.1. Diffusion sur milieu solide par la technique des puits

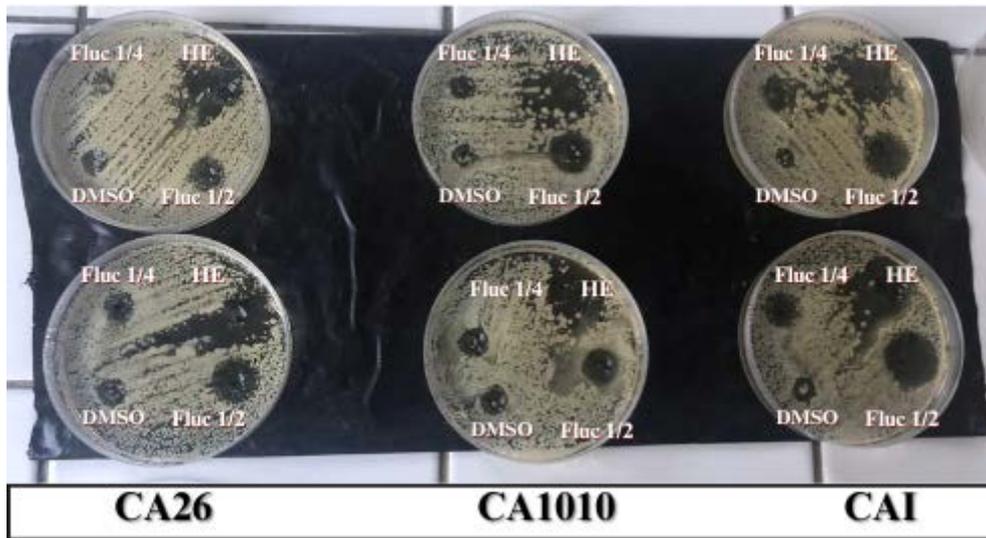


Figure 26: Résultat de l'évaluation de l'activité antifongique par technique des puits.

Tableau XIII: Diamètre en mm des zones d'inhibition vis-à-vis des trois souches de *Candida albicans*.

Les souches	Diamètre de zone d'inhibition (mm ±SD)		
	Ca26	Ca1010	Cai
Huile essentielle	23 ±1.4	22.5±0.7	23.5±0.7
Fluconazole ½	15 ±2.8	13±0	20±0
Fluconazole ¼	12 ±1.4	11.5±0.7	13.5±0.7
DMSO	0	0	0
Appréciation sur l'efficacité de l'HE (66)	Extrêmement sensible		

L'évaluation qualitative de l'activité antifongique de HECA a été faite sur trois souches fongiques, par la méthode de diffusion sur milieu solide. Les diamètres d'inhibitions sont résumés dans le tableau XIII. Cette étude a révélé que HECA présente une activité antifongique significative avec des zones d'inhibition allant de 22.5± 0,7 à 23.5 ± 0,7 mm.

Il est intéressant de noter que l'HECA a un pouvoir inhibiteur plus marqué que celui du Fluconazole.

Plusieurs auteurs attribuent l'efficacité fongicide de leurs travaux à la composition chimique, affirmant qu'elle peut être associée de manière positive aux composants

Résultats et Discussion

phytochimiques comme les monoterpènes. De nombreuses études mettent en évidence l'abondance de mono terpènes dans les huiles essentielles des agrumes(72,79,80).

Les résultats qu'on a obtenu concordent avec les travaux de Nidhi(3) qui ont constaté une forte activité antifongique avec une zone d'inhibition de $25,3 \pm 0,47$ mm et de $19 \pm 0,02$ mm respectivement contre les souches de *C. albicans* ATCC 90028 et MTCC 277 (Microbial Type Culture Collection and Gene Bank). Quant à l'étude menée par Chintaluri (81) qui a rapporté que la zone d'inhibition de 10 μ l de HECA était de $14,3 \pm 0,8$ mm contre la souche de *C. albicans* MTCC183.

Boukhanoufa(74) a aussi rapporté que l'extrait méthanolique de *Citrus aurantium L.*, a présenté des résultats intéressants contre *C. albicans* avec une zone d'inhibition égale à $20 \pm 1,3$ pour une concentration de 50mg/ml.

De plus ,L'étude Pakistanaise menée par Ammar et ses collègues (82) sur l'huile essentielle de Néroli présente des résultats similaires aux nôtres avec un diamètre de 22mm contre la souche de *C. albicans*.

En fait ,les huiles extraites des feuilles ont une composition chimique proche de celle de la néroli, ce qui pourrait expliquer leurs propriétés antifongiques similaires (83).

Pour quantifier l'activité antifongique de cette huile essentielle, la CMI a été déterminée.

I.3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Tableau XIV : La concentration minimale inhibitrice (CMI) de HECA contre les trois souches de *Candida albicans*.

	CMI		
Les souches fongiques	5.3mg/ml	31.25 μ l/ml	0.625%
Appréciation du pouvoir inhibiteur	Excellent		

On observe que la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* sur les souches de *C. albicans*, est de 5.3mg/ml qui correspond à 31.25 μ l/ml. Selon Koba (68), cette capacité inhibitrice est classée comme excellente lorsque la CMI est inférieure à 50 μ l/ml.

Résultats et Discussion

Bien que l'huile essentielle de *C. aurantium* ait été mentionnée dans de nombreuses applications médicinales, peu d'études ont caractérisé son potentiel anti-candidas.

Les travaux de Nidhi (3) ont rapporté une CMI de 0.15 et 0.31% contre *Candida Albicans* ATCC 90028 et MTCC 277 ce qui présente une meilleure activité antifongique par rapport à nos résultats.

De plus, l'étude de Boukhanoufa (74) portant sur l'extrait méthanolique du zeste de *Citrus aurantium* a obtenu des CMI qui variait entre 3.12mg/ml à 25mg/ml avec différentes souches de *C.albicans*.

Cependant, les différences entre nos données et celles d'autres auteurs sont probablement liées au climat, à l'origine et à la saison, ce qui pourrait influencer l'inhibition et leurs pouvoir antifongique.

I.4. Caractérisation des éthosomes

I.4.1. Aspect des formulations éthosomales

L'apparence macroscopique des formulations éthosomales à blanc et ceux chargés en HE de *Citrus aurantium* est représentée dans la figure (27).



Figure 27: (gauche) : Aspect des formulations éthosomales à blanc.

(Droite) : Aspect de la formulation éthosomales chargé d'HE.

Il a été observé que les formules avaient un aspect opaque de couleur jaunâtre cela devrait être due à la lécithine de soja.

I.4.2. La taille des particules et le potentiel zéta

Les résultats de la mesure de la taille des particules et du potentiel zéta en utilisant le zetasizer Malvern ont été rapportés dans les tableaux ci-dessous :

I.4.2.1. Ethosomes à blanc

Dans le but de désigner la formule optimale, nous avons mesuré la taille des particules et le potentiel zéta des différentes formulations qui variait selon les paramètres de formulation (% d'éthanol et de phospholipide) ainsi que les paramètres de procédé qui est le temps de sonication. Les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau XV.

Tableau XV: Résultats des mesures de la taille des particules et du potentiel zéta des formulations à blanc.

Temps de sonication	15min		22.5min		30min	
	Taille des particules(nm)	Potentiel zéta(Mv)	Taille des particules(nm)	Potentiel zéta(Mv)	Taille des particules(nm)	Potentiel zéta(Mv)
Paramètre mesuré						
F1	1083	-25	963,6	-35,7	1083	-22,5
F2	656,5	-21	577,37	-19,7	414,2	-9,35
F3	1747,5	-11,5	3893	-15	5816	-15,5
F4	1669	-41,1	1492,5	-13,4	889,2	-12,4
F5	1320	-12,9	1260	-14,2	1059	-15 ,1
F6	3472	-11,8	2592,5	-19,5	1878	-8,15
F7	2023	-11	1678	-9,9	2419	-11,5
F8	1305	-10,8	983,8	-39,6	789	-9.12
F9	4070	-10 ,3	1105	-12,1	978.5	-10

Les résultats indiquent une variation significative des paramètres mesurés en fonction du temps de sonication et de la formulation utilisée.

Pour la taille des particules, les valeurs varient considérablement selon les formulations et les temps de sonication. Par exemple, pour la formulation F1, la taille des particules diminue de manière significative de 1083 nm à 963.6 nm lorsque le temps de sonication passe de 30minutes à 22.5 minutes. De même, pour la formulation F2, on observe une réduction de

Résultats et Discussion

la taille des particules de 656,5 nm à 414,2 nm avec une augmentation du temps de sonication. En effet, plus la taille de la vésicule est petite, plus elle délivre efficacement le contenu dans les couches enracinées de la peau.

En ce qui concerne le potentiel zêta, des variations sont également observées en fonction du temps de sonication et de la formulation. Par exemple, pour la formulation F1, le potentiel zêta varie de -35,7 mV à -22,5 mV avec une augmentation du temps de sonication. Le potentiel zêta négatif est responsable de l'amélioration de la perméation percutanée du médicament.

Suite à l'analyse des résultats, la formulation optimale a été déterminée en priorisant une taille de particules minimale tout en maintenant un potentiel zêta optimal pour garantir la stabilité de la formulation. Les formulations ainsi sélectionnées sont la F1 à 22,5 min, la F2 à 15 min et la F2 à 22,5 min.

I.4.2.2. Ethosomes additionnées de cholestérol

Après avoir préparé à nouveau les formules éthosomales préalablement sélectionnées en ajoutant le cholestérol qui sert à fournir une stabilité et une rigidité vésiculaire. Nous avons mesuré la taille des particules et le potentiel zêta, Les résultats sont exprimés dans le tableau ci-dessous :

Tableau XVI: Résultat des mesures de taille des particules et le potentiel zêta des formulations additionnées de cholestérol

Formule	Taille des particules	Potentiel zêta
F1(22.5min)	1400.5	-17.7
F2(15min)	1062.85	-23.9
F2(22.5min)	1165.5	-16.3

La formulation présentant la plus petite taille de particules et le potentiel zêta le plus bas est la F2 soumise à une sonication de 15 minutes. Cette dernière a été sélectionnée pour être chargée avec des concentrations variables de l'HE de *Citrus aurantium*, allant de 0,25 à 25 fois la CMI identifiée lors de l'évaluation de l'activité antifongique de l'HE brute.

I.4.3. Efficacité d'encapsulation

Le potentiel de livraison du système éthosomal est directement influencé par sa capacité de transport de médicament, qui est déterminée en terme d'EE%.

Résultats et Discussion

Le pourcentage d'encapsulation des éthosomes a été déterminé pour la formulation ayant montré une CMI vis-à-vis de *Candida albicans*.

Le EE% calculé a donné un résultat de 43.39%, indiquant que l'éthosome développé a encapsulé presque la moitié de l'HE introduite. Cela était le cas aussi dans l'étude de Kampanart Huanbutta et ses associées (2), qui ont trouvé un EE% compris entre 24.42% et 31.58% dans leurs étude sur l'extrait de rhizome de *Zingiber zerumbet* chargés d'éthosomes. Une explication potentielle de cette observation est l'instabilité inhérente des produits naturels. En raison de leur nature complexe et de leurs propriétés souvent variables, les composés naturels peuvent présenter des défis lorsqu'ils sont encapsulés dans des formulations pharmaceutiques. Une autre raison possible est la haute solubilité des composés actifs de l'HE dans l'éthanol, ce qui entraîne sa dissolution dans le solvant lors de la préparation de l'éthosome. De plus, le processus de sonication peut réduire significativement la taille des éthosomes. Cependant, cela pourrait également affecter l'efficacité de piégeage du système. Il est aussi possible qu'une certaine quantité de l'HE a échappé pendant la centrifugation dans le processus de détermination du l'EE% (2).

I.5. Pouvoir antifongique de l'HE de petit grain bigarade encapsulée

L'évaluation de l'activité antifongique des formulations éthosomales contre les deux souches de références ca10/10 et ca26 ainsi que la souche identifiée par le laboratoire de parasitologie du CHU de Tlemcen a donné différents résultats selon la méthode utilisée.

I.5.1. Diffusion sur milieu solide par la technique des puits

Les résultats des premières formulations testées, à savoir F1, F2, F3, F4, et F5 correspondant respectivement à 0.25, 0.5, 1, 1.5, et 2.5 fois la CMI identifiée précédemment, n'ont montré aucune zone d'inhibition avec les souches de références ca10/10 et ca26. L'aspect des boîtes de pétris était le même avec toutes les formules et cela est représenté dans la figure 28. Cela peut être dû à une quantité insuffisante de substance active qui a été libérée par les éthosomes.

Tandis que les formulations F6, F7, F8 et F9, représentant respectivement 5, 10, 15 et 25 fois la CMI, ont montré une activité antifongique à partir de F7 avec les deux souches de référence ca10/10 et ca26, comme illustré dans la figure 29 ci-dessous. Les diamètres des zones d'inhibition sont illustrés dans le tableau XVII.

Les formules testées n'ont montré aucun effet sur la CAI, cela peut être dû à une résistance de la souche pathogène

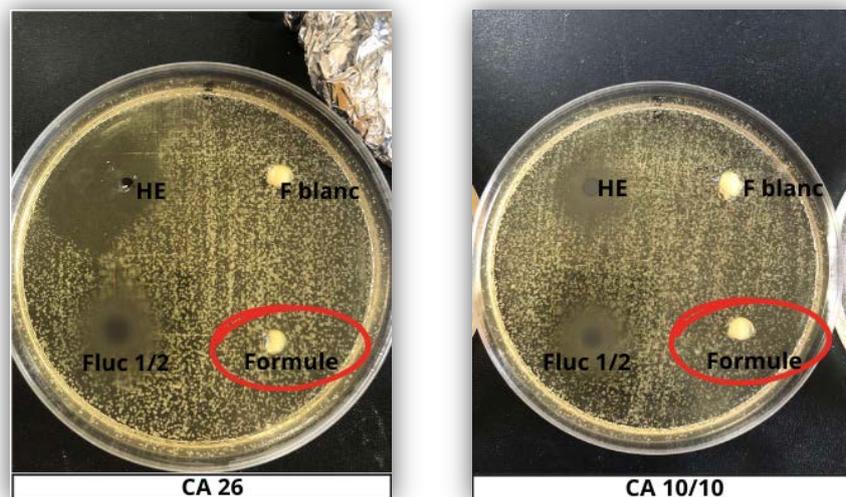


Figure 28: Aspect des formules sur la ca26 et la ca10/10 qui n'ont montré aucune zone d'inhibition .



Figure 29 : Effet des formules éthosomales F6, F7, F8, et F9 sur les souches de *C.albicans*.

Tableau XVII : les diamètres d'inhibition des formules éthosomales vis à vis CA10/10 et CA26.

Formulation	Zone d'inhibition (mm)	
	CA10/10	CA26
F7	10 ± 0.1	11 ± 0.3
F8	11 ± 0.1	13 ± 0.1
F9	15 ± 0.2	20 ± 0.1

En comparant les diamètres d'inhibition des formulations éthosomales qui ont démontré un effet antifongique sur les deux souches ATCC avec les diamètres d'inhibition de l'huile essentielle non encapsulée diluée à 10 % dans le DMSO, nous observons une diminution de ce dernier avec les formulations. Ceci pourrait être attribuée à un relargage insuffisant de l'huile essentielle retenue dans les éthosomes.

I.5.2. Résultat de la CMI des formules éthosomales

La micro-dilution sur microplaque a été utilisée pour déterminer la CMI des éthosomes chargés avec l'HE de petit grain bigarade contre les deux souches de référence (ATCC 10/10 et ATCC 26) qui ont montré une sensibilité à nos formulations éthosomales. Les concentrations testées de l'HE chargée sur les éthosomes étaient comprises entre 0.053 et 0.132 g/ml. Correspondant aux formulations de F6 à F9.

La CMI des éthosomes chargés avec l'HE s'est révélé de 1.656mg/ml, soit trois fois plus faible que celle de l'HE déterminée précédemment. Ceci témoigne en l'efficacité de la forme éthosomale. Cependant, cela ne concorde pas avec le résultat des zones d'inhibitions que nous avons noté précédemment. Nous avons émis l'hypothèse que cette discordance pourrait être attribuée à des biais introduits par une mauvaise qualité du milieu de culture utilisé lors de l'évaluation qualitative de l'activité antifongique des formules testées ce qui a peut-être engendré une mauvaise diffusion des éthosomes.

Selon nos recherches approfondies, nous n'avons trouvé aucune étude dans la littérature qui soit comparable à la nôtre.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Face à la montée alarmante de la résistance aux médicaments antifongiques et à la demande croissante pour des alternatives naturelles en thérapeutique, notre étude s'est concentrée sur la combinaison de ces deux objectifs. Dans ce contexte, la nanotechnologie se présente comme une solution prometteuse permettant d'unir efficacement les propriétés antifongiques des produits naturels aux avantages de la délivrance contrôlée de médicaments.

Dans notre travail, nous avons mené une étude portant sur l'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de petit grain bigarade, à la fois sous sa forme libre et encapsulée dans des éthosomes, contre trois souches de *Candida albicans*.

Les résultats obtenus ont confirmé l'effet de l'huile essentielle sur les souches de *C. albicans* étudiées, mettant en évidence une activité plus marquée lorsqu'elle était encapsulée dans des éthosomes. Cela souligne l'importance de considérer la forme de l'huile essentielle dans son application thérapeutique. L'utilisation d'éthosomes comme vecteurs de livraison peut non seulement accroître l'efficacité antifongique, mais également potentiellement réduire les effets indésirables et améliorer la biodisponibilité de l'huile essentielle.

Cette étude ouvre de nouvelles perspectives de recherche passionnantes dans l'exploration des ressources naturelles telles que les huiles essentielles et les extraits de plantes dans la lutte contre les infections fongiques, notamment le problème de la résistance. Il serait intéressant d'approfondir l'étude des composés des huiles essentielles responsables de cette activité, ainsi que d'explorer d'autres méthodes d'encapsulation et d'autres huiles essentielles pour leurs activités antifongiques. Ces avancées pourraient éventuellement conduire au développement de thérapies plus efficaces et mieux tolérées pour traiter les infections fongiques résistantes aux antifongiques, améliorant ainsi la qualité des soins de santé pour les patients concernés.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

1. Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*. 2022;13(1):89-121.
2. Huanbutta K, Rattanachitthawat N, Luangpraditkun K, Sriamornsak P, Puri V, Singh I, et al. Development and Evaluation of Ethosomes Loaded with Zingiber zerumbet Linn Rhizome Extract for Antifungal Skin Infection in Deep Layer Skin. *Pharmaceutics*. 2022;14(12):2765.
3. Nidhi P, Rolta R, Kumar V, Dev K, Sourirajan A. Synergistic potential of *Citrus aurantium* L. essential oil with antibiotics against *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol*. nov 2020;262:113135.
4. Pavoni L, Perinelli DR, Bonacucina G, Cespi M, Palmieri GF. An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. *Nanomaterials*. janv 2020;10(1):135.
5. Boukhatem MN, Ferhat MA, Kameli A, Saidi F, Kebir HT. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan J Med*. 2014;9(1).
6. Albuquerque PM, Azevedo SG, de Andrade CP, D'Ambros NC de S, Pérez MTM, Manzato L. Biotechnological Applications of Nanoencapsulated Essential Oils: A Review. *Polymers*. janv 2022;14(24):5495.
7. Groupe de recherche et d'échanges technologiques (GRET). memento de l'agronome [Internet]. Disponible sur: https://www.doc-developpement-durable.org/file/Culture/Agriculture/Memento-de-l-Agronome_CIRAD.pdf
8. Bousbia N. Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires.
9. Sutar I, Khan H, Patel S, Celano R, Rastrelli L. An Overview on *Citrus aurantium* L.: Its Functions as Food Ingredient and Therapeutic Agent. *Oxid Med Cell Longev*. 2 mai 2018;2018:7864269.
10. Do TKT, Hadji-Minaglou F, Antoniotti S, Fernandez X. Authenticity of essential oils. *TrAC Trends Anal Chem*. mars 2015;66:146-57.
11. Asbahani AE, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EHA, Casabianca H, et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int J Pharm*. avr 2015;483(1-2):220-43.
12. Mahato N, Sharma K, Koteswararao R, Sinha M, Baral E, Cho MH. Citrus essential oils: Extraction, authentication and application in food preservation. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 21 févr 2019;59(4):611-25.
13. Dosoky N, Setzer W. Biological Activities and Safety of *Citrus* spp. Essential Oils. *Int J Mol Sci*. 5 juill 2018;19(7):1966.
14. Silvestre WP, Sachett FH, Agostini F, Boettcher GN, Sulzbach M, Gonzatto MP, et al. Chemical composition of petitgrain (leaf) essential oil of different *Citrus* rootstocks and scion cultivars. *J Essent Oil Res*. 2 sept 2020;32(5):394-406.
15. Reyes-Jurado F, Franco-Vega A, Ramírez-Corona N, Palou E, López-Malo A. Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Eng Rev*. sept 2015;7(3):275-97.

Références Bibliographiques

16. Hamid KJ, Kurji BM, Abed KM. Extraction and mass transfer study of *Cupressus sempervirens* L. oil by hydro-distillation method. *Mater Today Proc.* 2021;42:2227-32.
17. Fagbemi KO, Aina DA, Olajuyigbe OO. Soxhlet extraction versus hydrodistillation using the clevenger apparatus: A comparative study on the extraction of a volatile compound from *Tamarindus indica* seeds. *Sci World J.* 2021;2021:1-8.
18. Samadi M, Abidin ZZ, Yunus R, Biak DRA, Yoshida H, Lok EH. Assessing the kinetic model of hydro-distillation and chemical composition of *Aquilaria malaccensis* leaves essential oil. *Chin J Chem Eng.* 2017;25(2):216-22.
19. De Groot AC, Schmidt E. Essential Oils, Part I: Introduction. *Dermatitis.* mars 2016;27(2):39-42.
20. Dąbrowska AK, Spano F, Derler S, Adlhart C, Spencer ND, Rossi RM. The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. *Skin Res Technol.* 2018;24(2):165-74.
21. Kollros M. *Dermocosmétologie à l'officine: conseils et prévention.*
22. Comprendre_la_Peau.pdf [Internet]. [cité 20 déc 2023]. Disponible sur: http://julioone.free.fr/Comprendre_la_Peau.pdf
23. Spagnul A. Développement d'une forme pharmaceutique véhiculant un calixarène destinée au traitement d'une peau saine ou lésée contaminée par de l'uranium. Paris 11; 2009.
24. Thomas M. *Peau sèche et vieillissement cutané: clinique, facteurs aggravants et réponses cosmétiques.*
25. Martini MC. *Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie.* Lavoisier; 2011.
26. Dréno B. Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes. *Ann Dermatol Vénérologie.* oct 2009;136:S247-51.
27. Sala M, Diab R, Elaissari A, Fessi H. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. *Int J Pharm.* 2018;535(1-2):1-17.
28. Sparr E, Björklund S, Pham QD, Mojumdar EH, Stenqvist B, Gunnarsson M, et al. The stratum corneum barrier-from molecular scale to macroscopic properties. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2023;101725.
29. Rabiei M, Kashanian S, Samavati SS, Jamasb S, McInnes SJ. Nanomaterial and advanced technologies in transdermal drug delivery. *J Drug Target.* 2020;28(4):356-67.
30. Georgel A. *Pénétration transcutanée des substances actives: application en dermocosmétologie.* UHP-Université Henri Poincaré; 2008.
31. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol.* 2016;25(2):92-8.

Références Bibliographiques

32. Salazar SB, Simões RS, Pedro NA, Pinheiro MJ, Carvalho MFN, Mira NP. An overview on conventional and non-conventional therapeutic approaches for the treatment of candidiasis and underlying resistance mechanisms in clinical strains. *J Fungi*. 2020;6(1):23.
33. de Oliveira Santos GC, Vasconcelos CC, Lopes AJ, de Sousa Cartágenes M do S, Filho AK, do Nascimento FR, et al. Candida infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Front Microbiol*. 2018;9:1351.
34. Kukhaleishvili N. Biophysique de la croissance filamenteuse fongique et mécanique de perforation dans des élastomères. Université Côte d'Azur; 2020.
35. Spampinato C, Leonardi D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Res Int*. 2013;2013.
36. Cardinale V. Les candidoses vaginales recidivantes à candida albicans. UHP-Université Henri Poincaré; 2001.
37. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, et al. Candida albicans—the virulence factors and clinical manifestations of infection. *J Fungi*. 2021;7(2):79.
38. Lagane C. Rôle de l'IL-13 et des ligands de PPAR-gamma dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de Candida Albicans. Implication de PPAR-gamma. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier; 2007.
39. Kaushik N, Pujalte GG, Reese ST. Superficial fungal infections. *Prim Care Clin Off Pract*. 2015;42(4):501-16.
40. Niemirowicz K, Durnaś B, Piktel E, Bucki R. Development of antifungal therapies using nanomaterials. *Nanomed*. 2017;12(15):1891-905.
41. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;62(4):e1-50.
42. Bondaryk M, Kurzątkowski W, Staniszevska M. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. *Adv Dermatol Allergol Dermatol Alergol*. 2013;30(5):293-301.
43. Bhattacharya S, Sae-Tia S, Fries BC. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. *Antibiotics*. 2020;9(6):312.
44. Ré ACS, Martins JF, Cunha-Filho M, Gelfuso GM, Aires CP, Gratieri T. New perspectives on the topical management of recurrent candidiasis. *Drug Deliv Transl Res*. 2021;11:1568-85.
45. Perlin DS, Shor E, Zhao Y. Update on antifungal drug resistance. *Curr Clin Microbiol Rep*. 2015;2:84-95.
46. Afzal O, Altamimi ASA, Nadeem MS, Alzarea SI, Almalki WH, Tariq A, et al. Nanoparticles in Drug Delivery: From History to Therapeutic Applications. *Nanomaterials*. 19 déc 2022;12(24):4494.
47. Grazú V, Moros M, Sánchez-Espinel C. Chapter 14 - Nanocarriers as Nanomedicines: Design Concepts and Recent Advances. In: de la Fuente JM, Grazu V, éditeurs. *Frontiers of Nanoscience*

Références Bibliographiques

- [Internet]. Elsevier; 2012 [cité 6 mars 2024]. p. 337-440. (Nanobiotechnology; vol. 4). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124157699000145>
48. Solanki D, Kushwah L, Chouhan V, Motiwale M. TRANSFEROSOMES-A REVIEW. *WORLD J Pharm Pharm Sci.* 1 oct 2016;5:435-49.
 49. Paiva-Santos AC, Silva AL, Guerra C, Peixoto D, Pereira-Silva M, Zeinali M, et al. Ethosomes as Nanocarriers for the Development of Skin Delivery Formulations. *Pharm Res.* juin 2021;38(6):947-70.
 50. Limsuwan T, Amnuakit T. Development of Ethosomes Containing Mycophenolic Acid. *Procedia Chem.* 2012;4:328-35.
 51. Ascenso A, Batista C, Cardoso P, Mendes T, Praça F, Bentley V, et al. Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: transfersomes, ethosomes, and transethosomes. *Int J Nanomedicine.* sept 2015;5837.
 52. Somwanshi SB. Development and evaluation of novel ethosomal vesicular drug delivery system of *Sesamum indicum* L. seed extract. *Asian J Pharm AJP.* 2018;12(04).
 53. Safta DA, Bogdan C, Moldovan ML. Vesicular Nanocarriers for Phytocompounds in Wound Care: Preparation and Characterization. *Pharmaceutics.* 5 mai 2022;14(5):991.
 54. Shen LN, Zhang YT, Wang Q, Xu L, Feng NP. Enhanced in vitro and in vivo skin deposition of apigenin delivered using ethosomes. *Int J Pharm.* janv 2014;460(1-2):280-8.
 55. Madhuri N, Tejaswini N, Patel M, Jyothi P, Jyothsna K, Mallikarjun PN. STATISTICAL OPTIMIZATION AND EVALUATION OF ETHOSOMAL MICONAZOLE NITRATE SUSPENSION. *Int J Appl Pharm.* 7 janv 2022;295-301.
 56. Bragagni M, Mennini N, Maestrelli F, Cirri M, Mura P. Comparative study of liposomes, transfersomes and ethosomes as carriers for improving topical delivery of celecoxib. *Drug Deliv.* oct 2012;19(7):354-61.
 57. Srivastava N, Singh K, Amrit K. Formulation and evaluation of seabuckthorn leaf extract loaded ethosomal gel. *Asian J Pharm Clin Res.* 2015;8(5):316-20.
 58. Nainwal N, Jawla S, Singh R, Saharan VA. Transdermal applications of ethosomes – a detailed review. *J Liposome Res.* 3 avr 2019;29(2):103-13.
 59. Akhtar N, Verma A, Pathak K. Feasibility of binary composition in development of nanoethosomal glycolic vesicles of triamcinolone acetonide using Box-behnken design: *in vitro* and *ex vivo* characterization. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* 18 août 2017;45(6):1123-31.
 60. Chauhan N, Vasava P, Khan SL, Siddiqui FA, Islam F, Chopra H, et al. Ethosomes: A novel drug carrier. *Ann Med Surg.* 8 sept 2022;82:104595.
 61. Chalal C, Salmi O. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Mentha x piperita* L. en combinaison avec les antibiotiques. Université Mouloud Mammeri; 2018.
 62. Abdelaziz B, Chahinez O, Djamel EH. IMPACT DE LA FORMULATION SUR LE POTENTIEL ANTIFONGIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DU BIGARADIER *CITRUS AURANTIUM* L. 2019;

Références Bibliographiques

63. Pharmacopée européenne. 10e Edition. 2019.
64. Sahoré AD, Abouattier JL. Quelques méthodes d'analyse biochimique de produits alimentaires. 2016.
65. MATOUGUI M, BENZAGOUTA D. Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus vis-à-vis de Fusarium spp. d'intérêt médical Etude prospective. Université des Frères Mentouri Constantine 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie; 2020.
66. Ponce AG, Fritz R, Del Valle C, Roura SI. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. LWT-Food Sci Technol. 2003;36(7):679-84.
67. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA, USA.; 2001.
68. Koba K, Sanda K, Raynaud C, Nenonene YA, Millet J, Chaumont JP. Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois Cymbopogon sp. africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie. Ann Méd Vét. 2004;148:202-6.
69. Ijplcp C, Kumar, Dubey A. Ethosomes: A Novel Approach in Transdermal Drug Delivery System. 1 mai 2020;11:6598-608.
70. Bouchoucha M. Développement de nanoparticules de silice mésoporeuse multifonctionnelles: synthèse, caractérisation et applications biomédicales. 2017;
71. Hamdani FZ, Allem R. Propriétés antifongiques des huiles essentielles des feuilles de Citrus vis-à-vis d'Alternaria alternata et Penicillium sp in vitro. Phytothérapie. oct 2017;15(5):263-6.
72. Hamdani FZ, Allem R. Propriétés antifongiques des huiles essentielles des feuilles de Citrus vis-à-vis d'Alternaria alternata et Penicillium sp in vitro. Phytothérapie. 2017;15(5):263-6.
73. OUGUELMANE A, HOUICHITI R. Etude des activités biologiques d'une plante aromatique médicinale locale " Citrus aurantium". 2020 ;جامعة غرداية.
74. Boukhenoufa A. La formulation des extraits naturels de plantes médicinales de la région de Mascara et évaluation de l'activité antifongique sur Candida albicans isolée cliniquement. 2020;
75. Boukhatem MN, Hamaidi MS, Saidi F, Hakim Y. Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (Pelargonium graveolens L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). Nat Technol. 2010;(3):37.
76. BEN SEDDIK KZ, BEN SEDDIK MO. L'effet de méthode d'extraction sur la production d'huiles essentielles à partir de citrus aurantium (région de Ghardaïa). 2021.
77. Goudjil MB. Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de trois plantes aromatiques. [Internet] [Thesis]. 2017 [cité 4 janv 2024]. Disponible sur: <http://dspace.univ-ouargla.dz/jspui/handle/123456789/13388>
78. AHLEM T, MAROUA M. Etude des caractéristiques physiques et chimiques des huiles essentielles du clou de girofle et de l'eucalyptus. 2020;

Références Bibliographiques

79. Caccioni DR, Guizzardi M, Biondi DM, Renda A, Ruberto G. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Int J Food Microbiol.* 1998;43(1-2):73-9.
80. Anwar S, Ahmed N, Speciale A, Cimino F, Saija A. Bitter orange (*Citrus aurantium* L.) oils. In: *Essential oils in food preservation, flavor and safety.* Elsevier; 2016. p. 259-68.
81. Chintaluri AK, Komarraju AL, Chintaluri VK, Vemulapalli B. Comparative study of antimicrobial activity of essential oils of selected plants of Rutaceae and TLC bioautographic studies for detection of bioactive compounds. *J Essent Oil Res.* 2015;27(1):9-16.
82. Ammar AH, Bouajila J, Lebrihi A, Mathieu F, Romdhane M, Zagrouba F. Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of *Citrus aurantium* L. flowers essential oil (Neroli oil). *Pak J Biol Sci.* 2012;15(21):1034-40.
83. Trabelsi D, Hamdane AM, Said MB, Abdrrabba M. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from flowers, leaves and peels of Tunisian *Citrus aurantium* against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *J Essent Oil Bear Plants.* 2016;19(7):1660-74.

Résumé :

L'utilisation excessive des antifongiques à long terme a entraîné l'apparition de résistance. La recherche actuelle explore de nouvelles formulations à base d'éthosomes pour améliorer l'efficacité et réduire les effets indésirables. Les huiles essentielles en d'autres part, avec leurs vastes activités biologiques contre de nombreuses espèces fongiques, offrent une alternative prometteuse. Dans cette perspective, notre étude vise à formuler des éthosomes à partir de l'HE de *C. aurantium* et à évaluer son activité antifongique contre trois souches de *C. albicans*.

Dans une première partie, les HE de *C. aurantium* ont été obtenues par méthodes d'hydrodistillation et d'entraînement à la vapeur d'eau, à partir des feuilles récoltées à Tlemcen, pour procéder par la suite à une analyse physico-chimiques. Les propriétés antifongiques ont été étudiées par la méthode de diffusion par la technique des puits et par la méthode de microdilution sur des plaques Elisa à 96 puits. L'huile essentielle libre a présenté une activité antifongique significative avec des zones d'inhibition allant de $22.5 \pm 0,7$ à $23.5 \pm 0,7$ mm et une CMI de 5.3mg/ml.

Dans une deuxième partie, nous avons formulé des éthosomes classiques. La formulation présentant une taille de particules minimale et un potentiel zêta optimal a été choisi pour véhiculer différentes concentrations d'HE comprises entre 53 et 132 mg/ml. Pour donner par la suite des diamètres d'inhibition compris entre 10 et 20mm, et une CMI de 1.656mg/ml.

Grace aux résultats des deux parties, nous avons pu apprécier l'amélioration du pouvoir antifongique de la forme nanoencapsulé par rapport à l'HE libre.

Mot-cles : Ethosomes, huile essentielle, *Citrus aurantium*, Activité antifongique, *Candida Albicans*.

Abstract :

Antifungals are commonly used, but their long-term excessive use has led to the emergence of resistance. Current research explores new formulations based on ethosomes to enhance efficacy and reduce side effects. Essential oils, with their broad biological activities against numerous fungal species, offer a promising alternative. Accordingly, our study aims to formulate ethosomes from *C.aurantium* EO and evaluate its antifungal activity against three strains of *C.albicans*.

In the first part, *C.aurantium* EOs were obtained from leaves using two methods: hydrodistillation and steam distillation, from samples collected in Tlemcen, then followed by a physico-chemical analysis. Antifungal properties were assessed using the disk diffusion method and microdilution method on 96-well Elisa plates. Free essential oil exhibited significant antifungal activity with inhibition zones ranging from 22.5 ± 0.7 to 23.5 ± 0.7 mm and an MIC of 5.3 mg/ml.

In the second part, we have formulated classical ethosomes. The formulation with minimal particle size and optimal zeta potential was selected to deliver various EO concentrations ranging from 53 to 132 mg/ml, resulting in inhibition diameters ranging from 10 to 20 mm and an MIC of 1.656 mg/ml.

Through the results of both parts, we observed improved antifungal efficacy of the nanoencapsulated form compared to free EO.

Keywords: Ethosomes, essential oil, *Citrus aurantium*, Antifungal Activity, *Candida Albicans*.

ملخص

استخدام المضادات الفطرية المفرط على المدى الطويل أدى إلى مقاومة الجسم لها. الأبحاث الحالية تستكشف تركيبات جديدة تعتمد على الإيثوسومات لتحسين الفعالية وتقليل الآثار الجانبية. الزيوت الأساسية من ناحية أخرى، مع أنشطتها البيولوجية الواسعة ضد العديد من أنواع الفطريات، تقدم بديلاً واعداً. في هذا السياق، تهدف دراستنا إلى صياغة إيثوسومات من زيت *C. aurantium* وتقييم نشاطه المضاد للفطريات ضد ثلاث سلالات من *C. albicans*. في الجزء الأول، تم الحصول على زيوت *C. aurantium* الأساسية عن طريق طرق التقطير المائي والجر بالماء البخاري، من الأوراق التي جُمعت من تلمسان، لإجراء تحليل فيزيائي كيميائي لاحقاً. تم دراسة الخصائص المضادة للفطريات بواسطة طريقة الانتشار بتقنية الأبار وبطريقة التخفيف الميكروي على ألواح الإيزاب 96 بئراً. أظهرت الزيت الأساسية الحرة نشاطاً مضاداً للفطريات ملحوظاً مع مناطق تثبيط تتراوح بين 22.5 ± 0.7 إلى 23.5 ± 0.7 مم و CMI 5.3 ملغم/مل. في الجزء الثاني، قمنا بصياغة إيثوسومات كلاسيكية. تم اختيار التركيبة التي تظهر أصغر حجم للجسيمات وأفضل جهد زيتاً لتحمل تركيزات مختلفة من الزيت الأساسي بين 53 و 132 ملغم/مل. لتعطي بعد ذلك أقطار تثبيط تتراوح بين 10 و 20 مم، و CMI 1.656 ملغم/مل. بفضل نتائج الجزأين، تمكنا من تقييم تحسين القدرة المضادة للفطريات للشكل النانوي المغلف مقارنة بالزيت الأساسي الحر الكلمات المفتاحية: إيثوسومات، زيت أساسي، *Citrus aurantium*، نشاط مضاد للفطريات، *Candida Albicans*.