

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
People's Democratic Republic of Algeria
The Minister of Higher Education and Scientific Research
ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ

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 :

Etude de l'influence des paramètres de formulation et de procédès sur les caractéristiques d'un nanomédicament à activité antifongique

Présenté par :

**Khaoua Rym
Guenifed Ismahene**

Soutenu le :

02 Juin 2024

Jury

Président :

Dr Kenniche Assia

Maitre de conférence A en chimie thérapeutique et bio-organique

Membres :

Dr Gana Fatema Zohra

Maitre assistante en pharmacie technologique

Dr Benmeddah S

Maitre-assistante en parasitologie-mycologie médicale

Encadrant :

Dr Baghli Faiza

Maitre assistante en pharmacie galénique

Année universitaire : 2023-2024

Remerciements :

Nous exprimons notre gratitude envers Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force, la volonté et la patience d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de DR BAGHLI FAIZA, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nous tenons à exprimer notre respect aux membres du jury,

Nous commençons d'abord par Professeur KENNICHE ASIA Maitre de conférence A en chimie thérapeutique et bio-organique, qui a accepté de consacrer du temps à examiner et juger ce travail comme présidente de Jury.

Dr GANA FATEMA ZOHRRA Maitre-assistante en pharmacie technologique

DR BENMEDDAH .S Maitre-assistante en parasitologie-mycologie médicale - CHU de Tlemcen.

Vous avez accepté de juger ce travail avec une spontanéité et une simplicité émouvante. Nous tenons à vous exprimer nos sincères remerciements et notre profond respect.

Dédicaces :

Je dédie ce travail

Tout d'abord à mes chers parents **Khaoua Fethallah** et **Borsla Sihem** ainsi qu'à mon grand frère **Youcef**, merci pour votre soutien sans faille, pour votre confiance en moi et pour tous vos efforts qui m'ont permis d'arriver jusque-là où j'en suis aujourd'hui.

A ma **grand-mère**, mes **tantes** et tous les **membres de ma famille** ayant participé de près ou de loin à la réussite de mon parcours.

A mon binôme **Ismahene**, du premier TP de chimie organique à la rédaction de ce mémoire on en a fait du chemin ensemble, travailler avec toi fut un plaisir.

A mes amies **Meriem**, **Chahinez** et **Kawther** merci d'avoir rendu ces six longues années plus agréables et remplies de bons souvenirs.

A mes amies du lycée **Ahlem** et **Amani** que je considère comme mes sœurs, merci de m'avoir toujours soutenu.

A travers cette modeste dédicace je compte vous faire part de ma profonde gratitude et mon immense reconnaissance à votre égard.

Khaoua Rym

Dédicaces :

Je dédie cet évènement marquant de ma vie

A ma chère mère **Ilhem**, qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'étude et qui n'a jamais cessé de prier pour moi.

Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A mon cher père **Samir** pour ses sacrifices à fin que rien n'entrave le déroulement de mes études.

A celui qui m'a soutenu tout au long de ce projet et qui a toujours été présent pour moi, mon futur mari **Adel**.

A mes chères sœurs **Amel, Sabrina, Norhane**, et mon cher beau-frère **Chemsou** pour leur encouragement et leur bonté qu'ils m'ont accordé, j'exprime ma profonde reconnaissance et mon grand respect.

Et sans oublier mes **grands-parents** et ma **belle-famille**.

A **Rym**, chère amie avant d'être binôme qui m'a accompagnée durant tous ces six ans, aucun moment d'accompagnement, ne sera oublié pour moi, j'ai partagé avec toi d'inoubliables souvenirs, et je te souhaite beaucoup de réussite et de bonheur dans ta vie professionnelle et privée.

A mes chères amies **Guellil Chahinez** et **Merzouk Meriem**.

Guenifed Ismahene

TABLE DES MATIERES :

LISTE DES FIGURES :	I
LISTE DES TABLEAUX :	III
LISTE DES ANNEXES :	IV
LISTE DES ABREVIATIONS :	V
Introduction générale :	VII
Partie théorique :	
Chapitre I : Structure de la peau et physiologie de l'absorption	1
I.1 Structure de la peau :	2
I.2 La couche cornée :	3
I.3 Physiologie de l'absorption percutanée :	3
I.4 Facteurs influençant l'absorption percutanée :	5
I.4.1 Les facteurs biologiques :	5
I.4.2 Les facteurs physicochimiques :	6
I.4.3 Les facteurs environnementaux :	7
Chapitre II : Les antifongiques et <i>Candida albicans</i>	8
II.1 Classification et mécanisme d'action des antifongiques :	9
II.2 <i>Candida albicans</i> et Candidoses :	10
II.3 Traitement de la Candidose cutanéomuqueuse :	11
II.4 Résistance aux antifongiques :	12
II.5 Le Fluconazole :	14
II.5.1 Indications :	14
II.5.2 Caractères physico-chimiques[30] :	15
II.5.3 Mécanisme d'action :	15
II.5.4 Effets indésirables du Fluconazole selon la voie d'administration :	15
II.6 Nouveaux systèmes d'administration de médicaments développés pour chaque médicament antifongique :	16
Chapitre III : Les systèmes d'administration de médicaments par voie transdermique et les éthosomes	17
III.1 Les systèmes d'administration de médicaments par voie transdermique (TDDS) :	18
III.2 Définition et structure des éthosomes :	19
III.3 Applications :	20
III.4 Avantages et inconvénients des éthosomes :	22

III.5 Les différents types d'éthosomes :	23
III.6 Mécanisme de pénétration :	24
III.7 Méthodes de formulation des éthosomes :	25
III.8 Contrôle des éthosomes :	26
Partie expérimentale :	
Problématique :	30
Objectifs de l'étude :	30
Chapitre IV : Matériel et méthodes	31
IV.1 Matériel :	32
IV.2 Méthodes :	34
Chapitre V : Résultats et discussion	44
V.1 Résultats :	45
V.1.1 Mesure de la taille des particules et du potentiel zêta des éthosomes à blanc et binaires :	45
V.1.2 Résultats de la détermination du pourcentage d'encapsulation du Fluconazole (EE%) :	46
V.1.3 Résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI de la solution de Fluconazole et de la formulation éthosomale binaire optimale par la méthode des microplaques :	47
V.2 Discussion :	49
V.2.1 Influence du temps de sonication sur la taille des particules :	49
V.2.2 Influence de l'éthanol sur la taille des particules et le potentiel zêta:	50
V.2.3 Influence de lécithine de soja sur la taille des particules :	53
V.2.4 Influence de l'éthanol et de la lécithine de soja sur le pourcentage d'encapsulation (EE%) :	55
V.2.5 Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI de la solution de Fluconazole et de la formulation éthosomale binaire optimale par la méthode des microplaques :	57
CONCLUSION GENERALE :	59
Références bibliographiques :	60

LISTE DES FIGURES :

Figure 01. Structure de la peau.....	3
Figure 02. Les trois principales voies de pénétration des principes actifs[1].....	5
Figure 03. Les transitions morphologiques de <i>Candida albicans</i> au cours du processus d'infection.....	10
Figure 04. Mécanisme de résistance aux antifongiques azolés.....	13
Figure 05. Mécanisme de résistance aux polyènes.....	13
Figure 06. Mécanisme de résistance aux échinocandines.....	14
Figure 07. Principaux types de nanopORTEURS utilisés pour l'administration de médicaments par voie transdermique[51].....	19
Figure 08. Structure de base des éthosomes[55].....	20
Figure 09. Les différentes applications des éthosomes par la voie transdermiques [56].....	21
Figure 10. Représentation structurelle des liposomes et différents types d'éthosomes[1].....	24
Figure 11. Mécanisme de pénétration des éthosomes[55].....	25
Figure 12. Schéma représentatif de la méthode classique à froid pour la préparation des systèmes éthosomales[63].....	26
Figure 13. Lécithine de soja et Fluconazole pour la préparation des éthosomes.....	33
Figure 14. Les étapes de formulation des éthosomes par la méthode à froid.....	34
Figure 15. Zeta sizer nanoseries.....	37
Figure 16. Spectrophotomètre pour la mesure des absorbances des solutions de Fluconazole.....	38
Figure 17. Détermination de la quantité du Fluconazole non encapsulée par la méthode de l'ultra centrifugation.....	38
Figure 18. Laboratoire LAMAABE.....	39
Figure 19. Etapes de la préparation des milieux de culture.....	39
Figure 20. Etapes de la revivification des souches de <i>Candida albicans</i>	40
Figure 21. Lecture des boîtes de Pétri de la souche ATCC 26, ATCC1010, Cai en comparaison avec le témoin négatif.....	40
Figure 22. Pesée du Fluconazole.....	41
Figure 23. Préparation de l'inoculum.....	41
Figure 24. Ajustement de la densité optique de l'inoculum des différentes souches à l'aide d'un densitomètre.....	42
Figure 25. Détermination de la CMI sur microplaque de dilution.....	43

Figure 26. Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration du Fluconazole.....	46
Figure 27. Lecteur de microplaques BioTek ELx808	48
Figure 28. Influence du temps de sonication sur la taille des particules des éthosomes à blanc	49
Figure 29. Influence de la concentration de l'éthanol sur la taille des particules des éthosomes à blanc	50
Figure 30. Influence de la concentration de l'éthanol sur le potentiel zêta des éthosomes à blanc.....	51
Figure 31. Influence de la concentration de l'éthanol sur la taille des particules des éthosomes binaires.....	52
Figure 32. Influence de la concentration de l'éthanol sur le potentiel zêta des éthosomes binaires.....	53
Figure 33. Influence de la lécithine de soja sur la taille des particules des éthosomes à blanc ..	53
Figure 34. Influence de la lécithine de soja sur le potentiel zêta des éthosomes à blanc	54
Figure 35. Influence de la lécithine de soja sur la taille des particules des éthosomes binaires	54
Figure 36. Influence de la lécithine de soja sur le potentiel zêta des éthosomes binaires.....	55
Figure 37. Influence de l'éthanol et de la lécithine de soja sur le pourcentage d'encapsulation (EE%) des éthosomes binaires.....	56

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau I. Traitement de la candidose par voie cutanée.....	11
Tableau II. Traitement de la candidose par voie systémique.....	11
Tableau III. Caractères physico-chimiques du Fluconazole.....	15
Tableau IV. Nouveaux systèmes d'administration de médicaments développés pour chaque médicament antifongique.....	16
Tableau V. Avantages et inconvénients des éthosomes.....	22
Tableau VI. Matériel utilisé dans la partie expérimentale	32
Tableau VII. Composition des formulations éthosomales à blanc	35
Tableau VIII. Composition des formulations éthosomales binaires	36
Tableau IX. Taille des particules et le potentiel zêta des éthosomes à blanc	45
Tableau X. Taille des particules et le potentiel zêta des éthosomes binaires.....	46
Tableau XI. Tableau des absorbances des dilutions de Fluconazole	46
Tableau XII. Tableau des absorbances des surnageants des éthosomes binaires.....	47
Tableau XIII. Résultats des pourcentages d'encapsulations des éthosomes binaires	47
Tableau XIV. Résultats des CMI de la solution de (FLZ) et de la formulation éthosomale binaire optimale	48

LISTE DES ANNEXES :

Annexe I. Etude de l'influence du temps de sonication, de la concentration de l'éthanol et de la concentration de la lécithine de soja sur la taille des particules, le potentiel zêta sur les éthosomes binaires	66
--	----

LISTE DES ABREVIATIONS :

5-FU : 5-Fluorouracile.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AG : Glycyrrhizinate d'ammonium.

ATCC : American Type Culture Collection.

BHIB : Brain heart infusion broth.

CHU : Centre hospitalo-universitaire.

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CYP450 : Cytochromes P450.

DCI : Dénomination commune internationale.

DMSO : Dimethyl sulfoxyde.

D.O : Densité optique.

EE% : Entrapment efficiency.

ERG : Ergosterol.

FLZ : Fluconazole.

LAMAABE : Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-Alimentaire, au Biomédical et à l'Environnement.

PA : Principe actif.

PC : Phosphatidylcholine.

PDA : Potato Dextrose Agar.

PEG : Polyéthylène glycol.

PG : Propylène glycol.

PL90 : Phospholipon 90

PS : Phosphatidylsérine.

PTA : Acide phosphotungstique.

PZ : Potentiel zeta.

QSP : Quantité suffisante pour.

Rpm : Rotation Per Minute.

SDA : Sabouraud dextrose agar.

SD : Sabouraud dextrose.

TC% : Taux de chargement.

TDDS : Transdermal drug delivery system.

TEM : Microscopie électronique à transmission.

UFC/ml : Unité Faisant Colonie par millilitre.

UV : Ultraviolet.

Introduction générale :

Le traitement dermique des infections fongiques s'est avéré très avantageux en raison de divers facteurs tels que le ciblage du site de l'infection, la minimisation des effets secondaires systémiques, l'amélioration de l'efficacité du traitement et l'amélioration de l'observance du traitement chez le patient. Le principe actif de choix pour les infections fongiques cutanées est le Fluconazole qui a un large spectre d'activité qui inclut à la fois les dermatophytes et les levures. Ce principe actif est particulièrement efficace dans le traitement des formes muqueuses et cutanées de la candidose. Bien que ces agents soient actifs sur le plan thérapeutique, lors de l'application dermique leur diffusion à travers la peau est limitée par la barrière cutanée représentée par la couche cornée, ce qui se traduit par une efficacité moindre. Ainsi, pour faciliter l'administration de médicaments antifongiques et améliorer les aspects du traitement, divers nouveaux vecteurs ont été mis au point[2, 3].

Les systèmes vésiculaires tels que les éthosomes et plus précisément les éthosomes binaires sont des vésicules lipidiques composées de phospholipides, d'un mélange d'alcool présent en concentration relativement élevée et d'eau. Ils représentent l'une des approches les plus prometteuses pour l'administration dermique de substances actives et offre de nouvelles possibilités d'application dermique du Fluconazole dans le traitement des infections fongiques. Ces vecteurs vésiculaires sont des vecteurs non invasifs qui permettent aux médicaments d'atteindre les couches profondes de la peau tout en minimisant les effets secondaires systémiques et en prolongeant l'action thérapeutique locale [3-5].

Dans notre étude, les éthosomes binaires ont été formulés en faisant varier les paramètres de formulation et de procédés tels que les concentrations de la lécithine de soja et du mélange d'éthanol et d'alcool isopropylique ainsi que le temps de sonication. Les formulations ont été évaluées en fonction de la taille des particules, le potentiel zêta et l'efficacité de piégeage du Fluconazole.

Notre travail se décline ainsi en deux parties, une partie théorique et une partie expérimentale. Dans la première partie, nous exposerons une synthèse bibliographique sur la structure de la peau et la physiologie de l'absorption cutanée, Les antifongiques et la candidose ainsi que les systèmes d'administration de médicaments par voie transdermique et les éthosomes.

La deuxième partie fera l'objet de la formulation d'éthosomes à blanc et binaires et l'étude de l'influence des paramètres de formulations et de procédés sur la taille des particules, le

potentiel zêta et le pourcentage d'encapsulation (EE%), ainsi que la détermination de l'activité

antifongique du Fluconazole brut en solution, en comparaison avec celle du principe actif encapsulé dans les nanoporteurs vésiculaires.

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I : Structure de la peau et physiologie de l'absorption

La peau constitue de 15 à 20 % de la masse corporelle, c'est donc le plus grand organe du corps humain, elle agit comme une interface avec l'environnement, elle protège les tissus sous-jacents et les organes internes et répond également aux stimuli externes, évitant les dangers et les blessures.

En tant que barrière physique, la peau fournit la première ligne de défense contre les risques environnementaux et protège notre corps contre les dommages causés par les UV, les produits chimiques et agressions mécaniques, blessures et invasion de microorganismes, empêche la déshydratation et régule la température corporelle[6].

La peau est très sélective quant à ce qu'elle laisse entrer ou sortir du corps et à quelle vitesse. Cela représente un défi pour l'administration de médicaments, car les principes actifs sont susceptibles d'être mal absorbés en raison de la faible perméabilité cutanée[7].

I.1 Structure de la peau :

La peau est en continuité avec les membranes muqueuses qui tapissent la surface du corps, elle est composée de trois couches allant de l'intérieur vers l'extérieur : l'hypoderme, le derme et l'épiderme :

I.1.1 L'hypoderme :

L'hypoderme est composé de tissu adipeux, qui sert au stockage de l'énergie et de support pour la peau. C'est aussi l'origine de certains vaisseaux sanguins qui s'étendent jusqu'au derme, il joue un rôle important dans le processus de thermorégulation en empêchant la perte excessive de chaleur du corps[6, 8].

I.1.2 Le derme :

Le derme est essentiellement un tissu conjonctif dont les cellules ne représentent que 10%, tandis que les composants acellulaires constituent la majorité de son contenu[6].

I.1.3 L'épiderme :

L'épiderme se compose de cinq couches de cellules épithéliales, de profond à superficiel, les couches épidermiques sont : le stratum basale, le stratum spinosum, le stratum granulosum, le stratum lucidum et le stratum corneum.[6] À l'exclusion de la couche cornée, le reste de l'épiderme est composé de cellules nucléées et donc collectivement appelé épiderme viable. L'épiderme viable est habituellement de 50 à 100 µm d'épaisseur et dépourvu de capillaires sanguins et de terminaisons nerveuses sensorielles. Il est composé principalement de kératinocytes (95 %), le reste étant des cellules de Langerhans, des mélanocytes et des

cellules de Merkel. Les kératinocytes proviennent de la couche basale et subissent une différenciation progressive tout en migrant vers la couche cornée[7].

I.2 La couche cornée :

Etant la couche la plus externe de l'épiderme, la couche cornée constitue la première ligne de défense de l'organisme et joue un rôle essentiel en tant que barrière protectrice de la peau contre l'environnement extérieur. La couche cornée favorise l'hydratation et la rétention d'eau, ce qui empêche la peau de se fissurer. Elle est constituée de cornéocytes, qui sont des kératinocytes anucléés ayant atteint le stade final de la différenciation kératinocytaire. Les cornéocytes retiennent les filaments de kératine dans une matrice de filaggrine, et l'enveloppe lipidique cornifiée remplace la membrane plasmique des kératinocytes. Ces cellules plates s'organisent en briques et mortier au sein d'une matrice extracellulaire riche en lipides[9].

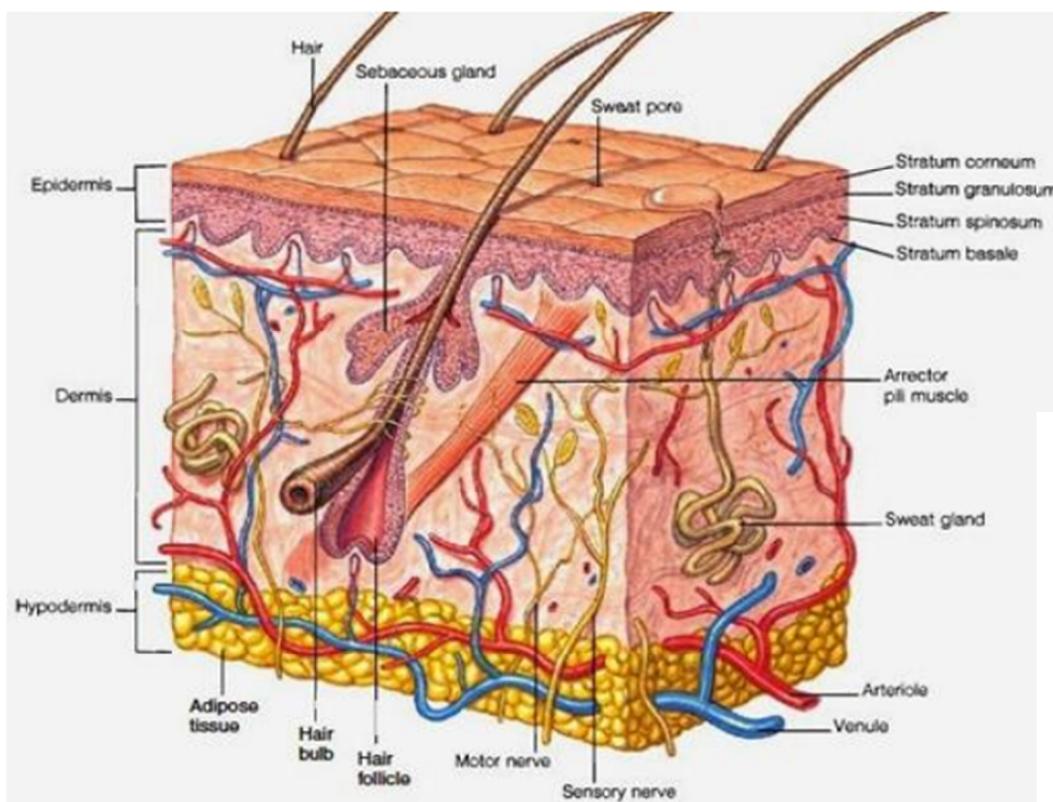


Figure 01. Structure de la peau

I.3 Physiologie de l'absorption percutanée :

En raison de la grande surface de la peau (environ 2 m²), la formulation de médicaments à action dermique semble être une alternative intéressante. Mais, en raison de la fonction barrière de la peau, cette méthode est loin d'être simple. 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 sont principalement responsables de la fonction barrière de la peau humaine. La peau protège le corps des substances pénétrantes par divers mécanismes, soit en bloquant mécaniquement les particules de migrer dans la peau, soit en les neutralisant ou en les dégradant. Les substances qui pénètrent à travers la couche cornée doivent encore surmonter de nombreux autres obstacles[10]. Au cours du processus de pénétration percutanée, le principe actif peut diffuser à travers l'épiderme lui-même ou par la voie accessoire, constituée principalement de follicules pileux, glandes sébacées et des conduits de la sueur. Par conséquent, il existe deux voies principales de pénétration des médicaments[11] :

I.3.1 Voie des cornéocytes (voie transépidermique) :

I.3.1.a Voie intracellulaire :

Dans ce cas, le principe actif passe par les cellules de la couche cornée. En général, les (PA) hydrophiles empruntent cette voie. Lorsque la couche cornée est hydratée, l'eau s'accumule près de la surface externe des filaments protéiques. Les molécules polaires semblent passer à travers cette eau immobilisée [11].

I.3.1.b Voie intercellulaire :

Les substances non polaires passent par la voie intercellulaire. Ces molécules se dissolvent et diffusent à travers la matrice lipidique non aqueuse imbibée entre les filaments protéiques[11].

I.3.2 Voie accessoire (Shunt pathway) :

Le principe actif peut contourner la couche cornée en empruntant la voie des appendices cutanés ou voie « accessoire » à travers les follicules pileux ou les conduits sudoripares. La surface de ces appendices est plutôt petite (environ 0,1% de la surface de la peau) limitant l'utilisation pratique de cette voie pour la plupart des médicaments[12]. Cependant, cette voie peut être d'une certaine importance pour les composés polaires.

La voie par laquelle la perméation se produit dépend en grande partie des caractéristiques physico-chimiques du principe actif pénétrant, car la couche cornée agit comme un milieu de diffusion passif[11].

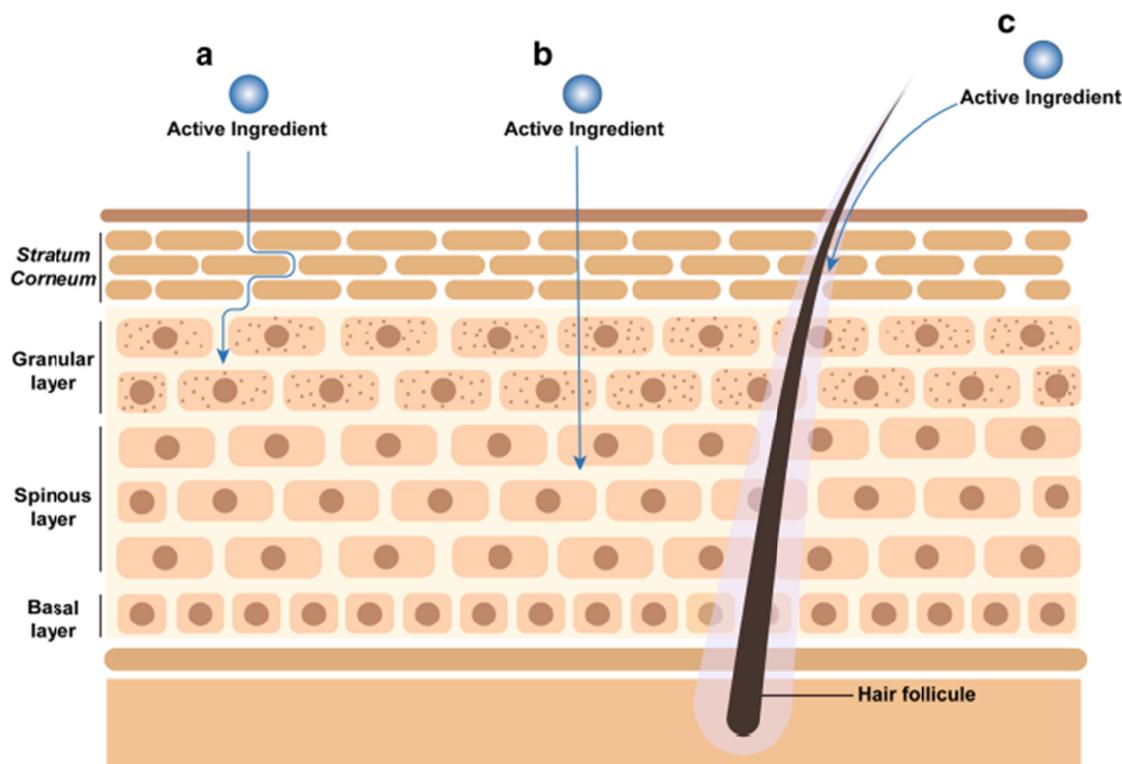


Figure 02. Les trois principales voies de pénétration des principes actifs[1]

I.4 Facteurs influençant l'absorption percutanée :

Les médicaments à action dermique, largement utilisés pour traiter les affections cutanées, sont passés de simples préparations à des systèmes d'administration sophistiqués. Leur développement a été facilité par les progrès de l'absorption percutanée et de la conception des produits basés sur une compréhension de plus en plus mécaniste des interactions entre le (PA), la forme galénique et la peau, Au moins 20 facteurs cliniquement pertinents affectent l'absorption percutanée des médicaments parmi lesquels on peut citer les suivants[13, 14] :

I.4.1 Les facteurs biologiques :

I.4.1.a L'état de la peau :

Bien que la peau intacte agisse comme une barrière, de nombreuses substances telles que les acides et les bases peuvent franchir cette dernière et pénétrer à travers les différentes couches de la peau. La peau est faiblement acide, c'est pourquoi les médicaments faiblement acides y pénètrent facilement. De nombreux solvants fluidifient la structure dense et complexe de la couche cornée tel que le méthanol, le chloroforme qui perturbe la fraction lipidique, formant les voies artificielles par les quelles les molécules médicamenteuses peuvent passer facilement[13, 15].

I.4.1.b Le flux sanguin :

La circulation sanguine périphérique est un facteur important de l'absorption des médicaments à action transdermique, l'augmentation du flux sanguin provoque l'absorption rapide de ces médicaments[15].

I.4.1.c Le site d'application du médicament :

L'épaisseur de la peau, la nature de la couche cornée et la densité des appendices varient d'un site à l'autre, ces facteurs affectent de manière significative la pénétration médicamenteuse[13].

I.4.1.d Le métabolisme cutané :

La peau métabolise les stéroïdes, les hormones, les carcinogènes chimiques et certains médicaments. Le métabolisme de la peau détermine donc l'efficacité des médicaments à action transdermique[13].

I.4.2 Les facteurs physicochimiques :**I.4.2.a L'hydratation de la peau :**

Au contact de l'eau, la perméabilité de la peau augmente considérablement. L'hydratation est le facteur le plus important dans l'augmentation de la perméabilité cutanée. Dans ces conditions, le (PA) peut facilement traverser la membrane cutanée, certains agents hydratants sont utilisés dans la formulation des médicaments à action transdermique, comme les humectants[13, 15].

I.4.2.b La température de la peau :

Le coefficient de diffusion de l'absorption des médicaments varie en fonction de la température de la peau. Une température basse entraîne un faible coefficient de diffusion et donc une faible absorption du médicament[15].

I.4.2.c Le pH de la peau :

Seules les molécules non ionisées peuvent traverser facilement la membrane lipidique de la peau. Si le pH du médicament est similaire à celui de la peau, l'absorption se fait rapidement[15].

I.4.2.d Le coefficient de diffusion :

La pénétration du médicament dépend du coefficient de diffusion du médicament. A température constante, le coefficient de diffusion du médicament dépend des propriétés du médicament, du milieu de diffusion et l'interaction entre eux[15].

I.4.2.e Le coefficient de partage :

C'est un facteur physicochimique majeur pour l'absorption des médicaments. Un coefficient de partage optimal est nécessaire pour une bonne absorption du médicament, plus la valeur du coefficient de partage est faible, plus le taux d'absorption du médicament est faible[15].

I.4.2.f La taille moléculaire du médicament :

L'absorption des médicaments est inversement proportionnelle au poids moléculaire, un médicament de petite taille moléculaire pénètre plus rapidement qu'un médicament de taille élevée[13, 15].

I.4.3 Les facteurs environnementaux :**I.4.3.a La lumière du soleil :**

Sous l'effet de la lumière du soleil, les parois des vaisseaux sanguins s'amincissent. Une pigmentation élevée réduit également l'absorption des médicaments par la peau. La lumière directe du soleil peut réduire la stabilité du médicament[13, 15].

I.4.3.b La pollution de l'air :

La poussière peut obstruer les pores et augmenter le nombre de bactéries à la surface de la peau, ainsi Les polluants atmosphériques peuvent former une couche à la surface de la peau ; dans ces conditions, la libération du médicament est ralentie. Les bactéries présentes dans l'air peuvent facilement interférer avec la peau et la présence de diverses substances chimiques dans l'air peut réagir avec le médicament et en réduire l'efficacité[13, 15].

I.4.3.c Le climat froid :

Souvent, il en résulte des démangeaisons et une sécheresse de la peau. La peau réagit en augmentant sa production de sébum pour compenser les effets desséchants du climat. La teneur en eau de la peau devient très faible, les agents hydratants peuvent améliorer l'effet de séchage de la peau et augmenter la perméation des médicaments[13, 15].

Chapitre II : Les antifongiques et
Candida albicans

II.1 Classification et mécanisme d'action des antifongiques :

Actuellement, quatre classes de médicaments antifongiques sont utilisées par les cliniciens pour le traitement des infections fongiques. Ces classes sont caractérisées par un mode d'action unique ciblant différentes parties de la cellule fongique[16].

II.1.1 Les polyènes :

Les polyènes ont une activité fongicide à large spectre. Ils sont connus pour se lier au principal composant de la membrane cellulaire fongique, l'ergostérol, et entraînent la formation de canaux transmembranaires qui permettent la fuite du contenu cellulaire ainsi que des ions K^+ et Na^+ , ce qui entraîne la détérioration et la mort des cellules fongiques, Parmi les nombreux antifongiques polyènes, seuls trois : la nystatine, la natamycine et l'amphotéricine B, sont utilisés en clinique[17].

II.1.2 Les azolés :

Les azolés sont des composés hétérocycliques à cinq chaînons qui possèdent des propriétés antifongiques. Ils sont classés en deux groupes : Les imidazolés qui comprennent : le clotrimazole, l'éconazole, le kétoconazole, le miconazole, et le tioconazole. Les triazolés qui comprennent : le fluconazole, l'itraconazole, le voriconazole, l'isavuconazole et le posaconazole. Le fluconazole est le dérivé azolé le plus couramment utilisé dans le cadre d'une thérapie[18]. Les azolés agissent en ciblant l'enzyme de biosynthèse de l'ergostérol, la lanostérol 14- α -déméthylase, dépendante du cytochrome P450, codée par ERG11 (*C. albicans*) entraînant un blocage de la production d'ergostérol et l'accumulation de stérols intermédiaires toxiques. Ce stérol toxique induit un stress membranaire sévère sur la cellule et finit par inhiber la croissance du champignon[19].

II.1.3 Les échinocandines :

Les échinocandines sont des lipopeptides qui agissent comme des inhibiteurs non compétitifs de la (1,3)- β -D-glucane synthase, codée par le gène FKS1, provoquant ainsi une perte de l'intégrité de la paroi cellulaire et un stress sévère de la paroi cellulaire[19].

II.1.4 Autres :

II.1.4.a La pyrimidine :

La 5-fluorocytosine est un analogue de pyrimidine. Cette molécule est le précurseur du 5-fluorouracile (5-FU) qui est la molécule active. En effet, la 5-fluorocytosine pénètre dans la cellule fongique grâce à un transporteur membranaire, Ensuite une désamination , conduit au

(5-FU) qui est finalement phosphorylé et inhibe la synthèse de l'ADN et la synthèse protéique [20].

II.1.4.b Les allylamines :

Les allylamines constituent la nouvelle classe d'inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol, ils inhibent les premières étapes de la biosynthèse de l'ergostérol, ce qui entraîne une accumulation de squalène et l'absence d'autres dérivés de stérols, Les molécules importantes de ce groupe comprennent la naftifine et la terbinafine[17].

II.2 *Candida albicans* et Candidoses :

II.2.1 *Candida albicans* :

Candida albicans fait partie du microbiote normal des individus, c'est un pathogène opportuniste humain qui peut se développer sous forme de levure, de pseudohyphes ou de véritables hyphes, en fonction des conditions environnementales. La morphogenèse cellulaire réversible est un facteur de virulence important qui facilite l'invasion des tissus de l'hôte, l'échappement aux phagocytes et la dissémination dans la circulation sanguine[21].

Les infections à *Candida* spp. ont des manifestations cliniques variées, allant de troubles cutanéomuqueux superficiels à une infection invasive affectant plusieurs organes[22].

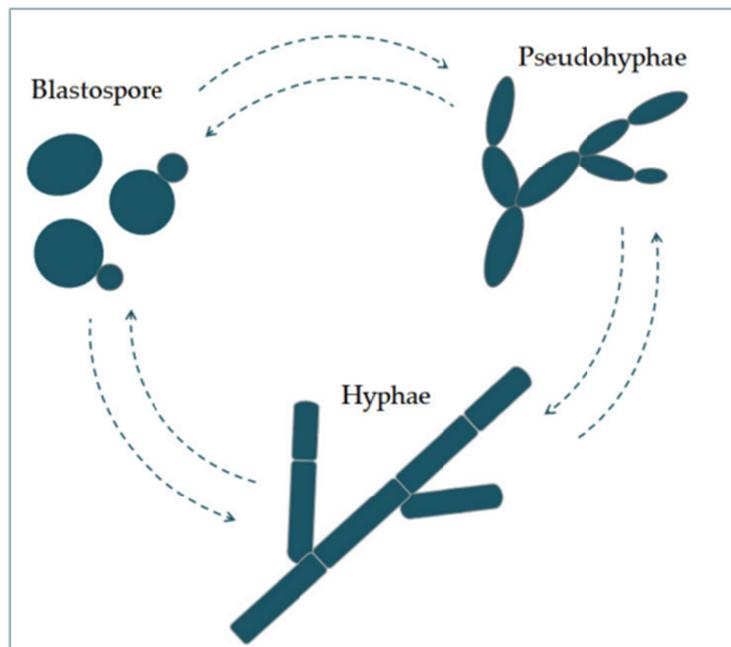


Figure 03. Les transitions morphologiques de *Candida albicans* au cours du processus d'infection

II.2.2 Candidose :

Les infections à *Candida* spp. sont l'une des infections fongiques les plus courantes en dermatologie. *Candida albicans* est responsable de 80 à 90 % des infections, mais d'autres espèces de *Candida* sont souvent considérées comme des agents pathogènes responsables. Les infections à *Candida* sont considérées comme opportunistes dans la majorité des cas, car *Candida albicans* est un champignon normalement commensal. Cependant, lorsque l'immunité de l'hôte est altérée pour diverses raisons, une infection pathogène peut se produire. Globalement, l'équilibre entre le système de défense de l'hôte et les facteurs de virulence de *Candida albicans* est la clé de la relation commensale. *Candida albicans* provoque généralement des infections cutanées superficielles, tandis que les mycoses "profondes", avec atteinte du derme et du sous-cutané due à *Candida*, sont rares. Cependant, chez les patients gravement immunodéprimés, une infection fongique invasive peut se produire, entraînant une pénétration profonde et une candidose systémique, souvent mortelle[22].

II.3 Traitement de la Candidose cutanéomuqueuse :

II.3.1 Voie cutanée [24] :

Tableau I. Traitement de la candidose par voie cutanée

DCI	DOSAGE	POSOLOGIE	TAUX DE GUERISON COMPLETE
Clotrimazole	1%	Deux fois par jour pendant 2 à 12 semaines	78% à 100%
Miconazole	2%	Deux fois par jour pendant 1- 4 semaines	81% à 100%
Nystatine	100 000 U/g	2 à 4 fois par jour pendant 6 à 28 jours.	68%

II.3.2 Voie systémique [24] :

Tableau II. Traitement de la candidose par voie systémique

DCI	DOSAGE	POSOLOGIE	TAUX DE GUERISON COMPLETE
Fluconazole	150 mg 50 mg	Une fois par semaine Une fois par jour pendant 2 à 4 semaines	82% à 100%
Kétoconazole	200 mg	Une fois par jour pendant 4 semaines	57%

Terbinafine	500 mg	Une fois par jour pendant 4 semaines	65%
--------------------	--------	---	-----

II.4 Résistance aux antifongiques :

Le traitement de la candidose, des infections superficielles aux infections invasives, repose sur un arsenal médicamenteux limité, composé de quatre grandes classes de médicaments antifongiques : les polyènes, les azolés et les échinocandines et les allylamines. Toutefois, cet arsenal est compromis par des problèmes de sélectivité, de toxicité et de développement de résistances. Le ciblage de la virulence représente une nouvelle approche attrayante pour le développement de médicaments antifongiques. Les recherches au cours des dernières décennies ont permis de mieux comprendre les facteurs de virulence de *C. albicans* et leur contribution à la pathogenèse de la candidose. Parmi ces facteurs, la filamentation est celui qui a reçu le plus d'attention[25].

L'utilisation fréquente et prophylactique d'antifongiques a conduit au développement d'une résistance robuste chez de nombreuses espèces de *Candida*. Le terme de résistance peut être défini comme une souche dont la concentration minimale inhibitrice CMI pour un antifongique particulier est supérieure à des seuils cliniques spécifiques ; la résistance peut également être utilisée de manière plus large pour indiquer une souche présentant une augmentation de la CMI à un antifongique par rapport à une souche de contrôle ou de référence[26].

II.4.1 La résistance aux antifongiques azolés :

La résistance aux antifongiques azolés chez *Candida* sp a été étudiée de manière plus approfondie chez *C. albicans*. L'un des mécanismes de résistance identifiés chez cette espèce est la présence de mutations ponctuelles dans la cible du médicament l'ERG11 ce qui entraîne une plus faible affinité de liaison du médicament pour l'enzyme lanostérol déméthylase. Des études antérieures ont identifié des substitutions d'acides aminés qui entraînent une diminution de la sensibilité au fluconazole et ont noté que plusieurs de ces variations alléliques critiques se regroupent dans trois régions "hot spot" au sein d'Erg11p. Récemment, 63 isolats cliniques de *C. albicans* résistants au (FLZ) ont été examinés à la recherche de mutations dans leurs allèles ERG11, et 55 se sont révélés porteurs d'au moins une mutation entraînant des substitutions d'acides aminés, neuf de ces substitutions prédites d'acides aminés étant nouvelles[26, 27].

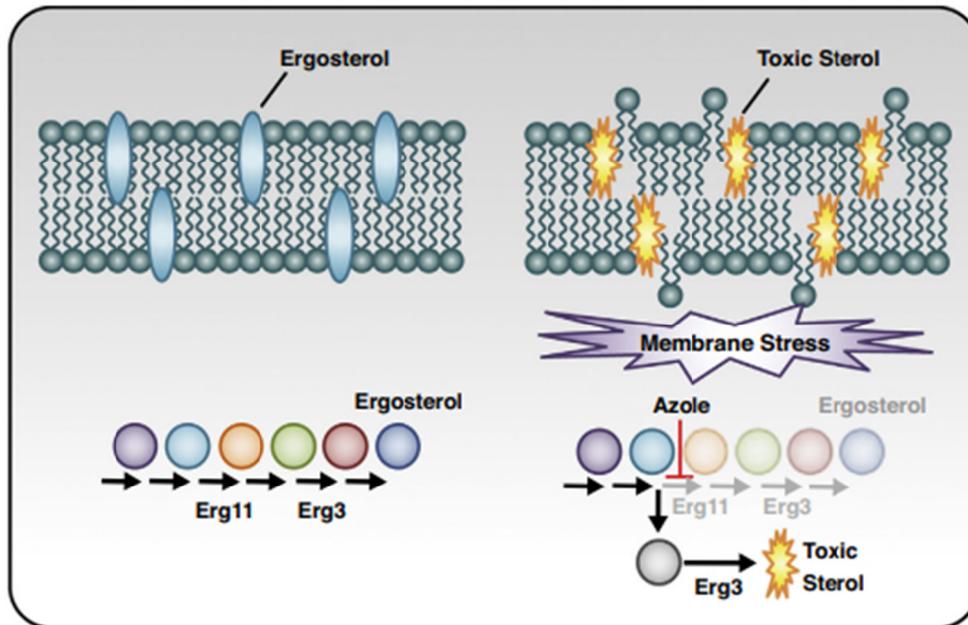


Figure 04. Mécanisme de résistance aux antifongiques azolés

II.4.2 La résistance aux polyènes :

La résistance aux polyènes est extrêmement rare ; cependant, dans les rares cas où elle se produit, elle est médiée par des altérations des enzymes qui réduisent l'affinité de liaison du médicament ou épuisent l'ergostérol de la membrane. Chez *C. albicans*, la sensibilité réduite à l'amphotéricine B peut résulter de mutations dans plusieurs enzymes de biosynthèse de l'ergostérol, notamment ERG2, ERG3, ERG5 et ERG11[26].

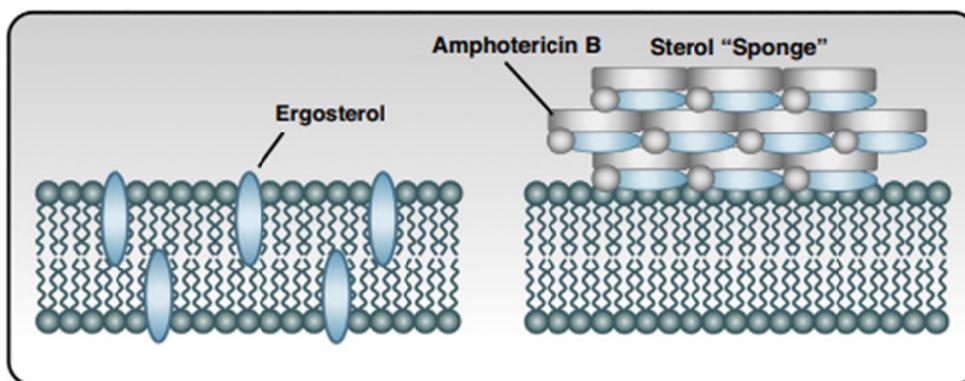


Figure 05. Mécanisme de résistance aux polyènes

II.4.3 La résistance aux échinocandines :

Pour la plupart des espèces de *Candida*, la résistance à l'échinocandine est principalement médiée par des mutations dans les gènes FKS. Chez *C. albicans*, les mutations qui confèrent une résistance à l'échinocandine se produisent dans le gène essentiel FKS1[26].

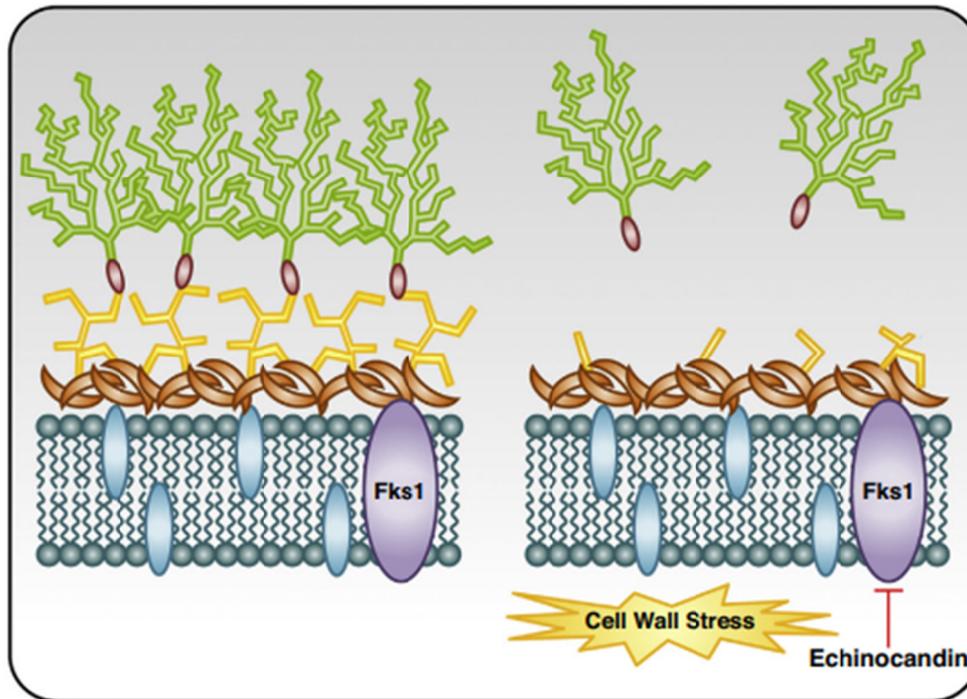


Figure 06. Mécanisme de résistance aux échinocandines

II.5 Le Fluconazole :

II.5.1 Indications :

Ce médicament a été classé comme un composé de classe I selon le système de classification biopharmaceutique (BCS)[28], et il est indiqué dans les cas suivants (liste non exhaustive)[29]:

- Balanite candidosique chez l'adulte
- Candidose buccale chez l'adulte
- Candidose cutanéomuqueuse chez l'adulte
- Candidose invasive
- Candidose oesophagienne
- Candidose urinaire chez l'adulte
- Candidose vaginale aiguë chez l'adulte
- Coccidioïdomycose chez l'adulte

II.5.2 Caractères physico-chimiques[30] :**Tableau III.** Caractères physico-chimiques du Fluconazole

Structure chimique	C 16 H 14 F 3 N 5 O
Aspect	Poudre blanche ou presque blanche
Solubilité	Légèrement soluble dans l'eau, soluble dans l'alcool et l'acétone, facilement soluble dans le méthanol et très légèrement soluble dans le toluène
Masse moléculaire	306,27 g/mol
Point de fusion	De 223 à 224 °C
Constante d'ionisation PKA	Mesurée dans 1,1 M NaOH est de 1,76 ± 0,10
Température de stockage	En dessous de 30° C
Perméabilité	BCS classe I : grande perméabilité

II.5.3 Mécanisme d'action :

Le (FLZ) est un agent antifongique bis-triazolé utilisable par voies orale et injectable intraveineuse. Le (FLZ) agit en inhibant la biosynthèse enzymatique de l'ergostérol dans les cellules fongiques par l'inhibition de l'enzyme 14 alpha-stérol déméthylase dépendante du cytochrome P450. Cela conduit à l'accumulation de stérols méthylés qui sont responsables de la rupture de la membrane fongique, ce qui entraîne un arrêt de la croissance[17].

Espèces habituellement sensibles : *Candida* et en particulier *albicans*, *Cryptococcus neoformans*.

Espèces habituellement résistantes : *Candida kruzei*, dermatophytes (*microsporum*, *trichophyton*), *Aspergillus* sp.

II.5.4 Effets indésirables du Fluconazole selon la voie d'administration :**II.5.4.a Voie orale :**

Fréquents (1 à 10 % des cas) : nausées, vomissements, diarrhée, douleurs abdominales, maux de tête, éruption cutanée, augmentation des transaminases.

Peu fréquents (moins 1 % des cas) : constipation, digestion difficile, ballonnement, bouche sèche, vertiges, diminution de l'appétit, anémie, somnolence ou au contraire insomnie,

convulsions, fourmillements, étourdissements, altération du goût, douleurs musculaires, fatigue.

Rares (moins de 0,1 % des cas) : chute de cheveux, tremblements, anomalie de la numération formule sanguine, réaction allergique, éruption cutanée bulleuse grave, troubles du rythme cardiaque, hépatite[31].

II.5.4.b Voie transcutanée :

Les effets secondaires les plus fréquents de l'utilisation de FLUCOZEST 0,5 % GEL sont les suivants : éruption cutanée, irritation, sécheresse ou fissuration de la zone environnante, démangeaisons et sensation de brûlure au site d'application[32].

II.6 Nouveaux systèmes d'administration de médicaments développés pour chaque médicament antifongique :

Tableau IV. Nouveaux systèmes d'administration de médicaments développés pour chaque médicament antifongique

Médicament antifongique	Systèmes d'administration	Voie d'administration	Forme galénique	Références
Fluconazole	Ethosomes	Topique	Gel	[33]
	Liposomes	Intravital	Non précisée	[34]
	Niosomes	Oculaire	Gel	[35]
	Microémulsion	Vaginale	Gel	[36]
Voriconazole	Ethosomes	Topique	Non précisée	[37]
	Transethosomes	Topique	Non précisée	[38]
Econazole	Ethosomes	Topique	Gel	[39]
	Transethosomes	Transdermique	Gel	[40]
Miconazole	Transfersomes	Topique	Gel	[41]
	Liposomes	Topique	Gel	[42]
	Niosomes	Transdermique	Gel	[43]
Ketoconazole	Liposomes	Topique	Non précisée	[44]
	Dendrimères	Topique	Hydrogel	[45]
Clotrimazole	Ethosomes	Topique	Gel	[46]
Itraconazole	Liposomes	Topique	Non précisée	[47]
Amphotericin B	Liposomes	Intraveineuse	Non précisée	[48]
Terbinafine	Liposomes	Topique	Gel	[49]
Nystatin	Liposomes	Intraveineuse	Non précisée	[50]

**Chapitre III : Les systèmes
d'administration de médicaments par
voie transdermique et les éthosomes**

L'utilisation de la nanotechnologie a été largement explorée pour développer des systèmes d'administration efficaces de médicaments vers des applications topiques et transdermiques et par conséquent, des avantages significatifs dans l'administration d'agents thérapeutiques.

Les médicaments à fort potentiel toxique, tels que les médicaments chimio-thérapeutiques contre le cancer, peuvent être administrés avec un meilleur profil de sécurité grâce aux nanotechnologies.

On peut donc considérer que la nanotechnologie est un candidat essentiel qui peut offrir de nouvelles opportunités dans le domaine de la biologie et de la médecine. Divers matériaux à l'échelle nanométrique sont inventés et présentent plusieurs avantages cliniques. De ce fait, la nanomédecine est en train de devenir une référence dans le domaine des sciences de la santé.

La nanomédecine démontre que les médicaments peuvent être manipulés à l'échelle du nanomètre pour modifier leurs propriétés de base et leur bioactivité afin d'être utilisés dans des traitements non invasifs. La solubilité, la libération contrôlée et la délivrance ciblée sont les caractéristiques les plus importantes que la nanotechnologie peut manipuler dans les systèmes de délivrance de médicaments [1, 51, 52].

III.1 Les systèmes d'administration de médicaments par voie transdermique (TDDS) :

La peau est devenue une voie d'administration de médicaments importante au cours des dernières décennies, non seulement pour traiter ou soulager les maladies cutanées, mais aussi pour obtenir des effets systémiques. Cependant, la barrière naturelle imposée par la peau principalement la couche cornée représente un défi majeur. Bien que différents agents de pénétration chimiques et physiques aient été proposés pour contourner la barrière cutanée, l'inclusion de substances actives dans des nanoporteurs a fait l'objet d'une attention considérable, étant donné les avantages que présentent ces systèmes, en particulier ceux composés de lipides. La biocompatibilité et la biodégradabilité font partie des propriétés attrayantes de ces matériaux[1].

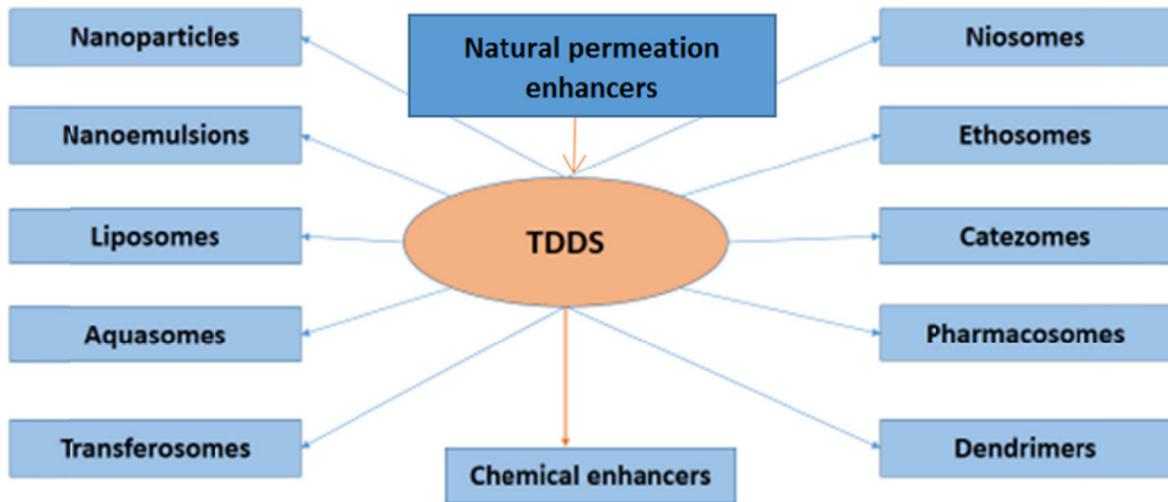


Figure 07. Principaux types de nanopORTEURS utilisés pour l'administration de médicaments par voie transdermique[51]

III.2 Définition et structure des éthosomes :

III.2.1 Définition :

Les éthosomes constituent la deuxième génération de nouveaux systèmes vésiculaires, conçus pour améliorer l'administration de médicaments. Ils ont été décrits pour la première fois en 2000 par Toutou et al. Ils contiennent une forte teneur en éthanol (de 20 à 45 %) ainsi que des phospholipides de nature très élastique. L'éthanol agit comme un activateur de pénétration. La présence d'éthanol confère une charge négative aux vésicules et réduit également leur taille. Grâce à cette approche, la fluidité des lipides et la perméabilité de la membrane cellulaire ont été augmentées en interagissant avec la tête polaire des molécules lipidiques, ce qui a pour effet d'abaisser le point de fusion des lipides présents dans la couche cornée. Cela permet de fluidifier les lipides dans la vésicule élastique ainsi que ceux présents dans la peau[53].

III.2.2 Structure des éthosomes :

Ils sont composés principalement de phospholipides, d'une forte concentration d'éthanol et d'eau. La forte concentration d'éthanol rend les éthosomes uniques. Typiquement, les éthosomes peuvent contenir des phospholipides avec diverses structures chimiques comme phosphatidylcholine (PC), acide phosphatidique (PA), phosphatidylsérine (PS), alcool (éthanol ou alcool isopropylique), eau et propylène glycol (ou autres glycols). Une telle composition permet de fournir une forte concentration d'ingrédients actifs à travers la peau. L'administration de médicaments peut être modulée en modifiant l'alcool : eau ou alcool-polyol : rapport eau. Certains phospholipides préférés sont les phospholipides de soja tels que

Phospholipon 90 (PL90). Il est généralement utilisé dans une gamme de 0,5-10%. Cholestérol à des concentrations allant de 0,1-1% peut également être ajouté à la préparation. Des exemples d'alcools, qui peuvent être utilisés, comprennent l'éthanol et l'alcool isopropylique. Parmi les glycols, le propylène glycol est généralement utilisé. En outre, les tensioactifs non ioniques (PEG-alkyl ethers) peuvent être combinés avec les phospholipides dans ces préparations[54].

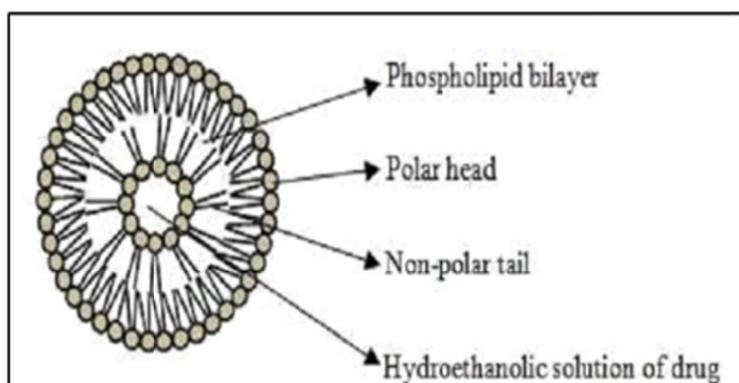


Figure 08. Structure de base des éthosomes[55]

III.3 Applications :

III.3.1 Système éthosomique antifongique :

Le développement d'approches alternatives pour le traitement transdermique des infections fongiques de la peau englobe de nouveaux systèmes de support pour les composés approuvés et expérimentaux. La diffusion de composés antifongiques dans la peau peut être améliorée à l'aide des nanopORTEURS vésiculaires tels que les éthosomes. Les vésicules lipidiques ont un taux de pénétration et une efficacité plus élevée, ainsi qu'une meilleure biodisponibilité. Les caractéristiques physico-chimiques des nanopORTEURS vésiculaires sont telles que ces substances actives sont transportées plus efficacement à travers la couche cornée vers les couches profondes de la peau[3].

III.3.2 Systèmes éthosomiques anti-inflammatoires :

L'éthosome de glycyrrhizinate d'ammonium (AG) a été testé par Paolino et ses collègues pour le traitement des maladies cutanées sur des volontaires humains avec un érythème induit chimiquement par le méthyl-nicotinate. L'effet anti-inflammatoire du système (AG) éthosomal après prétraitement ou traitement des érythèmes cutanés par rapport aux solutions médicamenteuses aqueuses ou hydroéthanoliques et évalué par un spectrophotomètre visible de réflectance pour la quantification de l'indice d'érythème. Les résultats ont montré que les

éthosomes AG induisaient une réduction significative de l'intensité et de la durée de l'érythème par rapport aux autres formulations[54].

III.3.3 Système éthosomal antiviral :

Agent antiviral agissant sur le virus de l'immunodéficience acquise. Les éthosomes pourraient augmenter le flux transdermique, prolonger la libération, par ex. Zidovudine.

III.3.4 Système éthosomal antibactérien :

Les éthosomes pénètrent rapidement à travers l'épiderme et apportent une quantité appréciable de médicaments dans la couche profonde de la peau et supprimer l'infection à leurs racines. Des formulations contenant de la bacitracine et de l'érythromycine pour l'administration cutanée et intracellulaire ont été mises au point et les études ont indiqué que les éthosomes pénétraient dans la membrane cellulaire et libéraient les molécules médicamenteuses piégées dans les cellules[55].

III.3.5 Systèmes éthosomiques analgésiques et antipyrétiques

Une étude récente a démontré les effets antalgiques et thérapeutiques in vivo de l'ibuprofène éthosomal transdermique chez deux types d'animaux, L'application de gel d'ibuprofène sur la peau animale a entraîné une diminution progressive de la température corporelle des rats fiévreux, L'effet analgésique du gel d'ibuprofène éthosomal a été comparé au traitement oral et un effet statistiquement plus important a été obtenu pour le système d'ibuprofène éthosomal 120 et 360 min après l'administration et la durée de l'effet était d'au moins 6 h[54].

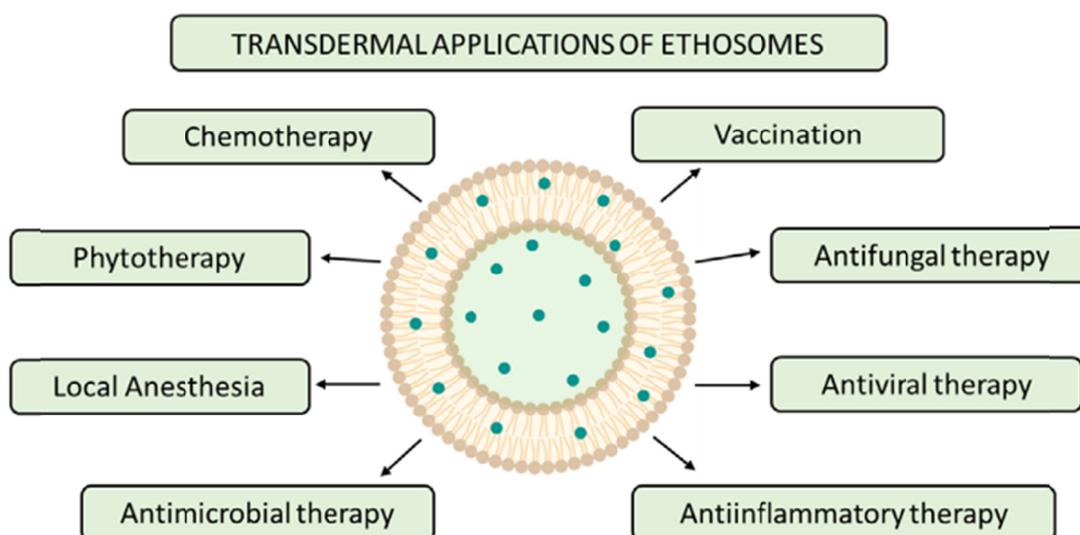


Figure 09. Les différentes applications des éthosomes par la voie transdermiques [56]

III.4 Avantages et inconvénients des éthosomes :**Tableau V.** Avantages et inconvénients des éthosomes

AVANTAGES [13, 53, 55, 57, 58]	INCONVENIENTS
Éviter la dégradation du PA lors du premier passage hépatique	Rendement très faible et donc peu rentable
Agit comme un substitut à la voie orale.	Les médicaments éthosomals ne peuvent pas atteindre des concentrations élevées de médicaments dans le sang
Permet l'utilisation de médicaments ayant une demi-vie biologique courte ou une fenêtre thérapeutique étroite	Une irritation de la peau ou une dermatite peut survenir chez certains patients en raison de l'activateur de perméation ou des excipients utilisés
Éviter les fluctuations des concentrations de médicaments	La taille moléculaire du médicament devrait être raisonnable afin de permettre l'absorption percutanée
Amélioration de la pénétration du médicament et de l'effet systémique	Les médicaments qui exigent un taux sanguin élevé ne peuvent pas être administrés – limités aux seuls médicaments puissants (dose quotidienne de 10 mg ou moins)
Eviter les variations inter et intra individuelles	Une solubilité adéquate du médicament dans les milieux lipophiles et hydrophiles est nécessaire pour atteindre la microcirculation cutanée et accéder à la circulation systémique.
L'arrêt thérapeutique est facile et peut se faire à tout moment.	Le système d'administration de médicaments éthosomals est limité aux médicaments puissants et non aux médicaments qui nécessitent des taux sanguins élevés
L'administration de grosses molécules (peptides, molécules protéiques) est possible.	Peut provoquer une réaction allergique.
Augmentation de l'efficacité et de l'index thérapeutique	
Réduction de la toxicité de l'agent encapsulé	
non-invasivité : le médicament éthosomal est administré sous forme semi-solide (gel ou crème), et présente donc un taux d'observance élevé pour le patient.	
Les éthosomes améliorent la perméation du médicament à travers la peau pour l'administration transdermique et dermique.	
Agir comme un réservoir de médicaments	
Les médicaments hydrophobes et	

hydrophiles peuvent être incorporés.

Sont composés de matériaux biodégradables
et biocompatibles

III.5 Les différents types d'éthosomes :

III.5.1 Les éthosomes classiques :

Introduits pour la première fois par Toubou et al. (2000)[59], les éthosomes classiques sont une modification de la formulation liposomale classique et, dans l'ensemble, sont composés de phospholipides, d'une concentration relativement élevée d'éthanol et d'eau. Ces nanoporteurs de vésicule ont démontré une amélioration de l'administration de médicaments en raison de leur taille réduite des particules, potentiel zêta négatif, efficacité de piégeage plus élevée et stabilité améliorée, par rapport aux liposomes classiques. Cependant, dans la poursuite d'un système de perméation cutanée plus efficace, une nouvelle génération d'éthosomes a été développée, à savoir des éthosomes binaires et des transethosomes[1].

III.5.2 Les éthosomes binaires :

En 2010, Zhou et al. ont ajouté un autre type d'alcool aux éthosomes classiques et ont ainsi présenté des éthosomes binaires. En plus de l'éthanol, les éthosomes binaires comprennent dans leur formulation un autre alcool, communément le propylène glycol (PG) et l'alcool isopropylique. Le PG est un activateur de pénétration bien connu et offre une faible toxicité, une irritation cutanée réduite, une viscosité et une hygroscopicité plus élevées par rapport à l'éthanol, ainsi qu'une stabilité. Ceci améliore l'affinité de médicament à la couche de derme et augmente la conservation de médicament dans les couches profondes de la peau.

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 de piégeage plus élevée et amélioration de la stabilité et minimisation de l'agrégation[1].

III.5.3 Les transethosomes :

Une nouvelle génération d'éthosomes a été décrite par Song et al. (2012), dans le but de combiner les avantages des liposomes déformables et des éthosomes.

Les transethosomes partagent la même composition d'éthosomes, contenant en plus un activateur de pénétration ou un activateur de bord (tensioactif). Des études antérieures ont fait état de résultats améliorés par rapport aux éthosomes classiques). Les transethosomes ont montré une plus petite taille, une élasticité et une déformabilité supérieures, et une perméation cutanée améliorée, probablement en raison d'un effet synergique entre l'éthanol et le tensioactif, qui favorise un réarrangement dans la bicouche lipidique de ces vésicules[1].

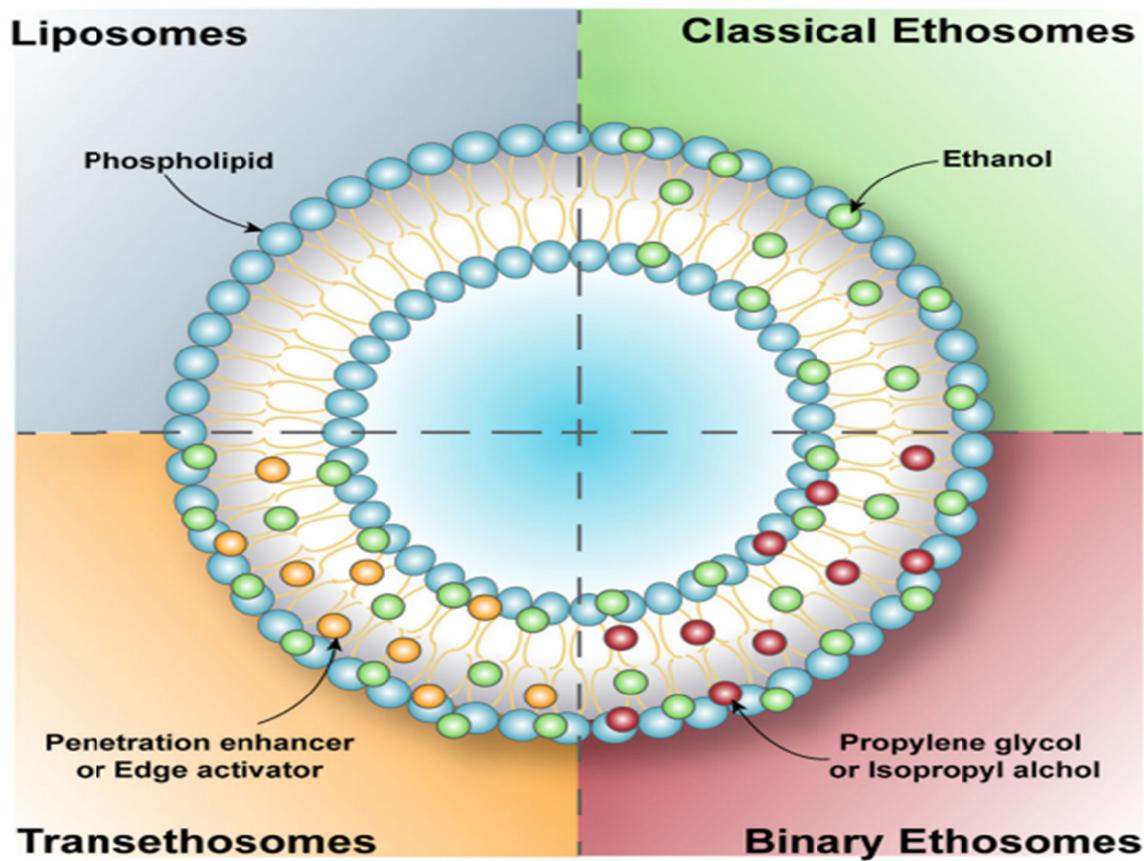


Figure 10. Représentation structurelle des liposomes et différents types d'éthosomes[1]

III.6 Mécanisme de pénétration :

Le principal avantage des éthosomes est la pénétration améliorée des principes actifs à travers la peau. Le mécanisme d'absorption des médicaments encapsulés dans les systèmes éthosomals reste encore peu clair. Le processus d'absorption est supposé se produire grâce à deux effets combinés, l'effet de l'éthanol suivi de l'effet des éthosomes[60]:

III.6.1 Effet de l'éthanol :

L'éthanol améliore la pénétration dans la peau, son mécanisme d'action est largement connu. L'éthanol pénètre à travers les lipides intercellulaires, augmentant la fluidité des lipides de la membrane cellulaire et diminuant la densité de la multicouche lipidique permettant une pénétration en profondeur des nanostructures[56, 61].

III.6.2 Effet des éthosomes :

L'augmentation de la fluidité lipidique de la membrane cellulaire causée par l'éthanol entraîne une meilleure perméabilité à travers la peau. Ainsi, les éthosomes pénètrent très facilement à l'intérieur des couches profondes de la peau, où ils vont fusionner avec les

lipides cellulaires et libérer les principes actifs dans les couches les plus profondes de la peau[55].

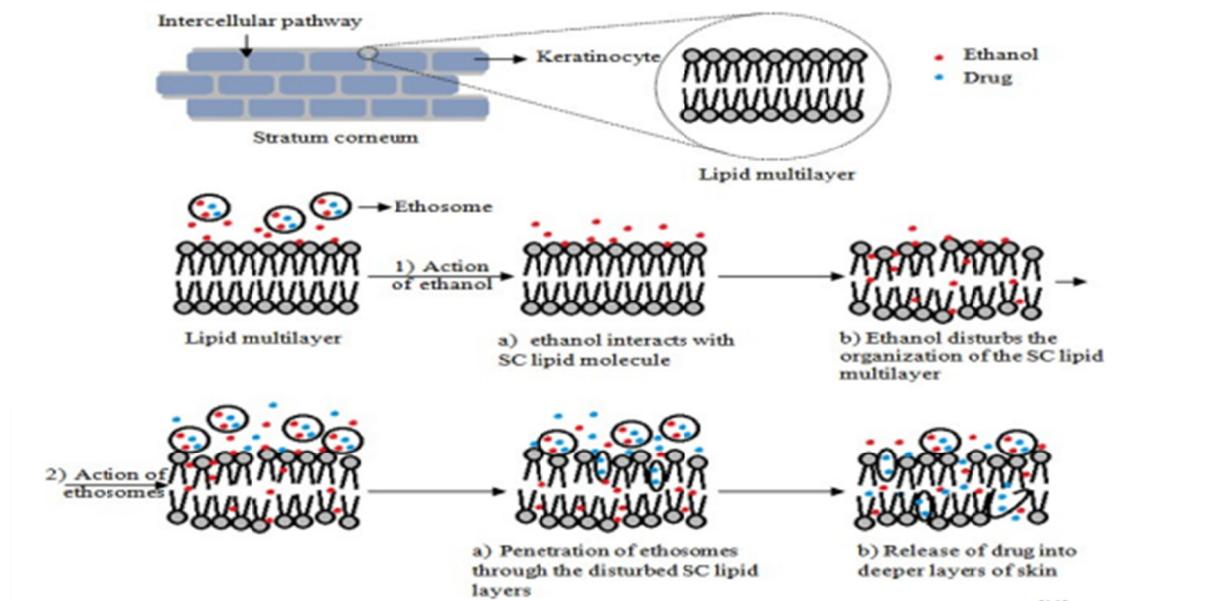


Figure 11. Mécanisme de pénétration des éthosomes[55]

III.7 Méthodes de formulation des éthosomes :

Il existe plusieurs méthodes de préparation des éthosomes, qui peuvent varier en fonction des conditions et des exigences spécifiques. Leur production est relativement simple et rentable, ce qui en fait une alternative appropriée par rapport à d'autres systèmes d'administration de médicaments[62].

III.7.1 La méthode classique à froid :

Il s'agit de la méthode la plus simple et la plus utilisée pour la préparation des systèmes éthosomaux, et si nécessaire, Elle a été introduite par Touitou en 1996 et implique la préparation de la phase organique et de la phase aqueuse séparément. La phase organique est obtenue par dissolution des phospholipides (en plus des tensioactifs ou de l'activateur de pénétration pour les transéthosomes) dans de l'éthanol ou un mélange de solvants (éthanol/PG) pour la préparation des éthosomes binaires. La phase aqueuse utilisée est soit de l'eau, une solution tampon ou une solution saline normale. La phase aqueuse est ajoutée à la phase organique en un flux fin, goutte à goutte, ou à l'aide d'une pompe seringue à un débit constant de 175 ou 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le mélange est agité à une vitesse de 700rpm à l'aide d'un agitateur magnétique. Le mélange est effectué pendant 5 à 30 minutes pour obtenir la suspension éthosomale requise. Le principe actif à incorporer dans le système éthosomal sera dissous soit dans la phase aqueuse, soit dans la phase organique, en fonction de ses propriétés

physicochimiques. La figure 3 présente les étapes de préparation d'un système éthosomal en utilisant la méthode classique à froid[63].

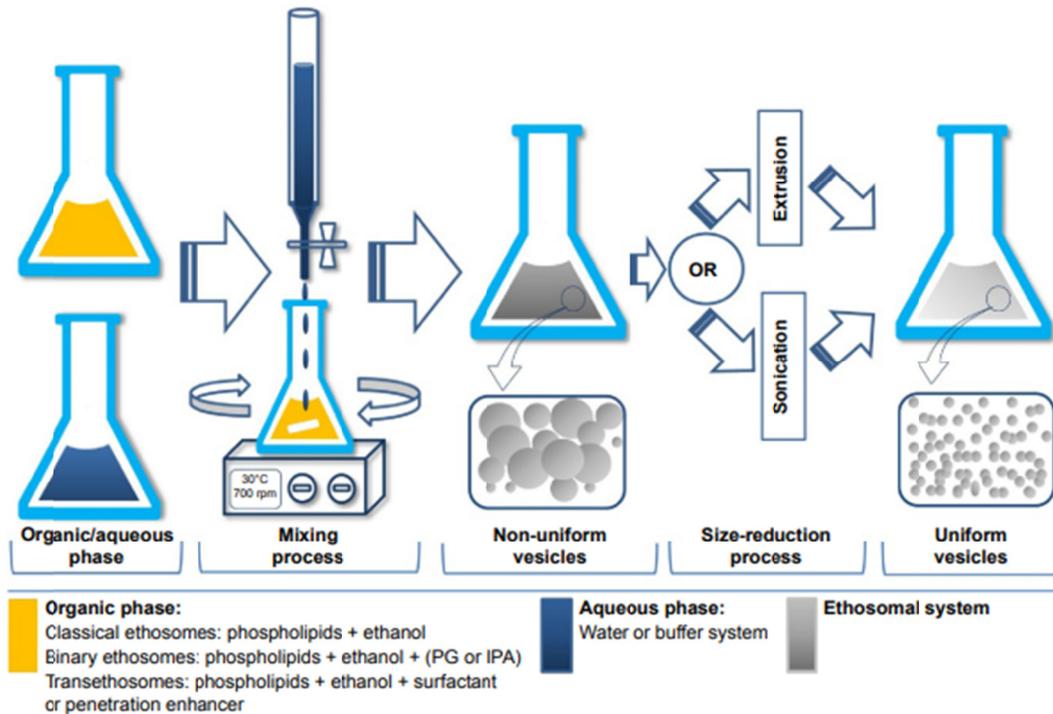


Figure 12. Schéma représentatif de la méthode classique à froid pour la préparation des systèmes éthosomaux[63]

III.7.2 La méthode à chaud :

Cette méthode a été décrite pour la première fois par l'inventeur des éthosomes en 1996. Dans un récipient, le phospholipide est dispersé dans l'eau puis placé dans un bain-marie à 40°C jusqu'à l'obtention d'une suspension colloïdale. Dans un autre récipient, l'éthanol est chauffé à 40°C puis ajouté goutte à goutte à la dispersion de phospholipides sous un mélange continu à l'aide d'un agitateur mécanique ou magnétique. Le principe actif est dissous dans la phase organique ou aqueuse, en fonction de ses propriétés hydrophiles/hydrophobes[63].

III.8 Contrôle des éthosomes :

III.8.1 Mesure de la taille des vésicules :

La taille des vésicules a été déterminée par la méthode de diffusion dynamique de la lumière (DLS), en utilisant un système d'inspection informatisé (MalvernZetasizer Nano-ZS, Malvern, U.K.) avec le logiciel DTS® (Nano). Pour la mesure de la taille des vésicules, la suspension vésiculaire a été diluée avec de l'eau distillée et placée dans les cuves du zetasizer. Les mesures ont ensuite été effectuées à 25°C. Les mesures DLS ont été effectuées en alternant des cycles de température croissante et décroissante à chaque température. L'échantillon a été

équilibré pendant au moins 3 minutes avant d'effectuer la mesure. Le diamètre hydrodynamique moyen des éthosomes considérés correspond à la valeur moyenne Z mesurée par DLS. Les données ont donc été collectées pour la taille et la distribution des vésicules[33].

III.8.2 Mesure du potentiel zêta :

Le potentiel zêta (PZ) est la mesure de l'ampleur de la répulsion ou de l'attraction électrostatique ou de charge entre les particules et est connu pour affecter la stabilité. Sa mesure permet de mieux comprendre les causes de la dispersion, de l'agrégation ou de la floculation, et peut être utilisée pour améliorer la formulation des éthosomes. Presque tous les matériaux particuliers ou macroscopiques en contact avec un liquide acquièrent une charge électronique à leur surface. En général, les particules peuvent être dispersées de manière stable lorsque la valeur absolue du potentiel zêta est supérieur à 30 mV. En outre, le potentiel zêta inférieur à 20 mV est d'une stabilité limitée et celui inférieur à 5mV montre une agrégation rapide. Cependant, plusieurs études ont rapporté que les potentiels zêta des formulations d'éthosome se situaient entre -10 et -20 mV. Le potentiel zêta de la formulation éthosomale a été déterminé à l'aide d'un Zeta Sizer (Nano-ZS, Malvern, U.K.) à 25°C[33].

III.8.3 Efficacité du piégeage des médicaments (EE%):

Le pourcentage d'encapsulation représente la capacité des éthosomes à piéger efficacement les principes actifs lipophiles et hydrophiles, cela peut s'expliquer par le degré élevé de lamellarité et la présence d'éthanol dans les vésicules. En outre, les formulations éthosomales possèdent une plus grande capacité de piégeage en comparaison avec les liposomes[64].

Le (EE%) des éthosomes dépend de la taille de la vésicule, des phospholipides utilisés, du rapport des composants de la bicouche lipidique, du pH et de la force ionique du milieu. Elle est mesurée en séparant le médicament libre des vésicules à l'aide de techniques telles que la dialyse, l'ultrafiltration, l'ultracentrifugation, la chromatographie sur gel et la centrifugation sur mini-colonne. L'analyse de l'efficacité du piégeage effectuée par ultracentrifugation est moins spécifique, sensible et sélective que les autres techniques. La faible sélectivité et sensibilité est attribuée à la déformation des vésicules pendant l'ultracentrifugation[53].

Elle peut être calculée par la formule suivante[3] :

$$(EE\%) = \frac{\text{quantité totale du FLZ} - \text{quantité non encapsulée du FLZ}}{\text{quantité totale du FLZ}} \times 100$$

III.8.4 Mesure du taux de chargement (TC%) :

Le taux de chargement correspond à la masse de la substance active encapsulée par rapport à la masse de nanoparticules :

$$(TC\%) = \frac{\text{quantité totale du FLZ} - \text{quantité non encapsulée du FLZ}}{\text{masse des nanoparticules}} \times 100$$

III.8.5 Forme des vésicules et morphologie de la surface :

Les vésicules d'éthosome ont été visualisées par microscopie électronique à transmission (microscope électronique TEM Philips Technai, Pays-Bas). Une goutte de solution éthosomique a été séchée sur une grille microscopique enduite de carbone, pour être adsorbée et le surplus a été éliminé par du papier filtre. Une goutte de solution aqueuse à 1 % d'acide phosphotungstique (PTA) a ensuite été ajoutée et laissée en contact avec l'échantillon pendant 5 minutes. La solution excédentaire a été éliminée et l'échantillon a été séché à l'état de pièce avant que les vésicules aient été vues sous TEM fonctionnant à une tension d'accélération de 200 KV[33].

Partie expérimentale

Problématique :

La principale exigence du traitement antifongique dermique est la bonne pénétration des médicaments dans les différentes couches de la peau afin de garantir des concentrations efficaces du principe actif. Les formes d'administration topique conventionnelles présentent certains inconvénients importants, notamment une pénétration médiocre du médicament, ce qui se traduit par une efficacité moindre, une hypersensibilité liée au médicament et des profils de toxicité élevés. Récemment, de nombreux systèmes d'administration nanovésiculaires ont été mis au point et utilisés avec succès dans le traitement des infections fongiques, parmi lesquelles, on retrouve les éthosomes, plus précisément les éthosomes binaires, qui représentent une modification de la formulation liposomale classique et qui ont démontré leur capacité à minimiser les inconvénients potentiels des médicaments antifongiques grâce à leurs caractéristiques uniques telles que leur taille réduite, leur élasticité, l'amélioration de la pénétration à travers les couches profondes de la peau, ainsi que la réduction du risque d'effets secondaires systémiques. Dans notre étude, nous avons évalué ces nouveaux systèmes d'administration chargés de Fluconazole utilisés pour la lutte contre les infections à *Candida albicans*.

Objectifs de l'étude :

Notre étude a un objectif principal et un objectif secondaire :

- Objectif principal : étude de l'influence des paramètres de formulation et de procédés sur les caractéristiques d'un nanomédicament à activité antifongique.
- Objectif secondaire : évaluation de l'activité antifongique des formulations éthosomales préparées.

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV.1 Matériel :

Tableau VI. Matériel utilisé dans la partie expérimentale

Matériel	Références
Balance analytique	Ohaus PR series
Balance analytique de précision	Ohaus
Plaque chauffante agitatrice magnétique	Yellow line MSH basic
Autoclave vertical automatique	Ray
Four pasteur	
Bec Benzen	
Anse de platine /écouvillons stériles	
Micropipette + embouts bleus et jaunes	ACCUMAX PRO
Etuve bactériologique / Incubateur Vol. 53 litres	Mod. INB400 Memmert®
Bain marie	Memmert®
Boîtes de petri	
Vortex	ISOLAB
Colorimètre de laboratoire	WPA C07500
Lecteur de microplaques à 96 puits	BioTek ELx808
Spectrophotomètre	Optizen
Centrifugeuse réfrigérante	Sigma 2-16K
Bain sonicateur	Haver USC
Zêta sizer nanoseries	Zêta sizer Nano ZS90
Verrerie : éprouvette 1000ml, erlen meyer 2000ml, tubes en verre stériles, tubes à vis, tubes à hémolyse, flacons en verre, tubes Eppendorf, entonnoir, portoir, béciers, cuves en quartz et en verre, spatules, verre à montre, micro filtre à 45µm, barreaux magnetiques.	

- **Matières premières :**

Milieus utilisés :

- SD (Sabouraud dextrose)
- SDA (Sabouraud dextrose agar)
- BHIB (brain heart infusion)

Principe actif :

- Le fluconazole (FLZ) a été offert en tant qu'échantillon de la part du Laboratoire MERINAL d'Alger ;

Excipients :

- Eau distillée stérilisée /Eau distillée
- DMSO (dimethyl sulfoxide)
- La lécithine de soja a été achetée de chez AROMAZONE
- L'éthanol absolu a été obtenu du laboratoire de pharmacie galénique

Agents fongiques :

Trois souches de *Candida albicans* (une identifiée du CHU Tlemcen service de parasitologie et ATCC : ATCC 26 ; ATCC 10 10).



Figure 13. Lécithine de soja et Fluconazole pour la préparation des éthosomes

IV.2 Méthodes :

IV.2.1 Formulation des éthosomes à blanc :

- **Protocole de formulation :**

Neuf formulations d'éthosomes classiques à blanc ont été préparées en utilisant la méthode à froid. Une quantité précise de lécithine de soja (2-5%,) a été prélevée dans un Erlen Meyer recouvert avec du parafilm et dissoute dans de l'éthanol (20-50%,) sous agitation continue à l'aide d'un agitateur magnétique à une vitesse de 700 tours par minute et à 30°C pendant 10 minutes. Un volume précis d'eau distillée chauffée à 30°C (QSP 100%) a été ajouté goutte à goutte tout en agitant pendant 15 minutes pour préparer la dispersion colloïdale d'éthosomes. L'agitation de la dispersion éthosomale préparée s'est poursuivie pendant 5 minutes à température ambiante. Toutes les formulations préparées ont été soumises à trois temps de sonication différents à savoir : 15 minutes, 22,5 minutes et 30 minutes[65, 66] en utilisant le bain sonicateur. La composition des formulations éthosomales à blanc est présentée dans le **Tableau VII.**



Figure 14. Les étapes de formulation des éthosomes par la méthode à froid

Tableau VII. Composition des formulations éthosomales à blanc

Formulation	Masse de la lécithine de soja	Volume de l'éthanol	Eau
F1	2%	20%	QSP 100%
F2	2%	35%	
F3	2%	50%	
F4	3,5%	20%	
F5	3,5%	35%	
F6	3,5%	50%	
F7	5%	20%	
F8	5%	35%	
F9	5%	50%	

IV.2.2 Formulation des éthosomes binaires :

A partir des formulations à blanc, les 3 formulations les plus stables (F1, F2, F8) ont été choisies pour formuler les éthosomes binaires.

- **Protocole de formulation :**

Neuf formulations éthosomales binaires à base de Fluconazole ont été préparées en utilisant la méthode à froid. La composition des formulations est représentée dans le **Tableau VIII**. Une quantité précise de lécithine de soja (2-5%) a été prélevée dans un Erlen Meyer recouvert avec du parafilm et dissoute dans un mélange d'éthanol et d'alcool isopropylique (20-50%), de Fluconazole (0,5%) et de cholestérol (1%) sous agitation continue à l'aide d'un agitateur magnétique à une vitesse de 700 tours par minute et à 30°C pendant 5 minutes, après (20%) de Propylène glycol a été ajouté à la fois, l'agitation s'est poursuivie pendant 5 minutes. Un volume précis d'eau distillée chauffée à 30°C (QSP 100%) a été ajouté goutte à goutte tout en agitant pendant 15 minutes pour préparer la dispersion colloïdale d'éthosomes. L'agitation de la dispersion éthosomale préparée s'est poursuivie pendant 5 minutes à température ambiante. Toutes les formulations préparées ont été soumises à la sonication dans un bain ultrasons pendant 22,5 minutes[66].

Tableau VIII. Composition des formulations éthosomales binaires

Formulations	Masse de la lécithine de soja	Volume du mélange alcoolique		Fluconazole	Cholestérol	Propylène glycol	Eau
		Ethanol	Alcool isopropylique				
F1	2%	15%	5%	0,5%	1%	20%	QSP 100 %
F2	2%	12,5%	7,5%	0,5%	1%	20%	
F3	2%	10%	10%	0,5%	1%	20%	
F4	2%	30%	5%	0,5%	1%	20%	
F5	2%	27,5%	7,5%	0,5%	1%	20%	
F6	2%	25%	10%	0,5%	1%	20%	
F7	5%	30%	5%	0,5%	1%	20%	
F8	5%	27,5%	7,5%	0,5%	1%	20%	
F9	5%	25%	10%	0,5%	1%	20%	

IV.2.3 Détermination de la taille des particules et du potentiel zêta des éthosomes binaires :

La détermination de la taille des particules éthosomales et du potentiel zêta s'est effectuée à l'aide de l'appareil Zêta Sizer nanoséries, Le zetasizer nano ZS (Malvern Instruments) permet d'étudier la taille, le potentiel zêta et la stabilité de particules en solution. La taille des particules est mesurée dans une gamme allant de 0.6 nm à 6 µm par diffusion dynamique de la lumière en se basant sur le mouvement Brownien des particules. L'analyse est basée sur la vitesse de déplacement des particules qui dépend de leur taille. Le potentiel zêta

correspondant à la charge de surface des particules est mesuré par la combinaison des techniques de vélocité Doppler et d'électrophorèse. La vitesse de déplacement des particules est analysée dans un liquide sous un champ électrique[67].



Figure 15. Zeta sizer nanoseries

IV.2.4 Détermination du pourcentage d'encapsulation du Fluconazole (EE%) dans les éthosomes binaires :

- **Préparation de la solution mère de Fluconazole :**

50(μg) de (FLZ) a été dissoute dans 50(ml) de méthanol, une série de dilutions au 1/10^{ème} a été effectuée dans le but de déterminer la longueur d'onde maximale d'absorption du (FLZ) par un balayage entre 200-400nm. La longueur d'onde maximale obtenue est de 250nm. Les absorbances des dilutions préparées de (FLZ) ont été mesurées et mentionnées dans le **Tableau XI** des résultats.

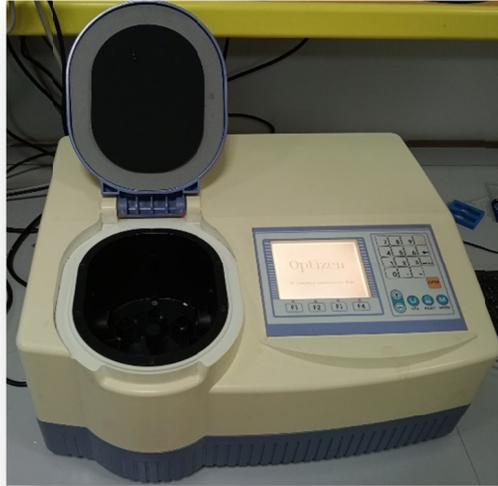


Figure 16. Spectrophotomètre pour la mesure des absorbances des solutions de Fluconazole

- **Détermination de la quantité du Fluconazole non encapsulée :**

Le volume total des suspensions éthosomales binaires a été mesuré. 5 ml de ces formulations ont été dilués avec de l'eau distillée jusqu'à 8 ml et centrifugés à 15 000 tours/minute pendant 45 minutes à 4°C à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérante[33]. Après centrifugation, le surnageant a été récupéré, le volume a été mesuré. La concentration de Fluconazole dans le surnageant a été analysée par méthode spectroscopique UV à 250 nm après avoir effectué une dilution sur l'ensemble des surnageants. Les absorbances obtenues sont mentionnées dans le **Tableau XII** dans la partie des résultats.



Figure 17. Détermination de la quantité du Fluconazole non encapsulée par la méthode de l'ultra centrifugation

IV.2.5 Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI de la solution de Fluconazole par la méthode des microplaques :

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie Appliqué à l'Agro-Alimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de l'Université Abou-Bekr Belkaid-Tlemcen.



Figure 18. Laboratoire LAMAABE

- **Préparation des milieux :**

-Préparation du milieu Sabouraud Dextrose à 15g/500ml.

-Verser les milieux dans des flacons en verre.

-Stérilisation à l'autoclave des 06 flacons en verres contenant les deux milieux et 02 flacons d'eau distillée à 121°C pendant 15min.

-Stérilisation au four pasteur des tubes en verre et des pipettes pasteur.



Figure 19. Etapes de la préparation des milieux de culture

- **Revivification des souches de *Candida albicans* :**

Trois souches de *Candida albicans* ont été utilisées : la souche ATCC 26, la souche ATCC 1010 et une souche isolée d'une onychomycose et identifiée au service de parasitologie du CHU de Tlemcen.

Ajouter un volume du bouillon nutritif BHIB dans les tubes en verre contenant les souches à revivifier, ces derniers ont été mélangés à l'aide d'un vortex puis incubés à 37°C dans une étuve pendant 24H. Cette étape contribue à l'enrichissement et la revivification des souches.



Figure 20. Etapes de la revivification des souches de *Candida albicans*

- **Repiquage des souches fongiques sur milieu solide :**

100µl des différentes souches de *Candida albicans* ont été repiquées sur deux boîtes de Pétri contenant chacune le milieu (SDA) par la méthode d'ensemencement par épuisement de manière à obtenir des colonies isolées, puis incubées à une température de 37°C pendant 48 heures.

- **Lecture des boîtes de Pétri :**

La culture en boîte de Pétri des souches de *Candida albicans* donne des colonies qui sont rondes, de couleur blanche ou crème.

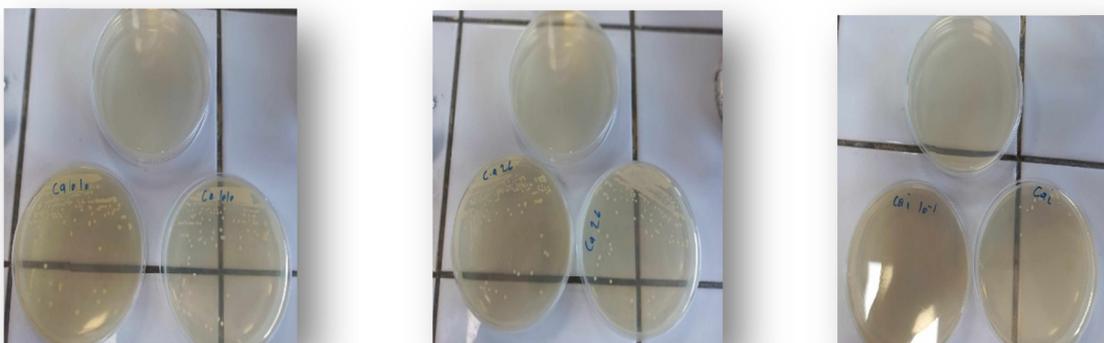


Figure 21. Lecture des boîtes de Pétri de la souche ATCC 26, ATCC1010, Cai en comparaison avec le témoin négatif

- **Préparation de la solution mère de Fluconazole :**

La masse du Fluconazole a été pesée à l'aide d'une balance analytique de précision à quatre chiffres, afin de préparer la solution mère dont la concentration est de 128 $\mu\text{g/ml}$.



Figure 22. Pesée du Fluconazole

- **Préparation de l'inoculum et mesure de la densité optique :**

A partir des boîtes contenant les colonies pures et jeunes, nous avons préparé deux suspensions pour chaque souche, à l'aide d'une anse de platine nous avons prélevé une colonie isolée qui a été déchargé dans un tube contenant 10ml de bouillon Sabouraud déxtrose, puis nous avons mélangé à l'aide d'un vortex et incubé à 30°C dans une étuve pendant 24 heures.



Figure 23. Préparation de l'inoculum

- **Ajustement de la charge fongique :**

Les suspensions ont été homogénéisées et diluées de façon à obtenir un inoculum d'une opacité équivalente au standard McFarland de 0,1 ce qui correspond à 10^8 UFC/ml pour les champignons (D.O de 0,08 à 0,1 lue à 590nm).

La souche ATCC 26 a été diluée avec le milieu Sabouraud dextrose stérile au 1/3e pour passer d'une D.O=0,3 à 0,1.

La souche ATCC1010 a été diluée avec le milieu Sabouraud dextrose stérile pour passer d'une D.O=0,21 à 0,09.

La souche identifiée au service de parasitologie a été diluée avec le milieu Sabouraud dextrose stérile pour passer d'une D.O=0,25 à 0,09.



Figure 24. Ajustement de la densité optique de l'inoculum des différentes souches à l'aide d'un densitomètre

- **Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI par la méthode des microplaques :**

De façon générale la CMI est la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 h. La technique de microdilution dans les microplaques à 96 puits est la méthode choisie pour déterminer la CMI du Fluconazole [1].

Trois microplaques ont été utilisées pour les trois souches de *Candida albicans*, deux lignes ont été réservées aux témoins négatifs, l'une contenant le milieu Sabouraud dextrose stérile et l'autre contenant du DMSO, deux lignes correspondent aux différentes dilutions de la solution de Fluconazole à 128 μ g/ml, 100 μ l des dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024) additionnés de 20 μ l/puit de la suspension de levures, et une dernière ligne

contenant 20 μ l de suspension de levures comme témoin positif. Les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.



Figure 25. Détermination de la CMI sur microplaque de dilution

IV.2.6 Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI de la formulation éthosomale binaire optimale par la méthode des microplaques :

L'activité antifongique du (FLZ) provenant de la formulation éthosomale binaire (Fb1) optimale a été déterminée en utilisant deux souches de *Candida albicans* ATCC 26 et ATCC 1010, en adoptant la méthode de référence pour l'antibiogramme des levures par microdilution en bouillon, proposée par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI - M27-S4)[68]. Deux microplaques ont été utilisées pour les deux souches de *Candida albicans* Ca26 et Ca1010. Deux lignes ont été réservées aux témoins négatifs, la première contenant le milieu Sabouraud dextrose stérile, la 2^{ème} contenant la formulation éthosomale binaire optimale (Fb1) à blanc, deux lignes correspondants aux différentes dilutions de la formulation éthosomale binaire optimale chargée en (FLZ) à (5mg/ml), 100 μ l des dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512) additionnés de 20 μ l/puit de la suspension de levures, puis une dernière ligne contenant 20 μ l de suspension de levures comme témoin positif. Les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1 Résultats :

V.1.1 Mesure de la taille des particules et du potentiel zêta des éthosomes à blanc et binaires :

- **Mesure de la taille des particules et du potentiel zêta des éthosomes à blanc :**

Les résultats de la taille des particules et du potentiel zêta des éthosomes à blanc sont détaillés dans **Tableau IX** ci-dessous :

Tableau IX. Taille des particules et le potentiel zêta des éthosomes à blanc

Temps de sonication (min)	Paramètre mesuré	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
15 min	Taille (nm)	1083	656,5	1747,5	1669	1320	3472	2023	1305	4070
	Potentiel zêta (mV)	-25	-21	-11,5	-41,1	-12,9	-11,8	-11	-10,8	-10,3
22,5 min	Taille (nm)	963,6	577,37	3893	1492,5	1260	2592,5	1678	983,8	1105
	Potentiel zêta (mV)	-35,7	-19,7	-15	-13,4	-14,2	-19,5	-9,9	-39,6	-12,1
30 min	Taille (nm)	735	414,2	5816	889,2	1059	1878	2419	789	978,5
	Potentiel zêta (mV)	-22,5	-9,35	-15,5	-12,4	-15,1	-8,15	-11,5	-9,12	-10

- **Mesure de la taille des particules et du potentiel zêta des éthosomes binaires :**

Les résultats de la taille des particules et du potentiel zêta des éthosomes sont détaillés en **Annexe II**, la moyenne des résultats est présentée dans le **Tableau X** ci-dessous :

Tableau X. Taille des particules et le potentiel zêta des éthosomes binaires

Paramètre mesuré	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Moyenne des tailles (nm)	742,5	1007,6	1111,5	1171	2052,5	2288	1113,6	1219,5	1273
Moyenne du potentiel zêta (mV)	-15	-11,5	-9,91	-18,6	-48,45	-23,1	-10,21	-14,3	-22,5

V.1.2 Résultats de la détermination du pourcentage d'encapsulation du

Fluconazole (EE%) :

Les résultats des absorbances des dilutions de la solution de (FLZ) sont présentés ci-dessous dans le **Tableau XI**:

Tableau XI. Tableau des absorbances des dilutions de Fluconazole

Dilutions	1/10	1/20	1/30	1/40	1/50	1/60	1/70	1/80	1/90	1/100
Absorbances	0,12	0,13	0,14	0,15	0,158	0,17	0,18	0,189	0,2	1,21

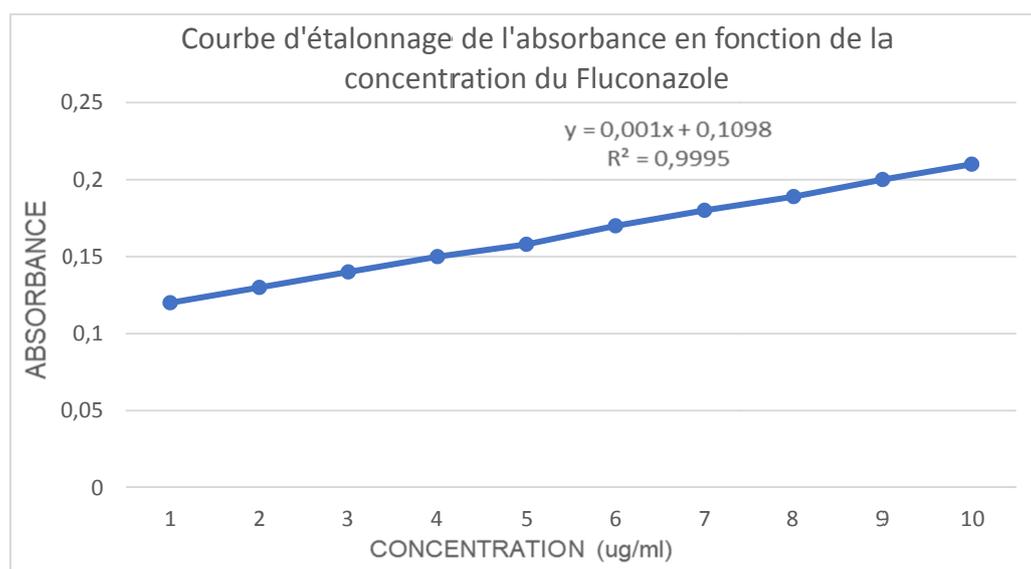


Figure 26. Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration du Fluconazole

- **Résultats de la mesure de l'absorbances des surnageants des formulations binaires :**

Les résultats des absorbances des surnageants des éthosomes binaires sont présentés ci-dessous dans le **Tableau XII** :

Tableau XII. Tableau des absorbances des surnageants des éthosomes binaires

Surnageants binaires (1/29)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Absorbance	0,321	0,284	0,328	0,306	0,543	0,554	0,418	0,531	0,991

Le pourcentage de piégeage du médicament a été calculé à l'aide de l'équation suivante [33]:

$$(EE\%) = \frac{\text{quantité totale du flc} - \text{quantité non encapsulée du flc}}{\text{quantité totale du flc}} \times 100$$

Selon l'équation : $y = 0,001x + 0,1098$ de la courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration du Fluconazole, on détermine les (EE%) de chaque formulation binaire, les résultats sont présentés dans le **Tableau XIII** ci-dessous :

Tableau XIII. Résultats des pourcentages d'encapsulations des éthosomes binaires

Formulations binaires	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
EE%	87,75 %	89,89 %	87,34 %	88,62 %	74,87 %	74,24 %	82,12 %	75,57 %	48,89 %

V.1.3 Résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI de la solution de Fluconazole et de la formulation éthosomale binaire optimale par la méthode des microplaques :

- **Lecture des microplaques :**

Les résultats des microplaques contenant les formulations éthosomales sont présentés dans la **Figure 27** ci-dessous :



Figure 27. Lecteur de microplaques BioTek ELx808

Les résultats des CMI du Fluconazole en solution et encapsulé sont présentés dans le **Tableau XIV** ci-dessous :

Tableau XIV. Résultats des CMI de la solution de (FLZ) et de la formulation éthosomale binaire optimale

	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
Solution de (FLZ) à (128$\mu\text{g/ml}$)	16 ($\mu\text{g/ml}$)
Formulation éthosomale binaire optimale chargée de (FLZ) (5mg/ml)	39,06 ($\mu\text{g/ml}$)

V.2 Discussion :

V.2.1 Influence du temps de sonication sur la taille des particules :

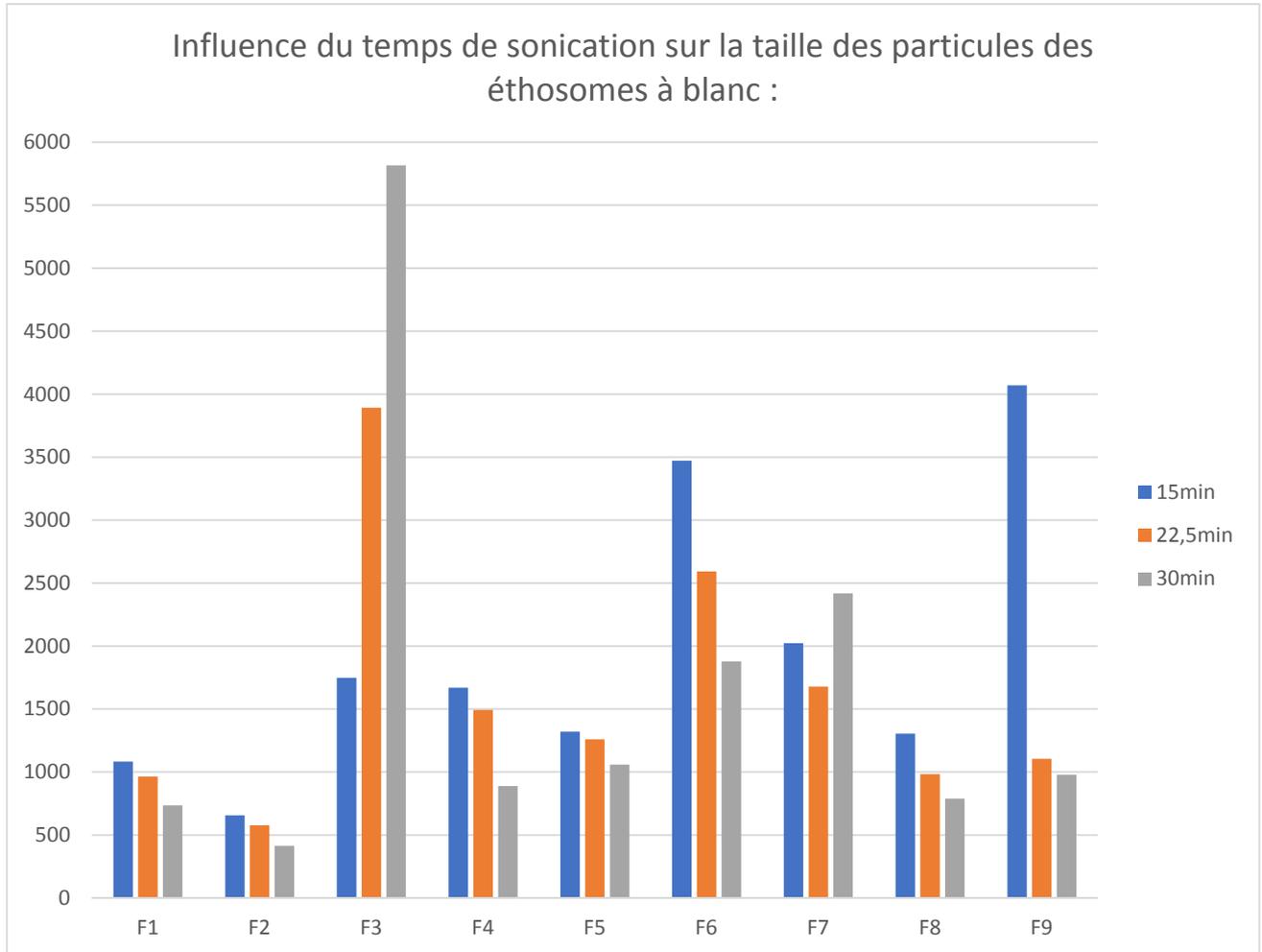


Figure 28. Influence du temps de sonication sur la taille des particules des éthosomes à blanc

L'effet sur la taille des particules a été observé en faisant varier la durée d'application de la sonication (15min, 22,5min, 30min)[69-71] pour étudier l'influence du temps de sonication sur la taille des particules. Il a été observé que l'augmentation du temps de sonication entraîne une réduction de la taille pour la majorité des formulations de 4070 à 656,5 nm après 15min, de 3893 à 577,37 nm après 22,5min et de 5816 à 414,2nm après 30min. Le temps de sonication de 22,5min a eu un impact négatif sur la taille des vésicules. Il a été observé qu'en augmentant le temps de sonication de 15min à 22,5min, la taille des vésicules de la formulation diminuait[72, 73].

On observe une augmentation de la taille des particules après 30min jusqu'à 5816nm ce qui peut être due à une sonication excessive[74]. En se basant sur ces résultats, le temps de sonication optimal retenu pour la suite des formulations est de 22,5min.

V.2.2 Influence de l'éthanol sur la taille des particules et le potentiel zêta:

- **Ethosomes à blanc :**

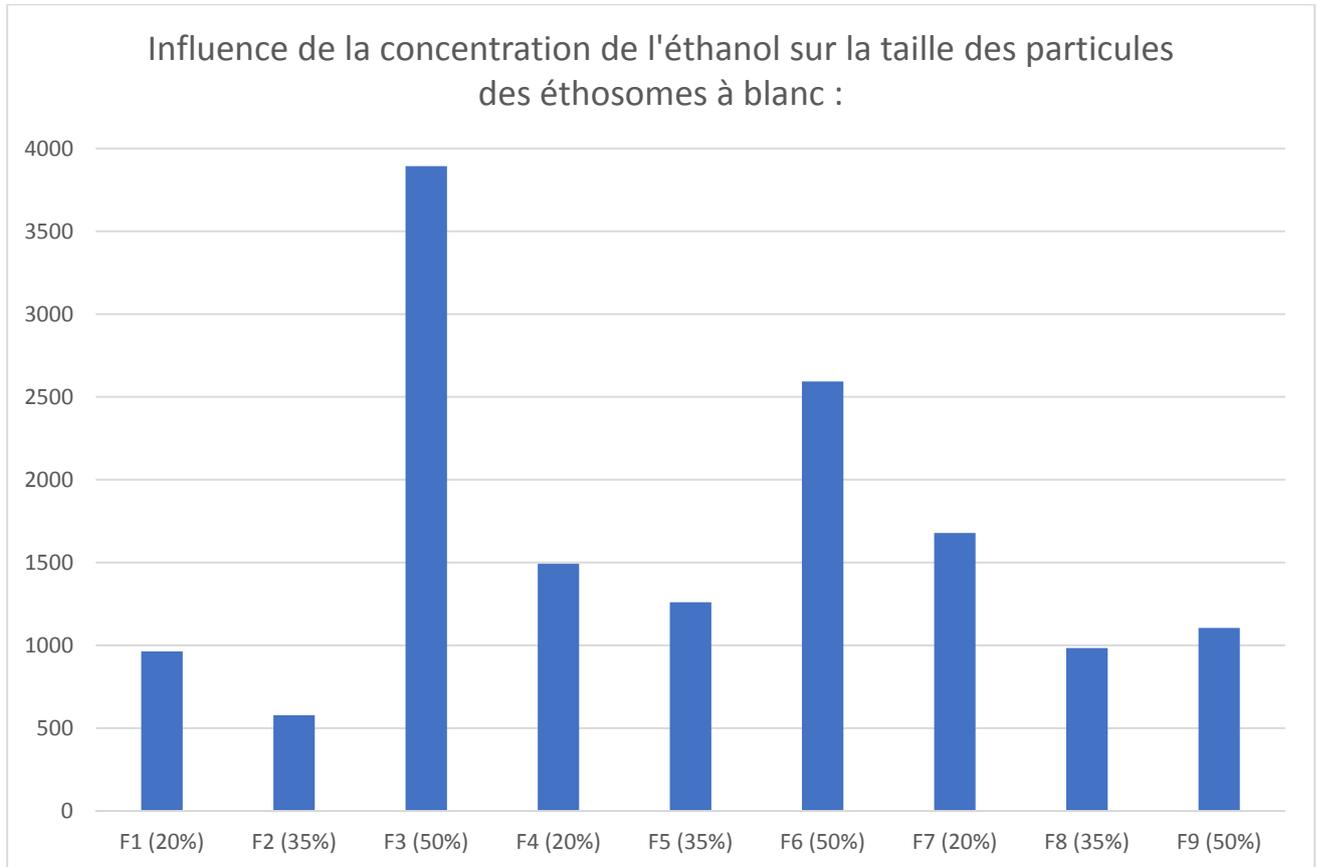


Figure 29. Influence de la concentration de l'éthanol sur la taille des particules des éthosomes à blanc

La taille et la forme des particules sont connues pour affecter la stabilité physique des vésicules et l'absorption cellulaire. La taille des particules des éthosomes à blanc varient de 577,37 à 3893 nm, on a constaté qu'en fixant la concentration de la lécithine de soja à 2% pour (F1,F2), à 3,5% pour (F4,F5) et à 5% pour (F7,F8) tout en augmentant la concentration d'éthanol de 20%, 35% dans chaque formulations, la taille des particules a diminuée, nos résultats sont similaires à ceux « Ehab R. Bendas et Mina I. Tadros » qui dans leur étude montrent que la relation entre la concentration d'éthanol et la taille des particules est inversement proportionnelle[75]. Cependant, lorsqu'on a augmenté la concentration d'éthanol à 50% pour les formulations (F3,F6,F9), nous avons attesté une augmentation notable dans la taille des particules, ces résultats concordent avec ceux de l'auteur « Abdulbaqi et Al » dans son étude qui affirme que l'augmentation de la concentration d'éthanol au-delà du niveau optimal entraînerait une légère augmentation de la taille des vésicules[63].

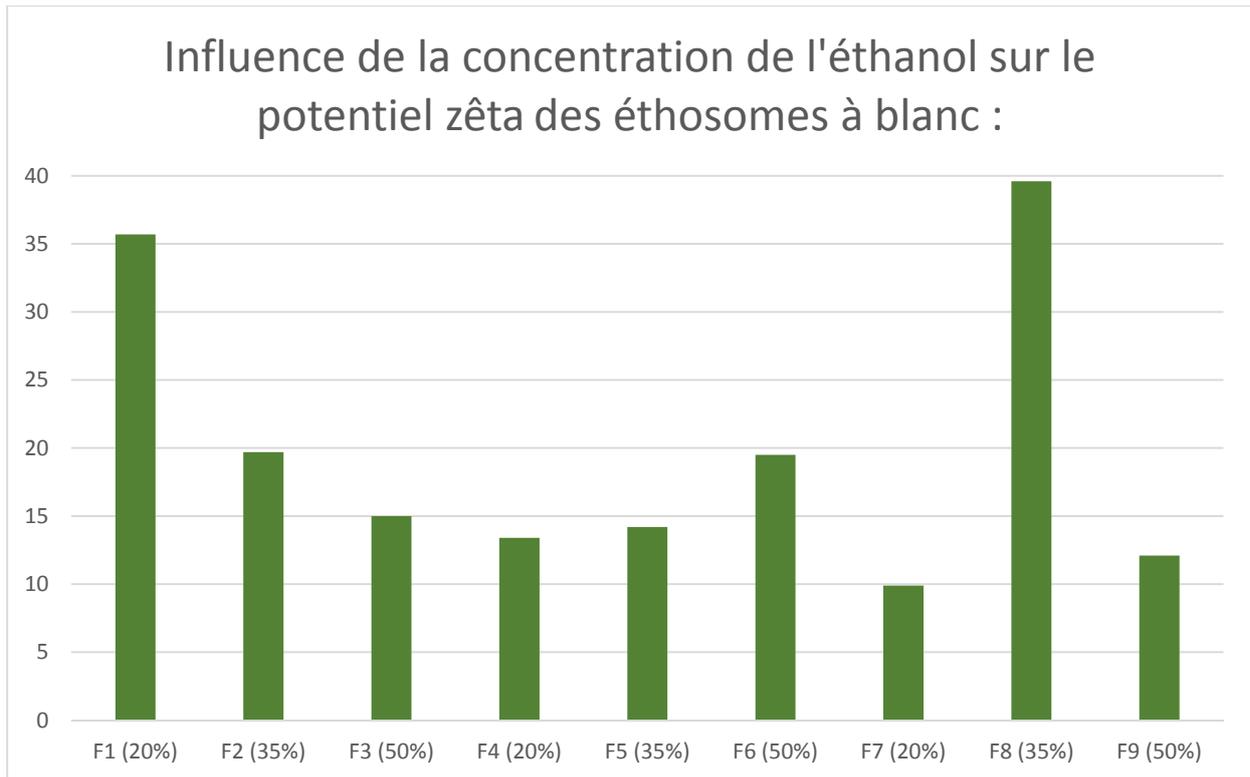


Figure 30. Influence de la concentration de l'éthanol sur le potentiel zêta des éthosomes à blanc

Le potentiel zêta est la mesure de l'ampleur de la répulsion ou de l'attraction électrostatique et est connu pour affecter la stabilité. Sa mesure permet de mieux comprendre les causes de la dispersion, de l'agrégation ou de la floculation, et peut être utilisée pour améliorer la formulation des éthosomes[33]. Les résultats présentés dans l'histogramme montrent que le potentiel zêta des éthosomes à blanc varie de -9,9 mV à -39,6 mV, ce qui laisse prévoir une bonne stabilité des formulations, ce qui concorde avec les études de « Y Zhai et Al »[76].

• **Éthosomes binaires :**

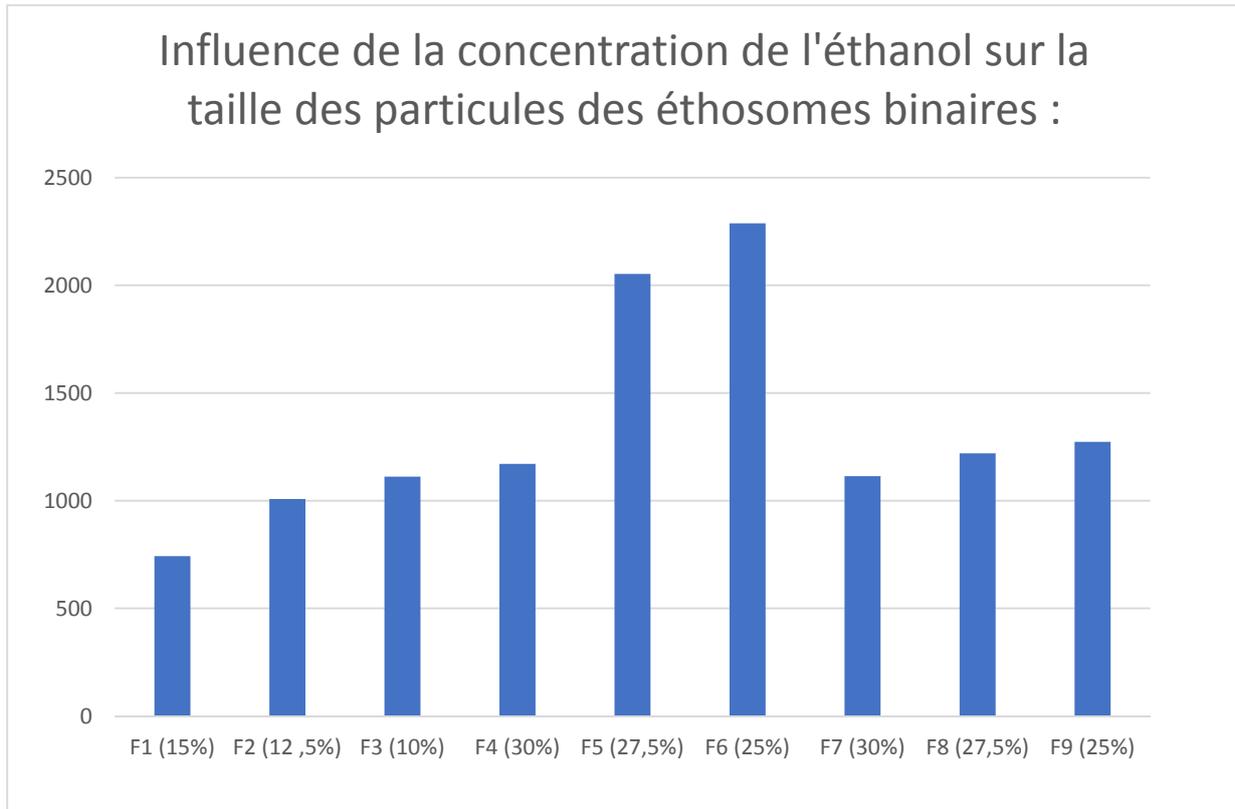


Figure 31. Influence de la concentration de l'éthanol sur la taille des particules des éthosomes binaires

Pour les éthosomes binaires on constate que la diminution de la concentration de l'éthanol au sein du mélange (éthanol-IPA) dans les formulations (F1, F2, F3), (F4, F5, F6) et (F7, F8, F9) a conduit à une augmentation de la taille des particules éthosomales.

Ces résultats sont en accord avec les rapports précédents qui suggéraient que la diminution de la taille avec l'augmentation de la concentration d'éthanol était probablement due à la modification par l'éthanol de la charge de surface nette des vésicules conduisant à une stabilisation stérique et à une réduction de la taille des particules[65].

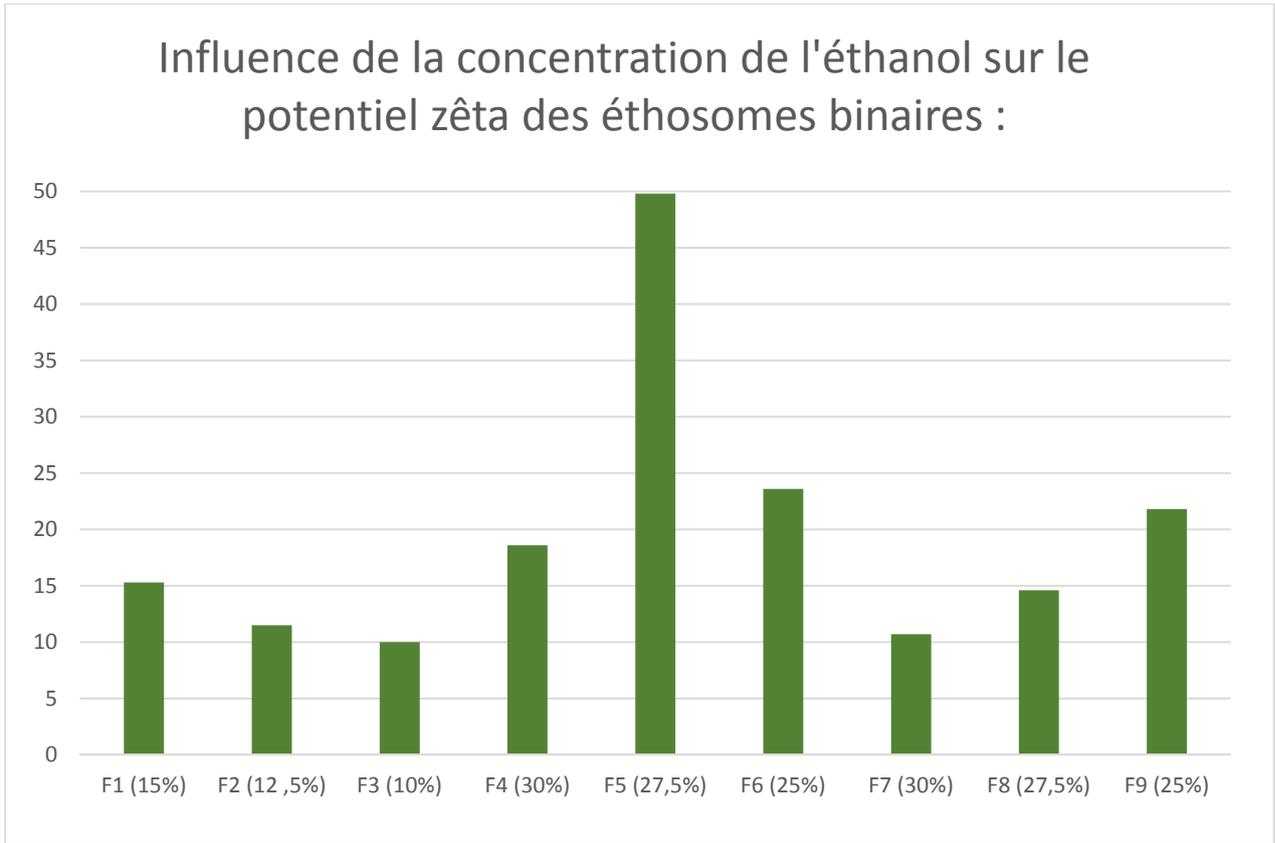


Figure 32. Influence de la concentration de l'éthanol sur le potentiel zêta des éthosomes binaires

Le potentiel zêta varie de -10 à -49,8mv, sont considérés comme des systèmes de stabilité acceptable[76].

V.2.3 Influence de lécithine de soja sur la taille des particules :

- **Ethosomes à blanc :**

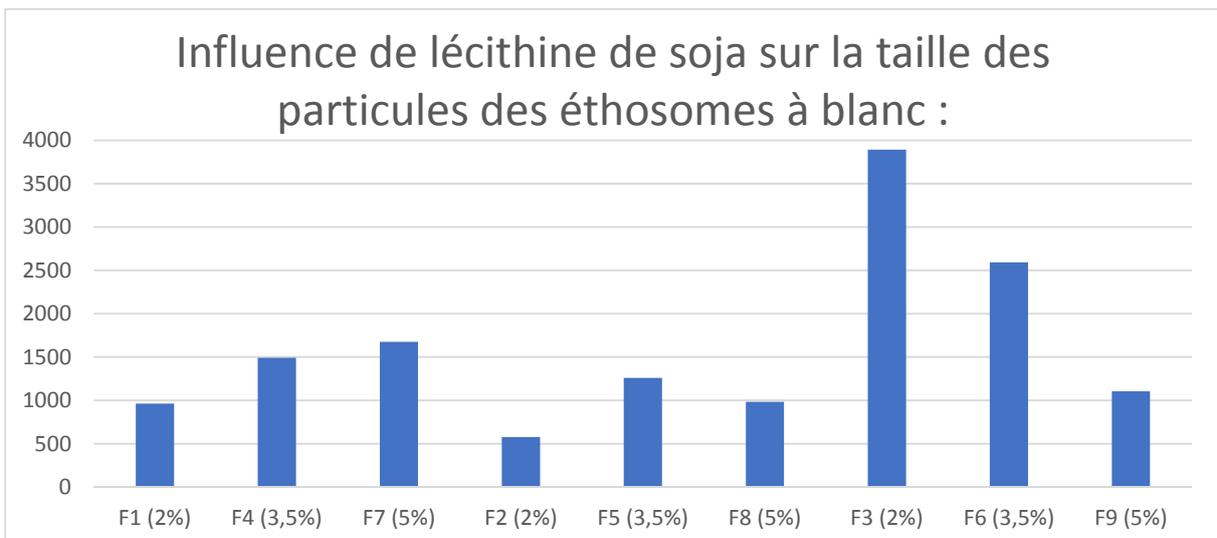


Figure 33. Influence de lécithine de soja sur la taille des particules des éthosomes à blanc

L'augmentation de la concentration en phospholipides de (2%) jusqu'à (5%) tout en maintenant la concentration en éthanol à 20% pour (F1, F4, F7), 35% pour (F2, F5, F8) et (50%) pour (F3, F6, F9) a augmenté la taille des particules.

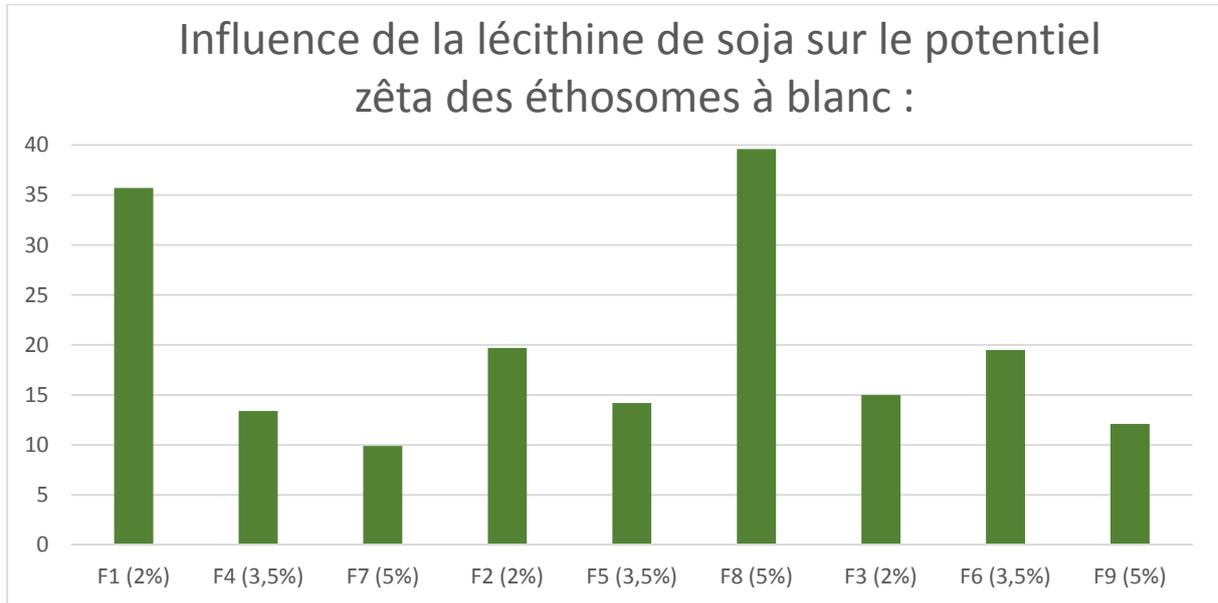


Figure 34. Influence de la lécithine de soja sur le potentiel zêta des éthosomes à blanc le potentiel zêta des éthosomes à blanc varie de -9,9 mV à -39,6 mV, et selon les études bibliographiques les systèmes colloïdaux ayant un potentiel zêta de -12,5 mV sont considérés comme des systèmes de stabilité acceptable[76].

- **Ethosomes binaires :**

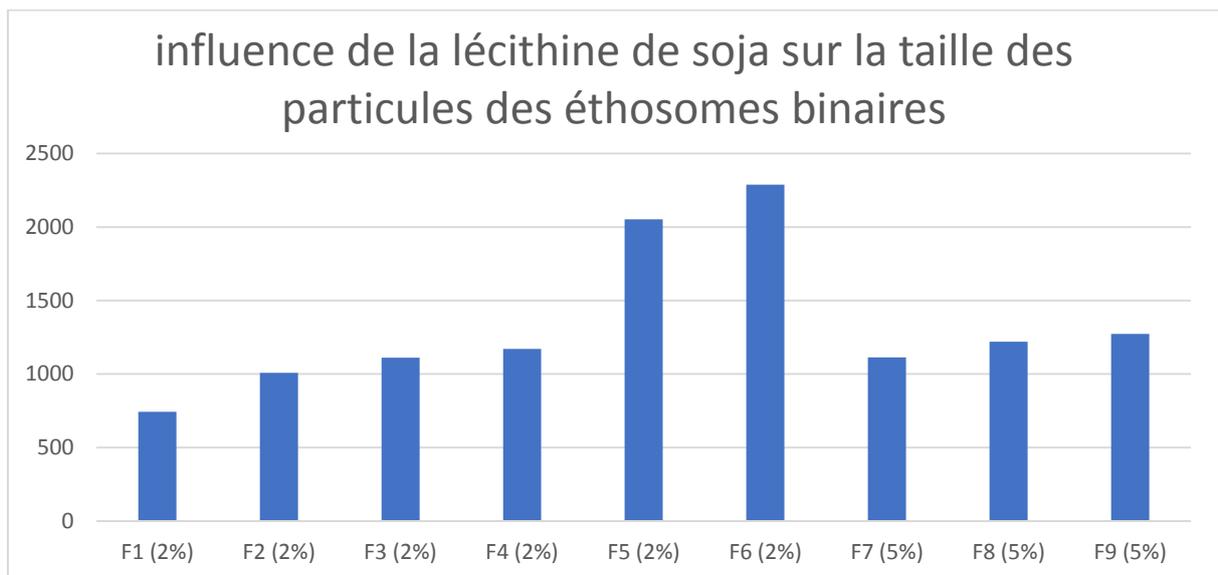


Figure 35. Influence de la lécithine de soja sur la taille des particules des éthosomes binaires

En comparant les formulations ayant des concentrations similaires en éthanol comme suit : (30%, 27.5%, 25%) et des concentrations croissantes en lécithine de soja de 2% (F4, F5, F6) et de 5% (F7, F8, F9) on constate une diminution de la taille des particules, Des résultats similaires ont été observés dans l'étude de « Alhanouf A. Aljohani et Al »[65].

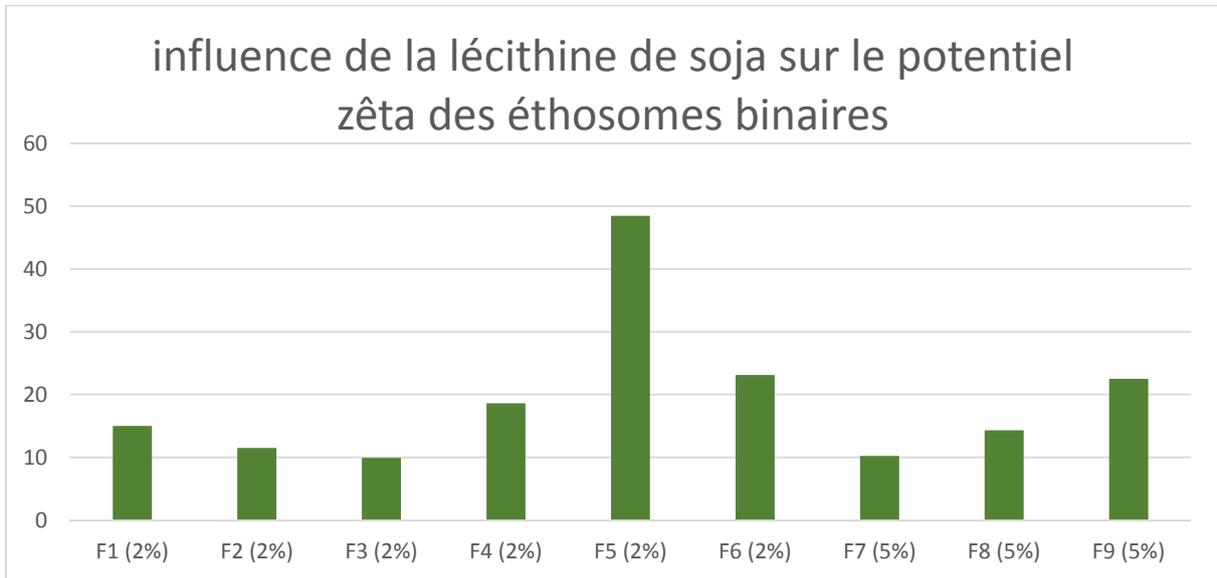


Figure 36. Influence de la lécithine de soja sur le potentiel zêta des éthosomes binaires

Le potentiel zêta varie de -10 à -49,8mv, sont considérés comme des systèmes de stabilité acceptable[76].

V.2.4 Influence de l'éthanol et de la lécithine de soja sur le pourcentage d'encapsulation (EE%) :

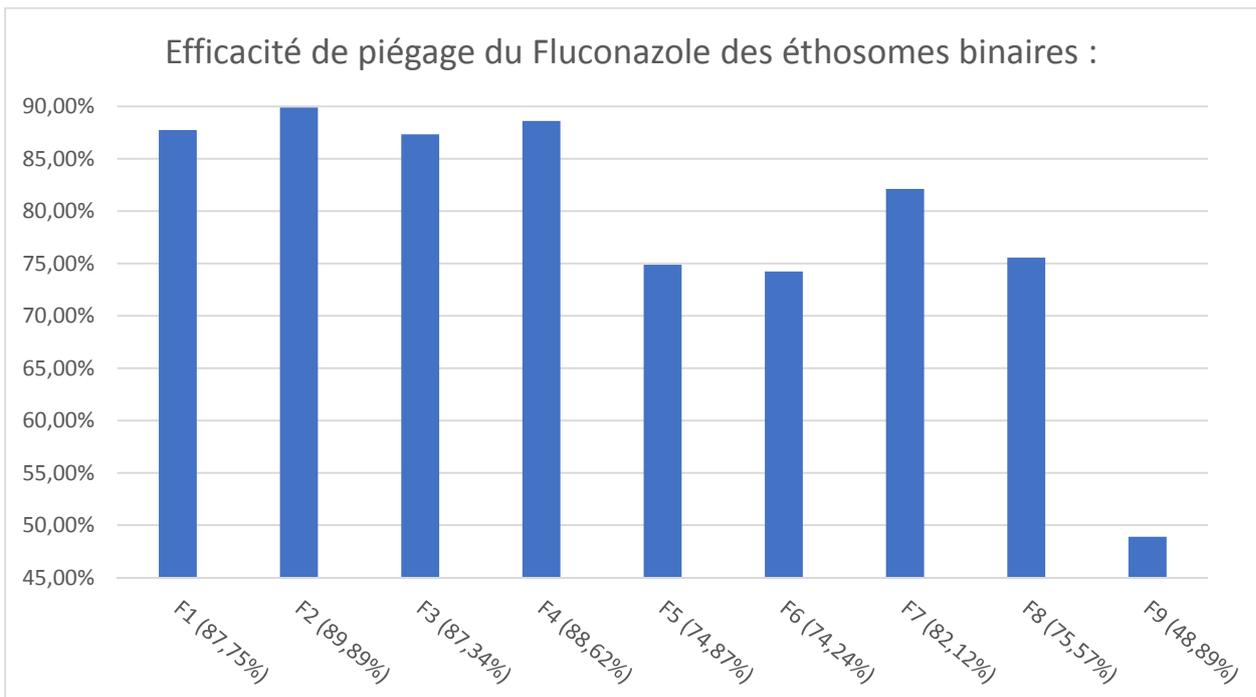


Figure 37. Influence de l'éthanol et de la lécithine de soja sur le pourcentage d'encapsulation (EE%) des éthosomes binaires

Afin d'atteindre l'efficacité maximale d'encapsulation du Fluconazole, les éthosomes ont été préparés à différentes concentrations de phospholipides et d'éthanol. L'efficacité d'encapsulation du principe actif dépend de la concentration en phospholipides et en éthanol utilisée dans la préparation.

- **Effet de l'éthanol sur le EE% :**

L'augmentation de la concentration d'éthanol dans les éthosomes a entraîné une diminution de l'efficacité d'encapsulation du médicament. Ainsi, l'augmentation de la teneur en éthanol de 20 à 35% tout en maintenant la teneur en phospholipides constante à 2% pour les éthosomes binaires « F1,F2,F3,F4,F5 et F6 » a entraîné une diminution de l'efficacité d'encapsulation du Fluconazole de 89,89% à 74,24% pour les formulations binaires, nos résultats s'opposent à ceux de « Abdulbaqi et Al » qui cite que l'augmentation de la concentration d'éthanol augmente l'efficacité de piégeage et que cette relation s'est avérée linéaire, avec des concentrations d'éthanol comprises entre 20 % et 40 %[63, 79]. Cela peut s'expliquer par le fait que lorsque la taille des particules éthosomales a été réduite par l'effet de l'éthanol, le volume du noyau central et des bicouches lipidiques a également diminué. D'autre part, l'augmentation de la perméabilité membranaire due à la concentration élevée en éthanol entraînant une fuite du principe actif à travers la bicouche lipidique pourrait également expliquer la baisse du (EE%)[80-82].

C'est pourquoi la concentration d'éthanol doit être optimisée au cours du processus de formulation, car à de faibles concentrations, l'efficacité du piégeage sera minimale, et à des concentrations très élevées, la membrane éthosomale sera plus perméable car les phospholipides peuvent être facilement dissous dans l'éthanol, ce qui entraînera une réduction significative de l'efficacité du piégeage[63].

- **Effet de la lécithine de soja sur le EE% :**

L'augmentation de la concentration en lécithine de soja de 2 à 5% tout en maintenant la concentration en éthanol à 35% pour les formulations binaires « F4, F5, F6, F7, F8 et F9 » a eu un effet négatif sur le (EE%) qui a diminué de 88,62% à 48,89%. Contrairement à « Abdulbaqi et Al » qui a trouvé dans son étude que la gamme de concentration des phospholipides dans une formulation éthosomale est de 0,5 % à 5 %, et que l'augmentation de la concentration en phospholipides augmente l'efficacité du piégeage de façon significative. Cependant, la relation n'est vraie que jusqu'à une certaine concentration, après laquelle une

augmentation supplémentaire de la concentration en phospholipides n'aura pas d'effet sur l'efficacité du piégeage[63]. De même pour l'auteur « Aljohani et Al » qui a montré dans son étude que l'augmentation du (EE%) en augmentant la concentration en phospholipides pourrait être attribuée à l'augmentation de la rigidité de la structure de la bicouche lipidique et à l'augmentation du ratio du volume lipidique par rapport au volume hydroalcoolique des vésicules[65].

Ces résultats concordent avec les rapports précédents, dans lesquels des concentrations plus élevées de phospholipides fournissaient plus d'espace vésiculaire dans lequel le médicament pouvait être contenu[80].

V.2.5 Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI de la solution de Fluconazole et de la formulation éthosomale binaire optimale par la méthode des microplaques :

- **Interprétation de la CMI de la solution de Fluconazole :**

Selon la littérature[83], la sensibilité de *Candida albicans* au (FLZ) est interprétée comme suite :

- Sensible : $CMI \leq 8$ ($\mu\text{g/ml}$).
- Sensibilité dose-dépendante : CMI entre 16 et 32 ($\mu\text{g/ml}$).
- Résistant : $CMI \geq 64$ ($\mu\text{g/ml}$).

En se basant sur la littérature nous concluons que les souches Ca26 et Ca1010 ont une sensibilité dose-dépendante envers le (FLZ).

- **Comparaison entre l'activité antifongique de la solution de Fluconazole et des formulations éthosomales chargées en Fluconazole :**

L'efficacité in vitro des éthosomes chargés en Fluconazole pour le traitement de la candidose a été évaluée par rapport à la solution du principe actif, il a été constaté que les nouveaux systèmes d'administration développés présentaient une CMI supérieure à celle de la forme d'administration conventionnelle, cela est forcément dus à la diminution de la concentration en principe actif lors de l'encapsulation de 100% dans la solution de (FLZ) brut à 82,56% pour la (F2) qui représente la formulation éthosomale binaire optimale.

Nos résultats s'opposent à ceux de l'auteur « M BAFRUI et Al » qui a mené une étude similaire sur les dermatophytes dans laquelle il conclut que la CMI de la nanoformulation

était inférieure à celle de la solution de (FLZ) pour toutes les espèces de dermatophytes testées[84].

CONCLUSION GENERALE :

Dans le présent travail, un système potentiel d'administration de Fluconazole a été mis au point et caractérisé.

L'éthosome chargé de Fluconazole a été préparé avec succès en utilisant la méthode à froid. Les éthosomes préparés ont été évalués en termes de taille des particules, de potentiel zêta et d'efficacité de piégeage. La taille des particules se situe entre 742,5 et 2288 nm pour les éthosomes binaires. Il a été observé que la taille des particules était inversement proportionnelle à la concentration d'éthanol jusqu'à un certain seuil, et directement proportionnelle à la lécithine de soja. Lorsque la concentration d'éthanol augmente de 20% à 35%, la taille des particules diminue, et lorsque l'éthanol reste constant et que la concentration de lécithine de soja augmente de 2% à 5%, la taille augmente.

Toutes les formulations éthosomales ont présenté une stabilité acceptable avec un potentiel zeta de - 9,91 à - 48,45 mV ainsi que de très bons pourcentages d'encapsulation.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses nous citons en particulier :

- ❖ L'évaluation de l'efficacité éthosomale in Vivo.
- ❖ L'étude de l'influence d'autres paramètres de formulation : le propylène glycol.
- ❖ L'étude de l'influence d'autres paramètres de procédés : la température, la vitesse d'agitation.
- ❖ L'étude de la cinétique de libération.

Références bibliographiques :

1. Paiva-Santos, A.C., et al., *Ethosomes as nanocarriers for the development of skin delivery formulations*. *Pharmaceutical research*, 2021. **38**(6): p. 947-970.
2. Akhtar, N., A. Verma, and K. Pathak, *Topical delivery of drugs for the effective treatment of fungal infections of skin*. *Current pharmaceutical design*, 2015. **21**(20): p. 2892-2913.
3. Rathore, G.S., Y.S. Tanwar, and A. Sharma, *Fluconazole loaded ethosomes gel and liposomes gel: an updated review for the treatment of deep fungal skin infection*. *Pharm Chem J*, 2015. **2**(1): p. 41-50.
4. Shetty, S., et al., *Novel ethosomal gel of clove oil for the treatment of cutaneous candidiasis*. *Journal of cosmetic dermatology*, 2019. **18**(3): p. 862-869.
5. Safta, D.A., C. Bogdan, and M.L. Moldovan, *Vesicular nanocarriers for phytochemicals in wound care: Preparation and characterization*. *Pharmaceutics*, 2022. **14**(5): p. 991.
6. Woo, W.M., *Skin structure and biology*. *Imaging Technologies and Transdermal Delivery in Skin Disorders*, 2019: p. 1-14.
7. Ng, K.W. and W.M. Lau, *Skin deep: the basics of human skin structure and drug penetration*. *Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement: drug manipulation strategies and vehicle effects*, 2015: p. 3-11.
8. Latif, M.S., et al., *A Review on Transdermal Drug Delivery: Design, Evaluation and Approach towards Painless Drug Delivery System*. *Pharmaceutical Communications*, 2022. **1**(01): p. 31-45.
9. Murphrey, M.B., J.H. Miao, and P.M. Zito, *Histology, stratum corneum*. 2018.
10. Dąbrowska, A., et al., *The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors*. *Skin Research and Technology*, 2018. **24**(2): p. 165-174.
11. Ghume, V., et al., *Transdermal drug delivery system: A review*. *Am. J. PharmTech Res*, 2020. **10**: p. 34-47.
12. Kováčik, A., M. Kopečná, and K. Vávrová, *Permeation enhancers in transdermal drug delivery: Benefits and limitations*. *Expert opinion on drug delivery*, 2020. **17**(2): p. 145-155.
13. Tanwar, H. and R. Sachdeva, *Transdermal drug delivery system: A review*. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 2016. **7**(6): p. 2274.
14. Law, R.M., M.A. Ngo, and H.I. Maibach, *Twenty clinically pertinent factors/observations for percutaneous absorption in humans*. *Dermal Absorption and Decontamination: A Comprehensive Guide*, 2022: p. 203-221.
15. Bose, P., et al., *Transdermal drug delivery system: Review and future*. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 2021: p. 3420-3436.
16. Houšť, J., J. Spížek, and V. Havlíček, *Antifungal drugs*. *Metabolites*, 2020. **10**(3): p. 106.
17. Shukla, P., et al., *Past, present, and future of antifungal drug development*. *Communicable Diseases of the Developing World*, 2018: p. 125-167.
18. Bhattacharya, S., S. Sae-Tia, and B.C. Fries, *Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance*. *Antibiotics*, 2020. **9**(6): p. 312.
19. Revie, N.M., et al., *Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact*. *Current opinion in microbiology*, 2018. **45**: p. 70-76.
20. Dannaoui, É., *Résistance des Candida aux antifongiques: détection et mécanismes*. *revue francophone des laboratoires*, 2013. **2013**(450): p. 71-77.
21. Mukaremera, L., et al., *Candida albicans yeast, pseudohyphal, and hyphal morphogenesis differentially affects immune recognition*. *Frontiers in immunology*, 2017. **8**: p. 629.
22. Talapko, J., et al., *Candida albicans—the virulence factors and clinical manifestations of infection*. *Journal of Fungi*, 2021. **7**(2): p. 79.
23. Tsui, C., E.F. Kong, and M.A. Jabra-Rizk, *Pathogenesis of Candida albicans biofilm*. *FEMS Pathogens and Disease*, 2016. **74**(4): p. ftw018.

24. Taudorf, E., et al., *Cutaneous candidiasis—an evidence-based review of topical and systemic treatments to inform clinical practice*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2019. **33**(10): p. 1863-1873.
25. Su, C., J. Yu, and Y. Lu, *Hyphal development in Candida albicans from different cell states*. Current genetics, 2018. **64**: p. 1239-1243.
26. Lee, Y., et al., *Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in Candida albicans and beyond*. Chemical reviews, 2020. **121**(6): p. 3390-3411.
27. Whaley, S.G., et al., *Azole antifungal resistance in Candida albicans and emerging non-albicans Candida species*. Frontiers in microbiology, 2017. **7**: p. 2173.
28. Blokhina, S.V., et al., *Synthesis and antifungal activity of new hybrids thiazolo [4, 5-d] pyrimidines with (1H-1, 2, 4) triazole*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2021. **40**: p. 127944.
29. www.vidal.fr. INDICATIONS ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION. 2023 24 décembre 2023]; Available from: https://www.vidal.fr/medicaments/substances/fluconazole-1507.html?fbclid=IwZXh0bgNhZW0CMTAAR1Wgi9evYvK2rDKaXPoUDu4IEI2XwL-67zwtjcfNZmmR2R9myi2toJq8Nc_aem_AftbxB-PWGnRn_kjc5M0GsbwvueDv5PhyABFHWNI63BrsnHq8E3ZJyPq4dX4pBddZCFaZFM9d2Rntbr0MHKGa#ind.
30. Corrêa, J.C.R. and H.R.N. Salgado, *Review of fluconazole properties and analytical methods for its determination*. Critical reviews in analytical chemistry, 2011. **41**(2): p. 124-132.
31. www.vidal.fr. Effets indésirables possibles du médicament FLUCONAZOLE EG. 2018; Available from: <https://www.vidal.fr/medicaments/gammes/fluconazole-eg-31167.html#:~:text=Une%20h%C3%A9patite%20peut%20rarement%20survenir,naus%C3%A9es%20persistantes%2C%20vomissements%2C%20jaunisse>.
32. indimedo.com. *Side effects of FLUCOZEST 0.5% Gel 15gm*. 2019; Available from: <https://indimedo.com/products/medicine/flucozest-0-5-gel-15gm>.
33. Indora, N. and D. Kaushik, *Design, development and evaluation of ethosomal gel of fluconazole for topical fungal infection*. International journal of engineering science invention research & development, 2015. **1**(8): p. 280-306.
34. Gupta, S.K., et al., *Efficacy of fluconazole and liposome entrapped fluconazole for C. albicans induced experimental mycotic endophthalmitis in rabbit eyes*. Acta Ophthalmologica Scandinavica, 2000. **78**(4): p. 448-450.
35. Soliman, O.A.E.-A., E.A. Mohamed, and N.A.A. Khatera, *Enhanced ocular bioavailability of fluconazole from niosomal gels and microemulsions: Formulation, optimization, and in vitro–in vivo evaluation*. Pharmaceutical Development and Technology, 2019. **24**(1): p. 48-62.
36. Bachhav, Y.G. and V.B. Patravale, *Microemulsion based vaginal gel of fluconazole: formulation, in vitro and in vivo evaluation*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **365**(1-2): p. 175-179.
37. Faisal, W., G.M. Soliman, and A.M. Hamdan, *Enhanced skin deposition and delivery of voriconazole using ethosomal preparations*. Journal of liposome research, 2018. **28**(1): p. 14-21.
38. Song, C.K., et al., *A novel vesicular carrier, transethosome, for enhanced skin delivery of voriconazole: characterization and in vitro/in vivo evaluation*. Colloids and surfaces B: biointerfaces, 2012. **92**: p. 299-304.
39. Verma, P. and K. Pathak, *Nanosized ethanolic vesicles loaded with econazole nitrate for the treatment of deep fungal infections through topical gel formulation*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2012. **8**(4): p. 489-496.
40. Verma, S. and P. Utreja, *Transethosomes of econazole nitrate for transdermal delivery: Development, in-vitro characterization, and ex-vivo assessment*. Pharmaceutical Nanotechnology, 2018. **6**(3): p. 171-179.

41. Qushawy, M., et al., *Design, optimization and characterization of a transfersomal gel using miconazole nitrate for the treatment of candida skin infections*. *Pharmaceutics*, 2018. **10**(1): p. 26.
42. Elmoslemany, R.M., et al., *Propylene glycol liposomes as a topical delivery system for miconazole nitrate: comparison with conventional liposomes*. *AAPS PharmSciTech*, 2012. **13**: p. 723-731.
43. Firthouse, P.M., et al., *Formulation and evaluation of miconazole niosomes*. *Int J PharmTech Res*, 2011. **3**(2): p. 1019-22.
44. Ashe, S., et al., *Development of liposome-encapsulated ketoconazole: formulation, characterisation and evaluation of pharmacological therapeutic efficacy*. *Micro & Nano Letters*, 2015. **10**(2): p. 126-129.
45. Winnicka, K., et al., *Hydrogel of ketoconazole and PAMAM dendrimers: Formulation and antifungal activity*. *Molecules*, 2012. **17**(4): p. 4612-4624.
46. Akhtar, N. and K. Pathak, *Cavamax W7 composite ethosomal gel of clotrimazole for improved topical delivery: development and comparison with ethosomal gel*. *AAPS pharmscitech*, 2012. **13**: p. 344-355.
47. Leal, A.F.G., et al., *Antifungal activity of a liposomal itraconazole formulation in experimental Aspergillus flavus keratitis with endophthalmitis*. *Mycopathologia*, 2015. **179**: p. 225-229.
48. Hay, R., *Liposomal amphotericin B, AmBisome*. *Journal of Infection*, 1994. **28**: p. 35-43.
49. Tuncay Tanrıverdi, S., et al., *Terbinafine hydrochloride loaded liposome film formulation for treatment of onychomycosis: in vitro and in vivo evaluation*. *Journal of liposome research*, 2016. **26**(2): p. 163-173.
50. Offner, F., et al., *Liposomal nystatin in patients with invasive aspergillosis refractory to or intolerant of amphotericin B*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2004. **48**(12): p. 4808-4812.
51. Gheorghe, I., et al., *Nanodrug delivery systems for transdermal drug delivery, in Nanomaterials for drug delivery and therapy*. 2019, Elsevier. p. 225-244.
52. Sahu, T., et al., *Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical science*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2021. **63**: p. 102487.
53. Garg, V., et al., *Ethosomes and transfersomes: Principles, perspectives and practices*. *Current drug delivery*, 2017. **14**(5): p. 613-633.
54. Mohanty, D., et al., *Ethosomes: a novel approach for transdermal drug delivery*. *Int. J. ChemTech Res*, 2018. **11**: p. 219-226.
55. Kumar, N., et al., *Ethosomes: A Novel Approach in Transdermal Drug Delivery System*. *International journal of pharmacy & life sciences*, 2020. **11**(5).
56. Emanet, M. and G. Ciofani, *Ethosomes as Promising Transdermal Delivery Systems of Natural-Derived Active Compounds*. *Advanced NanoBiomed Research*, 2023: p. 2300020.
57. Razavi, H. and S. Janfaza, *Ethosome: a nanocarrier for transdermal drug delivery*. *Archives of Advances in Biosciences*, 2015. **6**(2): p. 38-43.
58. Pakhale, N.V., S. Gondkar, and R. Saudagar, *Ethosomes: transdermal drug delivery system*. *Journal of drug delivery and therapeutics*, 2019. **9**(3): p. 729-733.
59. Touitou, E., et al., *Ethosomes—novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties*. *Journal of controlled release*, 2000. **65**(3): p. 403-418.
60. Kumar, B. and P.K. Sahoo, *Potential of ethosomes for enhanced transdermal drug delivery in skin diseases*. *Nanomedicine Journal*, 2022. **9**(4).
61. Kadhim, Z.M., et al., *Ethosomes as pharmaceutical novel drug delivery technique*. *science*, 2022. **25**: p. 03.
62. Ahad, A., et al., *Ethosomes: a potential vesicular carrier for drug delivery, in Systems of Nanovesicular Drug Delivery*. 2022, Elsevier. p. 221-237.

63. Abdulbaqi, I.M., et al., *Ethosomal nanocarriers: the impact of constituents and formulation techniques on ethosomal properties, in vivo studies, and clinical trials*. International journal of nanomedicine, 2016: p. 2279-2304.
64. Verma, P. and K. Pathak, *Therapeutic and cosmeceutical potential of ethosomes: An overview*. Journal of advanced pharmaceutical technology & research, 2010. **1**(3): p. 274-282.
65. Aljohani, A.A., et al., *Binary ethosomes for the enhanced topical delivery and antifungal efficacy of ketoconazole*. OpenNano, 2023. **11**: p. 100145.
66. Nandure, H.P., et al., *Ethosome: A Novel Drug Carrier*. International journal of pharmaceutical research & allied sciences, 2013. **2**(3).
67. www.ipcms.fr. Zetasizer Nano ZS. 2023; Available from: <https://www.ipcms.fr/departement/departements-v3/chimie-des-materiaux-inorganiques-dcml/instruments-dcml/zetasizer-nano-zs/#:~:text=La%20taille%20des%20particules%20est,qui%20d%C3%A9pend%20de%20leur%20taille>.
68. Santos, E.R.d., et al., *Susceptibility of Candida spp. isolated from blood cultures as evaluated using the M27-A3 and new M27-S4 approved breakpoints*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2014. **56**: p. 477-482.
69. Giram, P., M. SR, and P. Chavan, *FORMULATION DEVELOPMENT AND RESPONSE SURFACE OPTIMIZATION OF ONDANSETRON HCL LIPOSOME, ETHOSOME AS NATURAL VESICLE FOR COMPARATIVE STUDY*. 2015.
70. Madhuri, N., et al., *Statistical Optimization and Evaluation of Ethosomal Miconazole Nitrate Suspension*. International Journal of Applied Pharmaceutics, 2022. **14**(1): p. 295-301.
71. Andleeb, M., H.M. Shoaib Khan, and M. Daniyal, *Development, characterization and stability evaluation of topical gel loaded with ethosomes containing Achillea millefolium L. extract*. Frontiers in pharmacology, 2021. **12**: p. 603227.
72. Nair, R.S., et al., *An evaluation of tocotrienol ethosomes for transdermal delivery using Strat-M® membrane and excised human skin*. Pharmaceutical development and technology, 2021. **26**(2): p. 243-251.
73. Huanbutta, K., 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): p. 2765.
74. AlEbadi, N.N. and M.S. Al-Lami, *Formulation and in-vitro Evaluation of Ethosomes using Anastrozole as a Modeling Drug*. Al Mustansiriyah Journal of Pharmaceutical Sciences, 2022. **22**(4): p. 90-105.
75. Bendas, E.R. and M.I. Tadros, *Enhanced transdermal delivery of salbutamol sulfate via ethosomes*. Aaps Pharmscitech, 2007. **8**: p. 213-220.
76. Zhai, Y., et al., *Ethosomes for skin delivery of ropivacaine: preparation, characterization and ex vivo penetration properties*. Journal of liposome research, 2015. **25**(4): p. 316-324.
77. Cândido, T.M., et al., *Safety and antioxidant efficacy profiles of rutin-loaded ethosomes for topical application*. Aaps Pharmscitech, 2018. **19**: p. 1773-1780.
78. Wilson, V., et al., *Development and evaluation of finasteride loaded ethosomes for targeting to the pilosebaceous unit*. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2018. **46**(8): p. 1892-1901.
79. Shukla, R., et al., *Formulation and evaluation of the topical ethosomal gel of melatonin to prevent UV radiation*. Journal of cosmetic dermatology, 2020. **19**(8): p. 2093-2104.
80. Sakdiset, P., et al., *Formulation development of ethosomes containing indomethacin for transdermal delivery*. Journal of drug delivery science and technology, 2019. **52**: p. 760-768.
81. Paliwal, S., et al., *Flurbiprofen loaded ethosomes-transdermal delivery of anti-inflammatory effect in rat model*. Lipids in health and disease, 2019. **18**: p. 1-15.
82. Shelke, S., et al., *Ethosomes: a novel deformable carrier*. World journal of pharmaceutical sciences, 2015: p. 1830-1839.

83. Liao, R.S., R.P. Rennie, and J.A. Talbot, *Novel fluorescent broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001. **39**(7): p. 2708-2712.
84. Bafroi, N.M., S.J.H. Hazaveh, and M. Bayat, *In-Vitro Activity of Nano Fluconazole and Conventional Fluconazole against Clinically Important Dermatophytes*. *Iranian Journal of Public Health*, 2020. **49**(10): p. 1970.

Table des Annexes

**Annexe I. Etude de l'influence du temps de sonication, de la concentration de l'éthanol et de la concentration de la
lécithine de soja sur la taille des particules, le potentiel zêta sur les éthosomes binaires**

Temps de sonication	Paramètre mesuré	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
22 ,5 minutes	Taille des particules (nm)	671 ,4	682,2	1193	1333	1304	2328	1237	1409	1432
		813,6	1333	1030	1009	2801	2248	954,2	1030	1114
	Moyennes des tailles des particules (nm)	742,5	1007,6	1111,5	1171	2052,5	2288	1113,6	1219,5	1273
	Potentiel zêta (mV)	-14,7	-11,5	-9,83	-18,6	-47,1	-22,6	-9,73	-14	-22,3
		-15,3	-11,5	-10	-18,6	-49,8	-23,6	-10,7	-14,6	-21,8
	Moyennes du potentiel zêta (mV)	-15	-11,5	-9,91	-18,6	-48,45	-23,1	-10,21	-14,3	-22,5

Résumé :

La peau constitue une barrière pour l'administration dermique des médicaments, pour laquelle la couche cornée représente le plus grand défi. Le Fluconazole est le principe actif de premier choix dans le traitement des infections fongiques cutanées dont l'efficacité est conditionnée par son degré de pénétration à travers la peau. Le système vésiculaire éthosomale est considéré comme l'une des approches les plus prometteuses pour l'administration topique et transdermique des principes actifs.

L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'influence des paramètres de formulation et de procédés sur la taille des particules, le potentiel zêta et le pourcentage d'encapsulation (EE%) d'un nanomédicament ainsi que l'évaluation de son activité antifongique.

Les formulations éthosomales à blanc et binaires chargées de Fluconazole ont été préparées par la méthode à froid et ont été optimisées en utilisant des concentrations variables de lécithine de soja et du mélange d'éthanol et d'alcool isopropylique ainsi qu'une variation dans le temps de sonication. La formulation binaire optimale a ensuite servi à la détermination de l'activité antifongique contre *Candida albicans* par la méthode des microplaques.

La taille des particules et le (EE%) se sont avérés inversement proportionnels au temps de sonication et à la concentration de l'éthanol jusqu'à un certain seuil, tandis que la concentration de la lécithine de soja s'est démontrée directement proportionnelle à ces derniers, le potentiel zeta s'est traduit en une stabilité acceptable pour les différentes concentrations.

Mots clés : éthosomes binaires, taille des particules, potentiel zêta, efficacité d'encapsulation, activité antifongique.

Abstract :

The skin is a barrier for the dermal administration of drugs, where the stratum corneum represents the greatest challenge. Fluconazole is the active ingredient of first choice in the treatment of cutaneous fungal infections, and its efficacy depends on the extent to which it penetrates the skin. The ethosomal vesicular system is considered to be one of the most promising approaches for the topical and transdermal delivery of active ingredients.

The aim of the present study is to evaluate the influence of formulation and process parameters on the particle size, zeta potential and percentage encapsulation (EE%) of a nanodrug and to assess its antifungal activity.

Blank and binary loaded ethosomal formulations of Fluconazole were prepared by the cold method and were optimised using varying concentrations of soy lecithin and the mixture of ethanol and isopropyl alcohol and sonication time. The optimal binary formulations was then used to determine the antifungal activity against *Candida albicans* using the broth microdilution method.

Particle size and (EE%) were found to be inversely proportional to sonication time and ethanol concentration up to a certain limit, while soy lecithin concentration was found to be directly proportional to the latter, with zeta potential translating into acceptable stability for all concentration variations.

Key words: binary ethosomes, particle size, zeta potential, encapsulation efficiency, antifungal activity.

ملخص :

يمثل الجلد حاجزاً أمام إعطاء الأدوية عن طريق الجلد، حيث تمثل الطبقة القرنية أكبر تحدٍ. يعتبر الفلوكونازول هو العنصر النشط المفضل الأول في علاج الالتهابات الفطرية الجلدية، وتعتمد فعاليته على مدى اختراقه للجلد. يعتبر النظام الحويصلي الإيثوسومي أحد أكثر الأساليب الواعدة لتوصيل المكونات النشطة موضعياً و عبر الجلد.

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تأثير معاملات التركيب والمعالجة على حجم الجسيمات وإمكانات زيتا والنسبة المئوية لتغليف (EE%) دواء نانوي وتقييم نشاطه المضاد للفطريات.

تم تحضير تركيبات فارغة وثنائية محملة بالإيثوسومال من الفلوكونازول بالطريقة الباردة وتم تحسينها باستخدام تركيزات متفاوتة من ليسيثين الصويا والإيثانول ووقت الصوتنة. ثم استُخدمت التركيبات الثنائية المثلى لتحديد النشاط المضاد للفطريات ضد المبيضات البيضاء باستخدام طريقة التخفيف الدقيق للمرق.

وُجد أن حجم الجسيمات و(EE%) يتناسبان عكسياً مع وقت الصوتيات وتركيز الإيثانول حتى حد معين، بينما وُجد أن تركيز ليسيثين الصويا يتناسب طردياً مع هذا الأخير، مع إمكانية زيتا التي تترجم إلى ثبات مقبول لجميع الاختلافات في التركيز.

الكلمات المفتاحية: الإيثوسومات الثنائية، حجم الجسيمات، إمكانات زيتا، كفاءة التغليف، نشاط المضاد للفطريات.