

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

Etude de l'Activité Antifongique de Nanoparticules à Base d'Huile Essentielle des Feuilles de *Pistacia lentiscus*

Présenté par :

Mr NAIT BACHIR Yacine

Soutenu le : Mercredi 29 juin 2016.

Devant le jury composé de:

- Président :	Mme BAAZIZI. R	Maitre assistant – Classe A	ENSV.
- Promoteur :	Mme AISSI. M	Professeur	ENSV.
- Examineur 1:	Mme BEN-MOHAND. C	Maitre assistant – Classe A	ENSV.
- Examineur 2 :	Mr ZAOUANI. M	Maitre assistant – Classe A	ENSV.

Remerciements

En premier lieu, je remercie ma promotrice, **Pr Aissi Miriem** de m'avoir hébergé dans son laboratoire de parasitologie et mycologie médicale à l'ENSV, sans sa confiance ce sujet n'aurait jamais vu le jour.

Je remercie **Mme BAAZIZI. R**, **Mme BEN-MOHAND. C** et **Mr ZAOUANI. M** de m'avoir fait l'honneur de constituer les membres de mon jury de soutenance.

Je remercie **Mr Ahmed Rachid Saadi** pour ses conseils, sa compagnie très agréable et ses encouragements tout au long de la réalisation de ce travail, merci beaucoup ami AHMED.

Merci à **TONTON Mouhamed Hadibi** pour ces encouragements et son soutien pour l'intégration de l'ENSV d'Alger.

Merci à **M^r GUERMOUCHE** et **M^{me} ZEDDAME** pour leurs précieux conseils.

Merci à **M^r TALEB** de m'avoir permis de réaliser des analyses par microscopie électronique.

Merci à **KRIMOU BASTA** de m'avoir permis d'accéder au laboratoire de contrôle qualité de l'entreprise pharmaceutique d'EL-KENDI, et de m'avoir encouragé à bien finir le projet, et merci à tous les membres de l'équipe pour leurs aides et leurs encouragements.

Merci à ma très chère amie **HAYETTE** de m'avoir soutenu.

Merci à mon ami Mouh de m'avoir aider à réaliser des vidéos pour ma présentation, et pour son soutien sans failles.

Un grand merci à ma **MAMAN à SELMA**, à **RYMA** et à **AZZEDINE** de m'avoir aidé lors des manipulations et d'avoir été ma source d'inspiration.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A ce que j'ai de plus chère au monde, mes deux petites sœurs : Ryma et Selma.

A ma mère qui m'a toujours soutenue.

A mon père qui m'a aidé à comprendre les plus grandes leçons de la vie.

A mes tentes : Saliha, Rabea, Amel, Lamia et à mes oncles Kamel, Redouan, M^{ed} Ouamer, Samir et leurs maris, femmes et enfants.

A mes cousins et cousines : Foudil, Asma, Brahim, Smain, Amimar, Seddik, Bachir, Aicha, Karim, Farid, Haitame, Azzedine, Ilhem, Nazim, M^{ed} Cherif, Lyna, Mahieddine, Sifeddine, Walid, Yacine, Hafid, Ferial, Smain, Doria et Kamel.

A mon chère ami Karim, sa femme Soumia et ses enfants Chakib, Melissa et Lydia.

A Sarah d'avoir toujours été là pour moi, et d'avoir illuminé ma vie à chaque fois quelle est à mes côtés.

A mes amis.

En mémoire de

Ma petite sœur Doudou.

La seconde femme la plus merveilleuse au monde, ma grande mère Tassadite

Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Sommaire	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	1
I.1. Extraction des molécules bioactives	2
I.1.1. Procédés d'extractions des composés volatiles	2
I.1.1.1. L'hydrodistillation	3
I.1.1.2. L'entraînement à la vapeur d'eau	3
I.1.2. Procédés d'extractions des composés non-volatiles	4
I.1.2.1. Macération	4
I.1.2.2. Infusion	4
I.1.2.3. Décoction	4
I.1.2.4. Extraction par Soxhlet	4
I.2. Caractérisation physicochimique des extraits	5
I.2.1. La phytochimie et les principaux métabolites secondaires des végétaux	5
I.2.2. Détermination de la composition chimique d'un extrait de plante	7
I.2.3. Isolation, purification et résolution structurale d'une molécule à partir d'un extrait	8
I.3. Caractérisation pharmaco-toxicologique des molécules bioactives	9
I.3.1. Etude de la toxicité : aigue, subaigüe et chronique	9
I.4. Etat de l'art sur la phytochimie et la pharmacologie de Pistacia lentiscus	10
I.4.1. Données botaniques sur Pistacia Lentiscus	10
I.4.2. Phytochimie de Pistacia lentiscus	10
I.4.2. 1. Composés volatils (composition chimique de l'huile essentielle)	11
I.4.3. Pharmacologie de Pistacia lentiscus	12
II.1. Intérêt de La médecine vétérinaire alternative	14
II.2. Exemples de médicaments naturels à usage vétérinaire commercialisés	14
II.3. Les limites et les inconvénient de l'utilisation de ces produits	16
III.1. La nanotechnologie un défi pour la science	17
III.2. Les Micro/Nanosystèmes pour la vectorisation des médicaments	18
III.3. Effets des Micro/Nanosystèmes sur les effets thérapeutiques d'un médicament	19
IV.1. Les mycoses dues à <i>microsporum canis</i>	20
IV.1.1. Etude microbiologique de <i>microsporum canis</i>	20
IV.1.2. Diagnostic des mycoses à <i>Microsporum canis</i>	20
IV.1.3. Traitement des mycoses à <i>Microsporum canis</i>	22
IV.2. Les mycoses dues à <i>Microsporum gypseum</i>	23
IV.2.1. Etude microbiologique de <i>Microsporum gypseum</i>	23
IV.2.2. Diagnostic des mycoses a <i>Microsporum gypseum</i>	24
IV.2.3. Traitement des mycoses a <i>Microsporum gypseum</i>	24
IV.3. Les mycoses dues à <i>Candida albicans</i> : (candidose aviaire)	24
IV.3.1. Etude microbiologique de <i>Candida albicans</i>	25
IV.3.2. Diagnostic des mycoses a <i>Candida albicans</i>	25
IV.3.3. Traitement des mycoses à <i>Candida albicans</i>	26
IV.4. Les mycoses dues à <i>Aspergillus fumigatus</i> : (mammites aspergillaires des ruminants)	26
IV.4.1. Etude microbiologique d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	26
IV.4.2. Diagnostic des mycoses à <i>Aspergillus fumigatus</i>	27

IV.4.3. Traitement des mycoses a <i>Aspergillus fumigatus</i>	29
V.1. Matériel	30
V.1.1. Matériel végétal	30
V.1.2. Produits chimiques	30
V.2.. Préparation et caractérisation de l'extrait	31
V.2.1. Extraction de l'huile essentielle	31
V.2.2. Composition chimique de l'huile essentielle	31
V.3. Formulation et caractérisation du nanosystème de délivrance	31
V.3.1. Formulation des nanoémulsions enrobées	32
V.3.2. Optimisation de la formulation par la méthode de plan d'expériences	32
V.3.3. Caractérisation des nanoémulsions enrobées	33
V.3.3.1. La teneur en huile essentielle (R1)	33
V.3.3.2. La granulométrie laser (R2 et R3)	33
V.3.3.3. La mesure du potentiel zêta (R4)	34
V.3.3.4. La microscopie électronique	34
V.3.4. Etude de stabilité des nanoémulsions enrobées	34
V.3.4.1. Etude de stabilité physique de la nanoemulsion	34
V.3.4.2. Etude de stabilité chimique de l'huile essentielle avant et après encapsulation	34
V.4. Evaluation de l'activité antifongique in-vitro	35
V.4.1. Les souches utilisées	35
V.4.2. La méthode de diffusion sur gélose à partir des disques	36
V.4.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale (CMI/CMF)	fongicide 37
VI.1. Préparation et caractérisation du principe actif	38
VI.2. Préparation, caractérisation et étude de stabilité de la nanoformulation	39
VI.2.1. Optimisation des paramètres de préparation de la nanoemulsion enrobée	39
VI.2.1.1. Effet des facteurs sur les réponses	39
VI.2.1.2. Modélisation mathématique du procédé de formulation	40
VI.2.1.3. Etude statistique	41
VI.2.1.4. Détermination de la formulation optimale	42
VI.2.2. Etude de stabilité des nanoformulations	42
VI.2.2.1. Stabilité physique	42
VI.2.2.2. Stabilité chimique	43
VI.2.3. Caractérisation de la formulation par microscopie électronique à transmission	44
V.3. Evaluation de l'activité antifongique in-vitro	44
V.3.1. La méthode de diffusion sur gélose à partir des disques	44
V.3.2. Méthode de dilution en milieu solide	45
Conclusion générale	47
Perspectives	
Bibliographie	
Annexes	

Liste des figures :

Figure 1 : Le schéma d'un montage d'hydrodistillation classique.	3
Figure 2 : Le schéma d'un montage d'entraînement à la vapeur d'eau.	4
Figure 3 : Schéma d'un extracteur Soxhlet.	5
Figure 4 : Photographie des feuilles et fruits de <i>Pistacia Lentiscus</i> .	10
Figure III.1 : Morphologie des nanoparticules.	17
Figure IV.1 : Microphotographie de <i>microsporum canis</i> .	20
Figure IV.2 : Lésions de teigne sur le tronc d'un chien.	20
Figure IV.3 : Lampe de Wood.	21
Figure IV.4 : Spores de <i>Microsporum canis</i> en manchon autour d'un poil (microscopie optique).	21
Figure IV.5 : Diagnostic de <i>M. canis</i> par culture. (A) une culture de <i>M. canis</i> de 12 jours sur le milieu Sabouraud, (B) microphotographie du <i>M. canis</i> cultivé.	22
Figure IV.6 : Lésions de teigne à <i>M. gypseum</i> sur le tronc d'un chien (gauche) et la tête d'un cheval (droite).	24
Figure IV.7 : Diagnostic de <i>M. gypseum</i> par culture. (A) une culture de <i>M. gypseum</i> de 12 jours sur le milieu Sabouraud, (B) microphotographie du <i>M. gypseum</i> cultivé.	24
Figure IV.8 : <i>Candida albicans</i> . Culture de <i>candida albicans</i> (gauche) et Microphotographie de <i>Candida albicans</i> (droite).	25
Figure IV.9 : Jabot isolé de pintades de Numidie recouvert de <i>Candida</i> sp. Hyperplasie, inflammation et replis muqueux anormaux.	26
Figure IV.10 : <i>Aspergillus fumigatus</i> . Culture d' <i>Aspergillus fumigatus</i> (gauche) et d' <i>Aspergillus fumigatus</i> (droite).	27
Figure IV.11 : Mammmites aspergillaires d'une brebis.	27
Figure V.1 : Position géographique de Roudah, Ouled Sidi Brahim, Bouira, Algérie (à gauche), <i>Pistacia lentiscus</i> avant séchage (milieu) et après séchage (à droite).	30
Figure V.2 : Clevenger, Schématisation (à gauche) et photographie (à droite).	32
Figure V.3 : L'appareil CG/SM de type GC 6890 / 5973 MSD (Agilent).	32
Figure V.4 : Le système utilisé pour la réduction de taille (T 25 digital ULTRA-TURRAX®).	32
Figure V.5 : Le spectrophotomètre de type Beckman DU 520 (à gauche) et le granulomètre/ zetamètre.	33
Figure V.6 : Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétrie.	36
Figure V.7 : Illustration de la méthode des dilutions en milieu solide.	37
Figure VI.1 : Chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> .	38
Figure VI.2 : les contours représentant l'effet des facteurs sur les réponses.	39
Figure VI.3 : les histogrammes représentant les coefficients des facteurs et leurs interactions sur chaque réponse.	40
Figure VI.4 : les paramètres R2 et Q2 du plan d'expériences étudié.	40
Figure VI.5 : Les photographies des 5 formulations à J 0, J 10 et J 20. Les cercles en rouge correspondent aux sédimentations et le cercle en bleu correspond au crémage.	42
Figure VI.6 : Microphotographie de la formulation F2 sous microscope électronique à transmission.	44
Figure VI.7 : les photographies des boîtes de Pétries dans lesquelles l'activité antifongique par la méthode de diffusion sur gélose a été réalisée. (1) disque imbibé de placebo, (2) disque imbibé d'huile essentielle, (3) disque imbibé de la formulation F2. (A) le teste sur <i>A. fumigatus</i> , (B) le teste sur <i>M. canis</i> , (C) le teste sur <i>M. gypsum</i> et (D) le teste sur <i>C. albicans</i> .	45
Figure VI.8 : résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle et de la formulation F2 par la méthode de dilution en milieu solide (suivre l'étiquetage des tubes).	46

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Compléments alimentaires et médicaments à usage vétérinaire à base de principes naturels.	15	actifs
Tableau V.1 : Matrice des essais du plan factoriel.	33	
Tableau V.2. : Souches microbiennes utilisées dans la présente étude.	35	
Tableau V.3 : Interprétation de l'activité antifongique en utilisant la méthode de diffusion sur disques de 9 mm).	36	gélose (pour des
Tableau VI.1 : Matrice des résultats du plan d'expériences.	39	
Tableau VI.2 : Etude de stabilité physique des nanoemulsion a 40°C.	42	
Tableau VI.3 : Etude de stabilité chimique de l'huile essentielle et de la formulation F2 à 40°C.	42	
Tableau VI.4 : Activité antifongique de l'huile essentielle et de la formulation F2 par la méthode diffusion sur gélose.	45	des disques
Tableau VI.5 : Activité antifongique de l'huile essentielle et de la nanoémulsion par la méthode sur gélose.	46	des discs diffusion

Introduction générale

L'un des rôles principaux du médecin vétérinaire est d'assurer l'avenir de la santé animale tout en renforçant la prophylaxie primaire vis-à-vis des maladies humaines principalement transmissibles par les animaux en évitant toute utilisation de substances bioactives permettant le développement de biorésistances des germes pathogènes. Afin d'accomplir ce rôle d'une manière efficace, de nombreux chercheurs en médecine vétérinaire se sont retournés vers l'utilisation des molécules bioactives d'origine végétale pour soigner les animaux (**Hammond et al., 1997 ; Wynn & Fougere, 2006 ; Schoen & Wynn, 1998 ; Hare, 1999 ; Wynn & Marsden, 2003 et Grosmond, 2012**). La médecine vétérinaire alternative est une partie non-négligeable dans les plans thérapeutiques actuels, d'un point de vue économique elle est moins couteuse et plus accessible pour les éleveurs et d'un point de vue sanitaire cette médecine est la plus sûre pour les animaux (les effets indésirables sont très rares voir inexistants), pour les consommateurs (aucun délais d'attente pour l'abattage ou encore la consommation du lait, des œufs) et plus important aussi la remédiation à un problème sanitaire majeur qui est la résistance microbienne. Effectivement, les microorganismes ne développent pas de résistances aux molécules bioactives d'origine naturelle à cause de la diversité des familles de molécules et des pharmacophores présents dans un même traitement (**Hemaiswarya et al., 2008**). Toutefois, ces produits présentent deux principaux inconvénients, le premier est leur durée de conservation très courte (les délais entre les dates de production et de péremptions sont très proches), le deuxième est leur packaging très couteux (utilisation des matières isolantes qui peuvent coûter encore plus chère que le médicament lui-même dans certains cas). Afin de proposer une solution pour résoudre le problème d'instabilité des molécules bioactives d'origine naturelle et d'augmenter leurs performances pharmacologiques, les chercheurs ont imaginé plusieurs approches mais toutes ces approches jouent soit sur les matériaux d'emballage soit sur la mise au point de gélules et des capsules dures ayant des propriétés isolantes (**Courtois et al., 2003**). Dans ce travail, nous allons proposer une nouvelle stratégie pour résoudre le problème d'instabilité de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* par la mise au point d'une nanoformulation à base de chitosane et de gomme d'acacia en utilisant la technique des plans d'expériences, les systèmes seront analysés par granulométrie laser, zétamétrie et la microscopie électronique à transmission. Une étude de stabilité physicochimique sera effectuée sur une durée de 20 jours et enfin l'évaluation de l'activité antifongique de cette huile essentielle avant et après formulation sera déterminée par la méthode de diffusion sur gélose et la méthode des dilutions en milieu solide.

Depuis son existence, l'homme a été confronté aux maladies et aux problèmes de santé, grâce à son instinct de survie, il a utilisé tous ce qui il y a autour de lui pour remédier à ses problèmes (des parties de plantes, des tissus d'animaux, des substances organiques, des substances minérales ...). La « phytothérapie » est un mot qui vient du grec "φυτο" qui signifie plante et "θεραπεία" qui signifie soigner, c'est une médecine fondée sur l'utilisation des extraits de plantes et les principes actifs d'origine végétale pour le traitement des maladies ; Elle est considérée comme une médecine traditionnelle et non conventionnelle selon l'OMS à cause de l'absence des études cliniques systématiques (**Bulletin de l'OMS, 2008**) ; Toutefois, les produits finis à base de plantes sont soumis à une autorisation de mise sur le marché (AMM) et les préparations magistrales de plantes sont soumises à la réglementation sur les matières premières à usage pharmaceutique (MPUP). Avec les avancés technologiques, le control de la production de ces principes actifs par les végétaux, les animaux ou mêmes les microorganismes est devenu possible et susceptible d'être optimisé par l'amélioration des procédés d'extractions (**Gong et al., 2012**) et le génie génétique (**Fiehn et al., 2000** et **Roessner et al., 2001**). Tout au long de ce chapitre, nous allons synthétiser de manière très brève les différents procédés d'extractions, les techniques d'analyses physico-chimiques et l'étude toxico-pharmacologique des substances bioactives d'origine végétale.

I.1. Extraction des molécules bioactives :

Les procédés d'extraction des molécules bioactives peuvent être classés en utilisant plusieurs critères (**Starmans & Nijhuis, 1996** et **Azmir et al., 2013**) comme les phases intervenant dans le système (extraction solide-liquide, liquide-liquide ou solide-solide), l'avancé technologique (méthodes conventionnelles ou non-conventionnelles) ou encore selon le type des produits extraits (méthodes d'extraction des composés volatiles et les méthodes d'extraction des composés non-volatiles), c'est cette dernière classification qui va être utilisée dans notre étude.

I.1.1. Procédés d'extractions des composés volatiles :

L'extraction des composés volatiles (huile essentielle ou essence végétale) à partir de matières végétales peut être réalisée par extraction mécanique ou l'expression à froid (**Muthaiyan et al., 2012**), entraînement à la vapeur d'eau (**Ozel & Kaymaz, 2004** et **Masango, 2005**), hydrodistillation (**Jamshidi et al., 2009**) ou encore l'extraction par solvant organique non

aqueux volatile (hexane, éther...) (**Ozel & Kaymaz, 2004**). Ces techniques conventionnelles peuvent être assistées par de nouvelles technologies comme les ultrasons (**Shirsath et al., 2012**), les micro-ondes (**Craveiro et al., 1989**) ou encore les fluides supercritiques(**Ozel & Kaymaz, 2004; Khajeh et al., 2004** et **Herrero et al., 2006**).

I.1.1.1. L'hydrodistillation :

La plante aromatique en contact avec l'eau bouillante est chauffée, ensuite l'huile essentielle est évaporée et transportée par la vapeur d'eau puis distillée avec elle. La figure 1 ci-dessous montre le schéma d'un montage d'hydrodistillation classique.

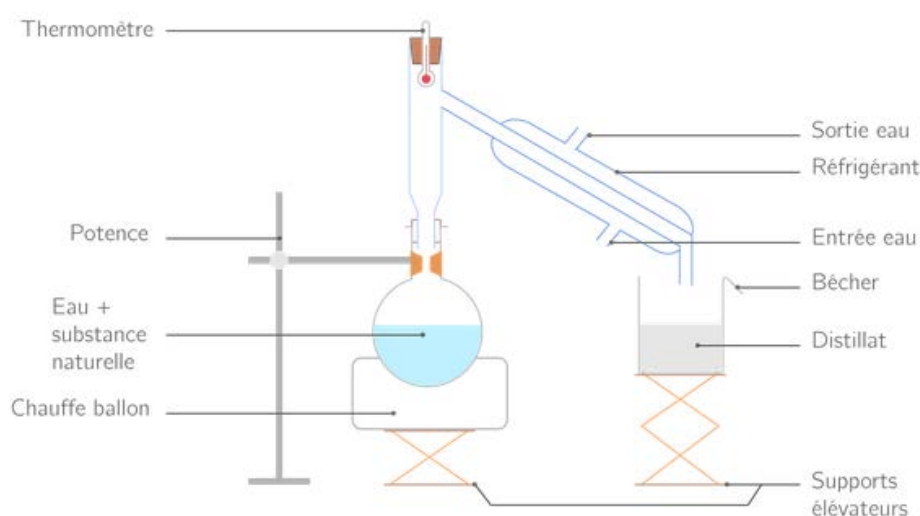


Figure 1 : Le schéma d'un montage d'hydrodistillation classique.

I.1.1.2. L'entraînement à la vapeur d'eau :

Un flux de vapeur d'eau est injecté au contact de la plante aromatique contenant l'huile essentielle ; Cette dernière est chauffée par la vapeur d'eau puis distillée avec elle. La figure 2 ci-dessous montre le schéma d'un montage d'entraînement à la vapeur d'eau.

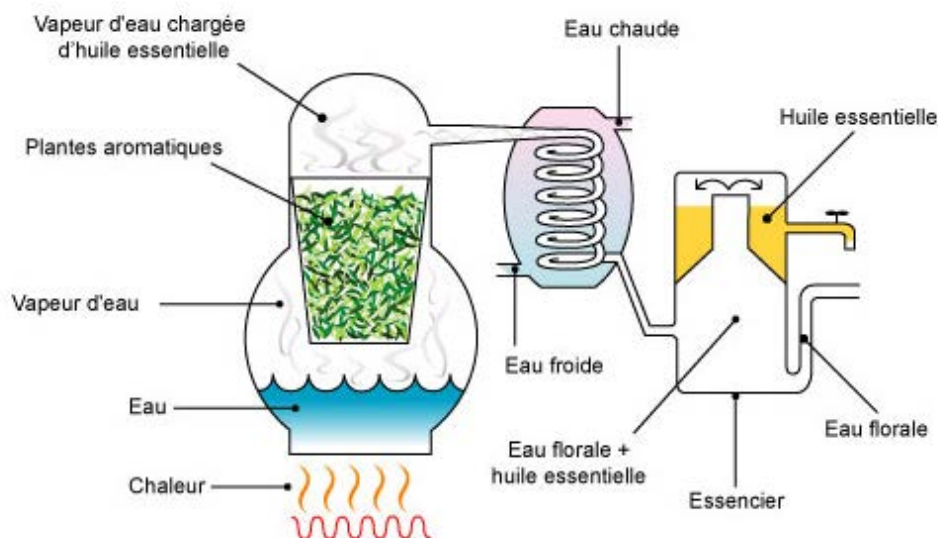


Figure 2 : Le schéma d'un montage d'entraînement à la vapeur d'eau.

I.1.2. Procédés d'extractions des composés non-volatiles :

L'extraction des composés non-volatiles se fait par solvant (eau, solutions aqueuses, solvants organiques ...) par chauffage (infusion ou décoction) ou à froid (macération), ces différentes techniques peuvent aussi être assistées par de nouvelles technologies comme les ultrasons (Shirsath et al., 2012), les micro-ondes (Li et al., 2011) ou encore les fluides supercritiques (Herrero et al., 2006).

I.1.2.1. Macération :

Elle consiste à mettre la matière végétale dans de l'eau froide (macération aqueuse) ou un solvant organique (macération huileuse, alcoolique ...), pendant plusieurs heures, voir plusieurs jours pour permettre aux constituants actifs de bien diffuser. Utilisée pour empêcher l'extraction des constituants indésirables qui se dissolvent dans l'eau chaude (Kraft et Hobbs, 2004) ou encore pour l'extraction des composés thermosensibles susceptibles d'être dégradés lors du chauffage (Dias et al., 2013).

I.1.2.2. Infusion :

Elle se prépare en versant de l'eau bouillante sur les parties de plantes fraîches ou séchées et les bien tremper afin d'extraire leurs principes médicinales ; En d'autre termes, c'est une macération à chaud sans porter le système (matière végétale + eau chaude) à ébullition.

I.1.2.3. Décoction :

Elle consiste à faire bouillir les plantes fraîches ou séchées dans de l'eau pendant 10 à 30 min, pour extraire les principes actifs.

I.1.2.4. Extraction par Soxhlet :

L'extraction par Soxhlet est une série d'infusions réalisée par la régénération du même solvant de manière continue (le solvant s'évapore du ballon, se condense pour remplir le tube en verre qui contient la matière végétale, puis il redescend dans le ballon grâce au siphon) d'où l'augmentation du rendement et la rapidité de l'opération, le schéma d'un extracteur Soxhlet est donné dans la figure 3 ci-dessous.

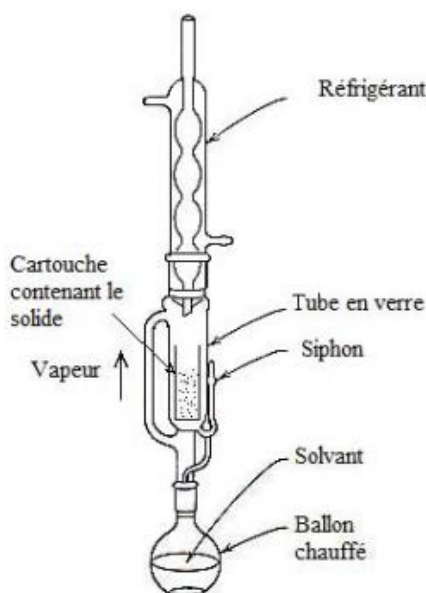


Figure 3 : Schéma d'un extracteur Soxhlet.

I.2. Caractérisation physicochimique des extraits :

I.2.1. La phytochimie et les principaux métabolites secondaires des végétaux :

La phytochimie (chimie des végétaux) est la science qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction ainsi que les méthodes d'analyse, de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes. En dehors des métabolites primaires (lipides, glucides et protéines) les métabolites secondaires sont ceux qui représentent le plus grand intérêt biologique (utilisés dans tous les domaines) et économique (présent en très faible quantité et très difficile à obtenir). Les principales familles chimiques des métabolites secondaires du

règne végétal sont les phénols, les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les saponosides et les terpènes (les composés des huiles essentielles).

Les phénols : Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, ce sont des dérivés de l'acide benzoïque et l'aide cinnamique.

Les tanins : On appelle communément « Tanins » des substances d'origine végétale, non azotées, de structure polyphénolique, soluble dans l'eau, l'alcool, l'acétone, peu soluble dans l'éther, de saveur astringente et ayant la propriété commune de tanner la peau. Leur poids moléculaire varie de 500 à 3000. Dans les plantes, les tanins existent à l'état de complexes, les tannoïdes; certains combinés à des sucres sont dénommés tanosides.

Les flavonoïdes : Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux ; Les flavonoïdes sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux. On les trouve dissoutes dans les vacuoles à l'état d'hétérosides presque toujours hydrosolubles. Ils sont responsables de la coloration des fleurs des fruits et parfois des feuilles.

Les alcaloïdes : Les alcaloïdes sont des substances d'origine biologique et le plus souvent végétale (ils sont rare dans le règne animal), des substances azotées, à réactions alcalines (Alcaloïde + Acide Sels). Leurs noms se terminent souvent par "ine". Les alcaloïdes renferment toujours du carbone, de l'hydrogène et de l'azote ; Et le plus souvent, en plus de l'oxygène (exceptionnellement quelques alcaloïdes contiennent du soufre). Les alcaloïdes donc sont des produits aminés naturels qui ont des effets physiologiques sur l'organisme humain.

Les saponosides : Les saponines sont généralement connus comme des composés non-volatils, tensio-actifs qui sont principalement distribués dans le règne végétal. Le nom «saponine» est dérivé du mot latin sapo, qui signifie «savon». En effet, les molécules de saponines dans l'eau forment une solution moussante.

Les terpènes (les composés des huiles essentielles) : Le nombre des composants isolés au sein des huiles essentielles est d'environ un millier et il en reste encore beaucoup à découvrir (Sparkman, 2005). Ces constituants sont surtout des carbures terpéniques et leurs dérivés d'oxydation, des dérivés aromatiques et des dérivés divers provenant de glucosides.

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou non (acyclique, monocyclique, bicyclique ou tricyclique). Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C₅H₈). Ils comprennent:

- Les monoterpènes. (C₁₀).
- Les sesquiterpènes. (C₁₅).
- Les diterpènes. (C₂₀).
- Les triterpènes. (C₃₀).
- Les tetraterpènes. (C₄₀).
- Les polyterpènes. (> C₄₀).

I.2.2. Détermination de la composition chimique d'un extrait de plante :

La détermination de la composition chimique qualitative et quantitative peut être évaluée par des dosages physicochimiques comme le dosage des polyphénols par le réactif de Folin–Ciocalteu (Ainsworth & Gillespie, 2007), le dosage des flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium (Petry et al., 2001) ou encore le dosage des tanins par la précipitation à la caséine (Mercurio & Smith, 2008) mais les techniques chromatographiques analytiques restent les plus précises soit par l'utilisation des standards dans des équipement de chromatographie analytique simple (HPLC ou CPG) ou encore par l'utilisation de techniques analytiques très avancées comme le couplage chromatographie-spectrométrie de masse (GC/MS et la LC/MS/MS).

GC/MS pour les composés volatiles :

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (en anglais Gas chromatography-mass spectrometry ou GC-MS) est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon d'huile essentielle, et de la spectrométrie de masse, pour la détection et l'identification des différents composés constituant cette huile essentielle en fonction de leur rapport masse sur charge ce qui offre une grande précision à cet équipement d'où la détection des composés en très petites quantités, voir en traces.

LC/MS/MS pour les composés non-volatiles :

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (en anglais Liquid chromatography-mass spectrometry ou LC-MS) est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances. Une unité LC-MS-MS est composée de deux blocs principaux : un chromatographe en phase liquide muni d'un détecteur de spectromètre de masse qui est un spectromètre de masse proprement dit relié par couplage. Au contraire du couplage simple, le couplage LC/MC/MC double permet l'identification due après une comparaison à la base de données déjà existante mais aussi d'obtenir le spectre de masse exacte des molécules analysées (d'où cette grande précision).

I.2.3. Isolation, purification et résolution structurale d'une molécule à partir d'un extrait :

Après l'analyse qualitative et quantitative des extraits de plantes, une étude plus approfondie peut être réalisée pour l'isolation de chaque molécule contenue dans l'extrait (par chromatographie préparative), sa purification (par une installation chromatographique de purification) et la détermination de sa structure chimique d'une manière précise et irrévocable (par RMN et DRX-MC). Cette étude a deux buts principaux, Le premier est scientifique qui est la détermination des activités biologiques relatives à chaque molécule isolée par rapport à l'extrait totale ainsi que la détermination d'éventuelles synergies entre ces différents constituants, le deuxième but est purement économique qui est la capacité de déposer un brevet d'invention et de s'approprier tous les droits vis-à-vis de ces molécules (le brevet d'un extrait n'est pas valide comparé à une substance ayant une structure bien définie).

La chromatographie préparative :

La chromatographie préparative est une chromatographie utilisée pour purifier et récupérer des échantillons, que ce soit après une synthèse organique ou une étape d'extraction. Les échantillons récupérés seront ensuite identifiés par des méthodes d'analyse telles que la RMN ou la spectrométrie de masse. Ils pourront aussi être utilisés pour des applications telles que des tests cliniques dans le cas de principes actifs de médicaments (Caude & Jardy, 1996).

La résolution structurale par RMN ou DRX-MC :

La spectroscopie RMN est une technique qui exploite les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. Elle est basée sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire (Shampo & Kyle, 1997 et le prix Nobel de physique 1952). Elle est utilisée pour la

détermination des structures des molécules organiques. La diffraction des rayons x sur monocristal (DRX-MC) est une technique utilisée pour la détermination structurale des molécules ayant des structures très complexes et n'ayant pas pu être résolues par RMN en étudiant les mailles de ces dernières.

I.3. Caractérisation pharmaco-toxicologique des molécules bioactives :

I.3.1. Etude de la toxicité : aigue, subaiguë et chronique :

La toxicité aiguë :

Est la toxicité induite par l'administration d'une dose unique et massive d'un produit toxique, décrite comme la dose qui risque à 50 % de tuer un être vivant. Elle est parfois notée LD50, de l'anglais Lethal Dose 50 %.

Toxicité subaiguë :

Toxicité réitérée pendant au maximum 28 jours. L'intoxication subaiguë correspond à des expositions fréquentes et répétées sur une période de plusieurs jours ou semaines pour que les symptômes d'intoxication apparaissent.

• Toxicité subchronique :

Toxicité réitérée pendant plus de 28 jours et moins de 90 jours.

• Toxicité chronique :

Toxicité réitérée pendant plus de 90 jours. Dans le cas d'une intoxication chronique, les expositions sont répétées sur de longues périodes, la manifestation de l'intoxication dépend soit du poison qui s'accumule, soit des effets engendrés qui s'additionnent.

I.3.2. Le criblage pharmacologique :

L'expression de criblage ou criblage à haut débit (high-throughput screening, HTS) désigne dans le domaine de la pharmacologie, de la biochimie, de la génomique et de la protéomique, les techniques visant à étudier et à identifier dans les chimiothèques et ciblothèques, des molécules aux propriétés nouvelles, biologiquement actives.

L'expression haut débit évoque ici l'utilisation de la robotique, de l'informatique et de la bio-informatique pour accélérer la phase de test des molécules, protéines, catalyseurs, etc. En vue du processus de production des matériaux, médicaments, etc. Le criblage à haut débit s'appuie

sur la bio-informatique, la génomique, la protéomique, la robotique, et parfois les nanotechnologies, etc.

I.4. Etat de l'art sur la phytochimie et la pharmacologie de *Pistacia lentiscus* :

Dans le but d'orienter notre synthèse bibliographique vers les expérimentations qui seront effectuées plus tard dans ce travail, un état de l'art sur la phytochimie et la pharmacologie de *Pistacia lentiscus* a été mis au point.

I.4.1. Données botaniques sur *Pistacia Lentiscus* :



Figure 4 : Photographie des feuilles et fruits de *Pistacia Lentiscus*.

L'Arbre au mastic, ou Pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.) est un arbuste poussant dans les garrigues et les maquis des climats méditerranéens. Plante de la famille des Anacardiaceae à feuillage persistant et qui donne des fruits d'abord rouges puis noirs.

La phytochimie et la pharmacologie de *pistacia lentiscus* ont été décrites par le seul et unique article de revue «Review article» publié sur cette plante en 2012 qui englobe les plus importants travaux réalisés auparavant (**Nahida & Siddiqui, 2012**). Mais actuellement ce travail ne représente plus une référence concernant cette étude car le nombre de travaux publiés après cet article de revue est très important. Une synthèse bibliographique détaillée (ce qui a été décrit par Nahida & Siddiqui en 2012 suivi des travaux réalisés en 2012 à ce jour) est présentée dans la suite de ce chapitre et dans les annexes 2 et 3.

I.4.2. Phytochimie de *Pistacia lentiscus* :

L'étude phytochimique de *pistacia lentiscus* a suscité l'intérêt des chercheurs depuis les années quatre-vingts, les extraits volatiles et non-volatiles des différentes parties de la plante ont été étudiés en ayant recours aux dosages physico-chimiques simples, la chromatographie,

la chromatographie couplé a la spectrométrie de masse ainsi que l'isolation et la résolution structurale de quelques composés d'intérêt thérapeutique très important.

I.4.2. 1. Composés volatils (composition chimique de l'huile essentielle) :

Les analyses qualitatives et quantitatives des huiles essentielles sont réalisées par deux méthodes, soit par chromatographie en phase gazeuse (CPG) en utilisant des standards ou encore par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) en utilisant une série d'alcane.

Branches : Les composés majoritaires de l'huile essentielle des branches de Pistacia Lentiscus sont le myrcene , germacrene D et E-caryophyllene (**Magiatis et al., 1999**).

Mastic: Le composé majoritaire de l'huile essentielle du mastic de Pistacia Lentiscus est l' α -pinene (**Magiatis et al., 1999**), d'autres composés comme le myrcene, limonene et caryophyllene peuvent être présent (**Koutsoudaki et al., 2005**).

Feuilles: C'est la partie de la plante la plus étudiée, les deux composés majoritaires sont l' α -pinene et le P-myrcene (**Boelens et al., 1991** et **WYLLIE et al., 1990**) de plus de ces deux composés certaines études ont montré un troisième composé majoritaire comme le 1.8-Cineole (**Congiu et al., 2002**), le limonene (**Koutsoudaki et al., 2005** et **Meriem et al., 2016**) ou encore p-Cymene et terpinen-4-ol (**Barra et al., 2007**). D'autres études ont montré différentes compositions, α -Pinene, γ -terpinene et terpinen-4-ol (**Djenane et al., 2011**) ; caryophyllene, germacrene D et α -cadinene (**Douissa et al., 2005**) ; a-Pinene, limonene, Terpinen-4-ol, Terpeneol, (Z)-3-Hex-1-enyl benzoate et b-Caryophyllene (**Duru et al., 2003** et **Bachrouch et al., 2015**) ; Myrcene, limonene, terpinen-4-ol, α -pinene, β -pinene, α -phellandrene, sabinene, p-cymene et γ -terpinene (**Castola et al., 2000** et **Zrira et al., 2003**) ; a-Pinene, p-Cymene, Limonene, Terpinen-4-ol and a-Terpeneol (**Gardeli et al., 2008**) ; myrcene, germacrene D, E-caryophyllene, α -cadinol and 5-cadinene (**Magiatis et al., 1999**).

I.4.2. 2. Les composés non-volatiles :

Le mastic : Une première étude a montré la présence de Cis-1, 4-poly- β -myrcene (**van den Berg et al., 1998**). En 2004, des polyphénols ont été identifié par HPLC (tyrosol, p-hydroxybenzoic acid, p-hydroxy-phenylacetic acid, vanillic acid et des traces du gallic and trans-cinnamic acids) (**Dedoussis et al., 2004**). Par la suite des Anthocyanins (**Assimopoulou et al., 2005**), des penta- et tetra- triterpene cycliques (**Longo et al., 2007**) et des Triterpenoids

(masticadienonic acid and isomasticadienonic acid) (Vuorinen et al.2015) ont été identifiés. L'étude la plus récente a abouti à l'isolation et la résolution structurale de plusieurs molécules (Moronic acid, oleanonic acid, olean-12,18-dien-3-olic acid, 24Z-masticadienonic acid, 24Z-isomasticadienonic acid) (Andreadou et al. 2016).

Huile des fruits : Cette huile végétale riche en acides gras (palmitic C16:0, oleic C18:1 and linoleic C18:2) (Charef et al., 2008 ; Trabelsi et al., 2012 et Boukeloua et al., 2016), en Sterols (β -sitosterol, cycloartenol et 24-methylene-cycloartenol) (Mezni et al., 2016), en Tocols (δ -tocopherol, α -tocopherol and δ -tocotorienol) et en phénols (protocatechuic, caffeic, syringic, gallic, p-coumaric, p-hydroxybenzoic and ferulic acids) (Daoued et al., 2016).

Les feuilles : Différents types d'extraits ont été étudiés, l'extrait aqueux a montré la présence de composés polaires qui sont les steroids-triterpenes, catechin-tannins, flavonoids, sugars, resins and saponins (Villar et al., 1987), l'extrait hexanique a montré la présence de composés apolaires comme l' α -tocopherol (Kivçak & Akay, 2005), mais l'extrait le plus étudié dans la bibliographie est l'extrait ethanologique. Les dosages physicochimiques de l'extrait ethanologique ont montré la présence de toutes les familles d'antioxydants, alkaloids, anthocyanins, leuco-anthocyanins, saponosides, coumarins, flavonoids, tannins et terpenoids (Remila et al., 2015 et Beghlal et al., 2016), flavonols et phenolic acids (Benhammou et al., 2008), plusieurs Phenols (gallic acid, catechin, syringic acid, ellagic acid, quercetin-3-O-rhamnoside, and luteolin), flavonoides (galloyl quinic acid, quercetin and kaempferol glucosides) et anthocyanins (delphinidin 3-O-glucoside et cyanidin 3-O-glucoside) ont été identifiés et quantifiés par HPLC (Romani et al., 2002 ; Vaya et al., 2006 ; Bampouli et al., 2015 ; Beghlal et al., 2016 et Mehenni et al., 2016).

Certaines études assez rares ont montré l'isolation et la résolution structurale certaines molécules composant l'extrait de feuilles de Pistacia Lentiscus comme le 1,2,3,4,6-Pentagalloylglucose (Abdelwahed et al., 2007) et le Digallic acid (Bhourri et al., 2010).

I.4.3. Pharmacologie de Pistacia lentiscus :

L' Huile essentielle : Les composés volatile de Pistacia Lentiscus ont montré plusieurs activités biologiques qui ont été mises en évidence in-vitro ou in-vivo ; Parmi ces activités, l'activité antimicrobienne (Magiatis et al., 1999 ; Koutsoudaki et al., 2005 ; Derwich et al., 2010 et Mharti et al., 2011), antioxydante (Gardeli et al., 2008 ; Bachrouch et al., 2015 ;

Beghlal et al., 2016 et Daoued et al., 2016), antifongique (Barra et al., 2007 et Duru et al., 2003), anti- *Listeria monocytogenes* CECT 935 (Djenane et al., 2011), anti-inflammatoire (Maxia et al., 2011), antiproliférative des cellules BHK21 (Mezni et al., 2015), cicatrisante (Boukeloua et al., 2016 et Djerrou et al., 2010), hépatoprotectrice (Klibet et al., 2016) mais aussi un rôle protecteur contre la toxicité induite par le méthomyl chez les rats femelles gravides (Mosbah et al., 2016) et un effet sur le cortex cérébral (Quartu et al., 2012).

Le mastic et ses différents extraits et fractions : Présente lui aussi plusieurs effets thérapeutiques, l'activité antiulcéreugénique (Al-Said et al., 1986), anti-*helicobacter pylori* (Marone et al., 2001), activité antimicrobienne (Koutsoudaki et al., 2005 et Tassou et al., 1995), activité antiproliférative des cellules cancéreuses de colon humain HCT116 (Balan et al., 2007), activité anti-athérogène (via GSH et l'ARNm CD36) (Dedoussis et al., 2004), activité anti-angiogénétique sur des cellules de leucémie humaine K562 (Loutrari et al., 2006), activité anti-athéromateuse, hypolipémisante et réduction de la taille de l'infarctus (Andreadou et al., 2016), activité inhibitrice du 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (activité antidiabétique) (Vuorinen et al., 2015) et l'activité anti-inflammatoire (Gioxi et al., 2011).

Les différents extraits des feuilles :

L'extrait aqueux des feuilles a montré une activité antimicrobienne (Iauk et al., 1996), hépatoprotectrice (Janakat et al., 2002 et Ljubuncic et al., 2005), anti-hypertension artérielle (Villar et al., 1987), inhibitrice des lipase, α -amylase, et α -glucosidase (Foddai et al., 2015) et une activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (Benamar et al., 2010).

L'extrait polaire méthanolique a montré une activité antioxydante (Gardeli et al., 2008) et l'extrait apolaire de l'éther de pétrole a montré une bonne activité antimicrobienne (Iauk et al., 1996).

L'extrait éthanolique lui aussi largement étudié a présenté une activité antimicrobienne (Iauk et al., 1996 ; Benhammou et al., 2008 et Mezni et al., 2015), antifongique (Kordali et al., 2003 et MANSOUR et al., 2012), antioxydante (Beghlal et al., 2016 et Bampouli et al., 2015), cytoprotectrice, anticancéreuse et anti-inflammatoire (Remila et al., 2015), activité antidiabétique et hépatoprotectrice (Mehenni et al., 2016).

Les études pharmacologiques sur certains Polyphénols isolés ont montré une activité antioxydante bien sûr mais aussi une activité antimutagénique (Abdelwahed et al., 2007) et antigénotoxique (Bhouri et al., 2010).

L'utilisation des molécules bioactives d'origine naturelle pour soigner les animaux est une pratique ancestrale qui existe depuis la domestication des animaux par l'homme, ces techniques ont été abandonnées à cause de l'efficacité des produits issus de synthèse sur le traitement des maladies et les caractéristiques zootechniques qui en découlent (hormones de synthèse ...), mais avec le temps l'homme s'est rendu compte que ces substances synthétiques sont responsables de plusieurs maladies humaines et animales (principalement les cancers) ce qui a provoqué l'interdiction de certaines substances par les lois protégeant la santé animale et les consommateurs et ce qui a aussi incité les thérapeutes vétérinaires à mettre en place certaines bases de la phytothérapie vétérinaire (Hammond et al., 1997 ; Wynn & Fougere, 2006) et la médecine alternative vétérinaire (Schoen & Wynn, 1998 ; Hare, 1999 ; Wynn & Marsden, 2003 et Grosmond, 2012). Les élevages dits « bio » utilisant des traitements alternatifs sont devenus une marque de vente imbattable et une charte graphique de certaines sociétés, effectivement les consommateurs sont prêts à payer le prix pour ces produits présentant plus de sécurité d'où l'intérêt des chercheurs et des grandes boîtes pharmaceutiques à ce type de traitements durant cette dernière décennie. Dans ce chapitre nous allons développer l'intérêt, les limites et donner des exemples de ces différents traitements.

II.1. Intérêt de La médecine vétérinaire alternative :

La médecine vétérinaire alternative est une partie non-négligeable dans les plans thérapeutiques actuels, d'un point de vue économique elle est moins coûteuse et plus accessible pour les éleveurs et d'un point de vue sanitaire cette médecine est la plus sûre pour les animaux (les effets indésirables sont très rares voire inexistants), pour les consommateurs (aucun délais d'attente pour l'abattage ou encore la consommation du lait, des œufs ...) et plus important aussi la remédiation à un problème sanitaire majeur qui est la résistance microbienne (les microorganismes ne développent pas de résistances aux molécules bioactives d'origine naturelle à cause de la diversité des familles de molécules et des pharmacophores présents dans un même traitement).

II.2. Exemples de médicaments naturels à usage vétérinaire commercialisés :

La plus part des médicaments naturels à usage vétérinaires sont préparés par les vétérinaires dans leurs cabinets ou in-situ (les méthodes de macération de décoction ou d'infusion sont souvent privilégiées par rapport à leur facilité, leur faible coût et leur bon rendement), mais malheureusement la politique économique fait son possible pour éviter ces pratiques afin de

soutenir les grandes boîtes pharmaceutiques ayant des AMM pour ce type de produits (en mars 2013, un règlement de l'Union Européenne retire du marché de l'alimentation animale plus de 250 huiles essentielles et oblige les vétérinaires à ne pas commercialiser leurs préparations sans AMM). Le tableau ci-dessous présente quelques compléments alimentaires et médicaments à usage vétérinaire à base de principes actifs naturels.

Tableau 1 : Compléments alimentaires et médicaments à usage vétérinaire à base de principes actifs naturels.

Nom commercial	Substance active	Laboratoire	Utilisation thérapeutique
EPILEPTYL	D'origine végétal : <i>Cicuta Virosa</i> , <i>Veratrum viride</i> , <i>Coriaria myrtifolia</i> et <i>Ceanothe crocata</i> . D'origine animal : <i>Rana bufo</i> . D'origine minéral : cuivre.	BOIRON	utilisé dans les troubles d'origine épileptique des chiens et des chats.
ABCEDYL	<i>Calcarea sulfurica</i> , <i>Echinacea angustifolia</i> , <i>Hepar sulfur</i> , <i>Pyrogenium</i> , <i>Myristica sebifera</i> .	BOIRON	traitement des affections cutanées suppuratives. (chiens et chats)
HÉPATYL	<i>Taraxacum dens leonis</i> , <i>Chelidonium majus</i> , <i>Carduus marianus</i> , <i>Cynara scolymus</i> , <i>Hydrastis canadensis</i> , <i>Lycopodium clavatum</i> , <i>Solidago virga aurea</i> , <i>Berberis vulgaris</i> , <i>Sulfur</i> .	BOIRON	draineur hépatique et en soutien de la fonction hépatique chez le chat et le chien.
WOMBYL PA	<i>Actaea racemosa</i> et <i>Aletris farinosa</i>	BOIRON	faciliter la mise-bas
VERRUSYL	<i>Thuja occidentalis</i> , <i>Antimonium crudum</i> .	BOIRON	contre les verrues
Hipposil	silicium organique, <i>Harpagophytum</i> et spiruline.	demeter	Arthrose du cheval
Labodem Piel	l'huile de Haarlem et extraits d'artichaut.	demeter	dermatoses, démangeaisons et chute de poil
Hippo Haarlem	Soufre, du Magnésium, du Silicium organique et de la flore probiotique.	demeter	Allergies cutanées, problèmes de peau et de poil, stimule la

			pousse de la corne.
Siladog	Silicium organique, collagène marin, l'acide hyaluronique, l'Aloe Vera et les extraits d'algue	demeter	les articulations douloureuses, les mastoses et les mammites.
Dermoscent 	extrait fleurs de chanvre, Extraits de neem et d'ajowan, Huile végétale de chanvre et de tamanu, Huile essentielles de sarriette, de palmarosa, de lavandin et d'eucalyptus citronné.	Zootech	infections cutanées
POCENE	Extraits de Margos	DEMAVIC	(Rongeur) contre la gale, la teigne.

Malgré le nombre très important des médicaments à base de substances naturelles, les propriétaires et certains éleveurs préfèrent préparer eux même certains traitements à effets thérapeutiques ou préventifs, et pour cela différentes institutions universitaires vétérinaires dans le monde propose des cours et des formations pour les éleveurs, propriétaires et même les vétérinaires cliniciens ; parmi ces écoles, de prestigieuses institutions comme l'université de Californie Davis au USA et l'Académie Vétérinaire d'Acupuncture et d'Ostéopathie en France.

II.3. Les limites et les inconvénient de l'utilisation de ces produits :

Ces produits présentent deux principaux inconvénients, le premier est leur durée de conservation très courte (les délais entre les dates de production et de péremptions sont très proches), le deuxième est leur packaging très couteux (utilisation des matières isolantes qui peuvent couter encore plus chère que le médicament lui-même dans certains cas). Ces inconvénients sont tout simplement dus aux propriétés physicochimiques de ces substances qui sont sensibles à l'oxygène de l'air, au rayons lumineux (UV), à la température et à l'humidité ; tous ces facteurs favorisent l'oxydation des extraits mais plus important encore transforment le plus grand atout de ces médicaments en un inconvénient, effectivement ces facteurs catalysent les réactions chimiques entre les différentes molécules composant l'extrait entre elles jusqu'à la disparition des tous les pharmacophores voir la productions de substances toxiques.

Dans ce chapitre nous allons nous intéresser à la nanotechnologie et ces applications dans le domaine pharmaceutique afin de proposer une solution pour résoudre le problème d'instabilité des molécules bioactives d'origine naturelle qui a été exposé à la fin du chapitre précédant.

III.1. La nanotechnologie un défi pour la science :

La nanotechnologie regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de nanoparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active (**Loscertales et al., 2002**). Les nanoparticules présentent une taille comprise entre 1 nm et 1 μ m et contiennent typiquement entre 5 et 90 % (en masse) de matière active (**Sari^a et al., 2014**). Les **matières actives** sont d'origines très variées : principes actifs pharmaceutiques, actifs cosmétiques, additifs alimentaires, produits phytosanitaires, essences parfumées, micro-organismes ou encore des cellules (**Sari^a et al., 2014 ; Sari^b et al., 2014 ; Cho & Park, 2003 et Abreu et al., 2012**). Les **matériaux enrobants** sont des polymères d'origine naturelle ou synthétique, ou des lipides. Les nanoparticules obtenues présentent deux types de morphologies : soit une **nanocapsule**, c'est-à-dire une particule réservoir constituée d'un cœur de matière active liquide (plus ou moins visqueux) ou solide, entouré d'une **membrane solide** continue de **matériau enrobant** (**figure III.1**) ; soit une **nanosphère**, c'est-à-dire une particule constituée d'un réseau macromoléculaire ou lipidique continu formant une **matrice** dans laquelle se trouve finement dispersée la matière active, à l'état de molécules, de fines particules solides ou encore de gouttelettes de solutions (**figure III.1**).

Sur le plan industriel, la nanoencapsulation est mise en œuvre pour remplir les objectifs suivants : assurer la protection, la compatibilité et la stabilisation d'une matière active dans une formulation ; réaliser une mise en forme adaptée ; améliorer la présentation d'un produit ; masquer un goût ou une odeur ; modifier et maîtriser le profil de libération d'une matière active pour obtenir, par exemple, un effet prolongé ou déclenché.

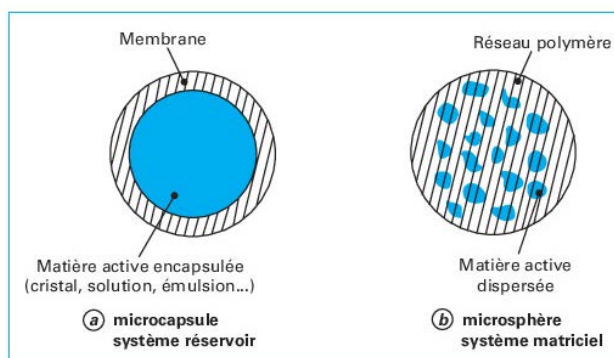


Figure III.1 : Morphologie des nanoparticules

III.2. Les Micro/Nanosystèmes pour la vectorisation des médicaments.

Lorsque l'on considère les interactions matière active/milieu extérieur, les microparticules peuvent être classées en deux catégories : celles qui ne doivent pas libérer leur contenu telles que les **microréacteurs** contenant des enzymes ou des bactéries, et celles qui sont formulées de façon à libérer la matière active encapsulée (**Wang et al., 2007**). Dans ce dernier cas, il faut distinguer les systèmes à **libération déclenchée** des systèmes à **libération prolongée** (figure III.2).

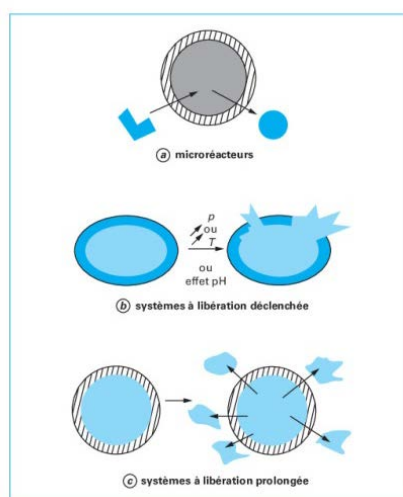


Figure III.2 : Microréacteurs et systèmes à libération déclenchée et prolongée.

– Les systèmes à **libération déclenchée** sont généralement des microcapsules formées d'une membrane étanche, qui vont libérer brutalement leur contenu par éclatement sous l'effet d'une pression (mécanique ou osmotique) ou par fusion sous l'effet de la température.

De nombreux exemples de systèmes sensibles à la pression se rencontrent dans les domaines de la papeterie et de la visserie.

– Les systèmes à **libération prolongée** se distinguent les uns des autres par les mécanismes de libération mis en jeu (diffusion passive, dégradation/dissolution du matériau enrobant, échange d'ions...) et par leur structure (microcapsule ou microsphère) qui va directement influencer sur la cinétique de libération résultante. Ainsi, pour des microparticules libérant leur contenu selon un mécanisme de diffusion passive à travers le matériau enrobant (lois de Fick), les profils de libération peuvent être très différents (figure III.3).

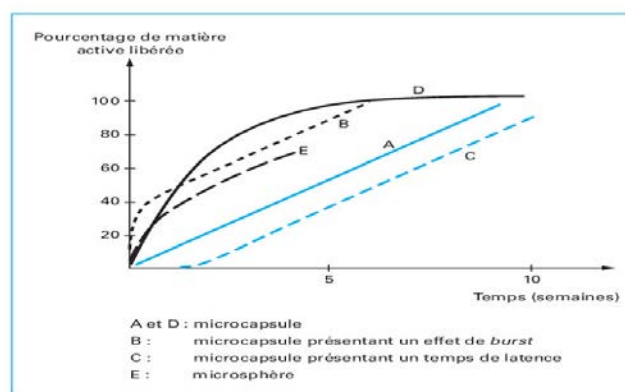


Figure III.3 : Profils de libération obtenus à partir de différents types de microparticules

À partir de microcapsules, on peut obtenir des cinétiques de libération d'ordre 0 (profil A) ou d'ordre 1 (profil D), en fonction de la solubilité dans l'eau de la matière active.

Les cinétiques d'ordre 0 peuvent être modifiées dans leur phase initiale : soit la vitesse de libération est exagérément marquée (*burst effect*) en raison de la présence d'un excès de matière active dans la membrane (profil B), soit un temps de latence précède la libération, temps nécessaire par exemple pour que le principe actif diffuse à travers la membrane, avant d'atteindre le milieu extérieur (profil C).

À partir de microsphères, le phénomène de diffusion de la molécule active à travers une matrice est décrit par une cinétique obéissant à la loi d'Higuchi (profil E). Dans sa forme simplifiée (modèle planaire), la loi d'Higuchi montre que la quantité libérée de matière active est directement proportionnelle à la racine carrée du temps.

III.3. Effets des Micro/Nanosystèmes sur les effets thérapeutiques d'un médicament :

L'effet des Micro/Nanosystèmes sur la vectorisation des médicaments influence leurs libérations et leurs cinétiques de dissolutions in-vitro (comme ça a été expliqué dans le paragraphe III.2) donc influence inévitablement leurs biodisponibilités in-vivo. Cette logique a été démontrée dans plusieurs études, l'augmentation de l'activité antidiabétique du glimepiride après son encapsulation dans les cyclodextrines (Ammar et al., 2006), augmentation de l'activité anti-inflammatoire du piroxicam après son encapsulation dans des microsphères de polycarbonates (Joseph et al., 2002), augmentation de l'activité hypocholestérolémiante de l'atorvastatine après sa nanoencapsulation (Kim et al., 2008) ou encore l'augmentation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles après leur nanoencapsulation (Donsi et al., 2011).

De très nombreuses espèces de champignons ou levures microscopiques peuvent se révéler pathogènes pour les animaux et l'homme dans certaines conditions. Les principales mycoses sont les candidoses (dus à des champignons du genre *Candida*, qui affectent la peau et les muqueuses) et les dermatophytoses qui peuvent affecter la peau, les ongles et les cheveux. Ce chapitre structuré en quatre parties, dédiées aux quatre principales mycoses, dues à *Microsporum canis*, à *Microsporum gypseum*, à *Candida albicans* (candidose aviaire) et à *Aspergillus fumigatus* (mammites aspergillaires des ruminants).

IV.1. Les mycoses dues à *microsporum canis* :

Microsporum canis est responsable de plus de 90 % des cas de teignes chez le chien et le chat. Il contamine facilement l'enfant.

IV.1.1. Etude microbiologique de *microsporum canis* :

Description : Le genre *Microsporum* est caractérisé par la présence de macroconidies à paroi épaisse et rugueuse ou présentant des aspérités, de forme variable ; globuleuse à cylindrique. Les microconidies souvent présentes sont allongées (2 à 3 µm sur 4 à 6 µm) (figure IV.1).



Figure IV.1 : Microphotographie de *microsporum canis*.

Habitat : Dermatophyte cosmopolite zoophile. Présent chez le chat et le chien, (le chat est souvent porteur sain de spores). Il a été retrouvé aussi chez le lapin, le hamster, le lion.

Pouvoir pathogène : Il contamine facilement l'être humain, ces teignes sont fréquentes chez l'enfant. Il donne des épidermophyties circinées parfois très nombreuses, bien dessinées, des teignes tondantes à grandes plaques d'alopécie (2 à 3 plaques maximum) (Figure IV.2).



Figure IV.2 : Lésions de teigne sur le tronc d'un chien.

IV.1.2. Diagnostic des mycoses à *Microsporum canis* :

Lumière de Wood :

L'examen du pelage sous lampe de Wood (Figure IV.3) est une première approche qui peut être utile pour le dépistage des chiens ou des chats infectés par *M. canis*. Sous lampe de Wood, les poils infectés par *M. canis* émettent une fluorescence verte. Le test de la lumière de Wood bénéficie d'une assez bonne valeur prédictive positive. En revanche, la valeur prédictive négative est très faible. Les poils infectés par d'autres espèces de dermatophytes (*T. mentagrophytes*, *M. gypseum*) ne sont pas fluorescents. Par ailleurs, l'application de certains topiques peut faire disparaître la fluorescence des poils. Par conséquent, un test négatif à la lampe de Wood ne suffit pas à exclure l'hypothèse de dermatophytose.



Figure IV.3 : Lampe de Wood.

Microscopie :

L'examen microscopique de poils demeure l'examen diagnostique de référence. Les poils infectés par un dermatophyte ont perdu leur rigidité ; ils ont un aspect fibreux et sont classiquement recouverts des spores fongiques réfringentes, disposés en manchon ou en chaînettes (Figure IV.4). L'examen direct nécessite cependant une certaine expérience dans la reconnaissance des éléments fongiques et ne préjuge pas de l'espèce de dermatophyte en cause.



Figure IV.4 : Spores de *Microsporum canis* en manchon autour d'un poil (microscopie optique).

Culture :

La culture mycologique demeure la seule technique permettant l'identification de l'espèce de dermatophyte. La culture est utile pour confirmer l'infection par un dermatophyte mais aussi pour détecter les animaux porteurs asymptomatiques. Le prélèvement se fait soit par raclage cutané soit par

brossage du pelage de l'animal avec une brosse à dents stérile ou un morceau de moquette stérile. La culture est rapide sur Sabouraud avec et sans Actidione (25°C à 30°C) souvent caractéristique, la culture pousse rapidement en 6 jours (Figure IV.5).

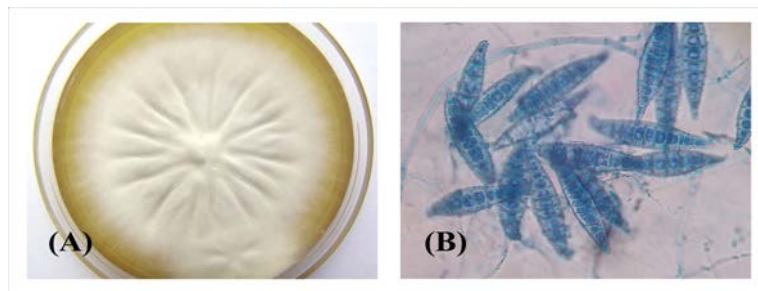


Figure IV.5 : Diagnostic de *M. canis* par culture. (A) une culture de *M. canis* de 12 jours sur le milieu Sabouraud, (B) microphotographie du *M. canis* cultivé.

- **Morphologie des colonies:**

Recto: Jaune à orange, surface duveteuse. Verso: Jaune à orange.

- **Microscopie:**

Les micronidies: sont piriformes, peu abondantes et disposées en acladium.

Les macroconidies: sont très nombreuses, uselées, échinulées, ont des parois épaisses et contiennent en général au moins sept logettes.

IV.1.3. Traitement des mycoses à *Microsporum canis* :

Les dermatophytoses peuvent guérir cliniquement spontanément chez le chat en 4 mois environ (Deboer et Moriello, 1995) et chez le jeune chien en à peu près 2 mois (Medleau et Chalmers, 1992a). Cela est probablement dû au développement d'une réponse immune efficace (Sparkes et al., 1996). Cependant, le traitement est nécessaire dans la plupart des cas pour des raisons éthiques évidentes et, également, pour prévenir une contagion humaine (Carlottid., 2002). (Tableau IV.1, et Tableau IV.2, voir en Annexes)

Traitements topiques :

Une étude in vitro (White-Weithers et Medleau, 1995) a permis de comparer l'efficacité de divers produits pour baignation (chlorhexidine à 2 %, lime sulfur c'est-à-dire polysulfure de chaux, captan, povidone iodine, eau de Javel, énilconazole). L'étude a également été effectuée avec un shampoing au kétoconazole. Des chaussettes de nylon contenant un mélange de poils infectés d'origine canine et féline ont été trempées dans les solutions ou lavées avec le shampoing au kétoconazole 2 fois par semaine. Le lime sulfur et l'énilconazole ont donné les meilleurs résultats en inhibant rapidement (2 traitements) la culture sur milieu DTM. La chlorhexidine et la povidone iodine ont été tout aussi efficaces mais seulement après 4 traitements. Le shampoing au kétoconazole et l'eau de Javel ont été efficaces après 8

traitements et le captan n'a pas pu aboutir à la négativation des cultures. Les 2 ou 4 premiers produits doivent donc être choisis pour un traitement topique. L'énilconazole, très efficace sur *M. canis*, est légalement autorisé pour le traitement topique antifongique chez le chien et est vraiment sans danger chez le chat selon deux études (**De Jaham et al., 1998 ; Hnilica et Medleau, 2002**), bien que des cas extrêmement rares de mort subite aient été mentionnés dans la littérature (**Moriello et DeBoer, 1995b**). Les auteurs utilisent ce produit depuis des années dans cette espèce sans avoir observé d'effet secondaire. L'énilconazole seul, sans traitement systémique, peut aboutir à une guérison clinique et mycologique dans certains cas, mais des rechutes peuvent survenir (**Hnilica et Medleau, 2002**).

Traitement antifongique systémique :

Les agents antifongiques systémiques utilisés pour traiter les dermatophytoses sont la griséofulvine, le kétoconazole, l'itraconazole et la terbinafine (tableau IV.2, voir en annexes). Dans une étude in vitro, la sensibilité de souches de *M. canis* isolées à partir de chats a été de 88,8 % vis-à-vis de la griséofulvine et de 50,7 % vis-à-vis du kétoconazole (**Puccini, et al., 1992**). La méthodologie de cette étude est toutefois contestable et il est fréquent que les résistances aux azolés observées in vitro ne se vérifient pas in vivo.

IV.2. Les mycoses dues à *Microsporum gypseum* :

IV.2.1. Etude microbiologique de *Microsporum gypseum*:

Microsporum gypseum est un dermatophyte du sol-associé et connu pour infecter les couches mortes supérieures de la peau des mammifères (**Rippon., 1988**). L'espèce est géophile, abondante dans le sol et peut être isolée dans le monde entier; elle est d'une large distribution mondiale (**Rippon., 1988 ; Howard., 2003 et Kwon-Chung.& Bennett., 1992**) [1] [4] [5]. Cependant, le dermatophyte est rare au États-Unis, Royaume-Uni et l'Allemagne, mais commun en Amérique du Sud (**Kane., 1997**) Il est défini comme une cosmopolite ou limitée aux régions à Certains graphiques. (**Kwon-Chung. & Bennett., 1992 ; DiSalvo., 1983 ; Ranganathan., 2000 et Chmel, & Buchvald., 1970**) [5] [9] [10] [11]. *M gypseum* est kératinophile et est connu pour causer des maladies sur la peau des animaux et des humains (**Barron., 1983**). Les mécanismes physiopathologiques associés aux *M gypseum* sont dus à la présence de substances à la surface des champignons, ou des substances libérées par les champignons (**Singh., 2011**) ; Ceux-ci peuvent inclure des adhésines de surface et des enzymes tels que les protéases, peptidases et DNase, et lipases (**Singh., 2011**). Les protéases extracellulaires libérées aident le champignon à envahir la barrière de la peau de l'hôte (kératine riche) avec la présence de kératinase (Augmente l'activité kératinolytique). (**Singh., 2011**). Ils utilisent ensuite les protéases pour améliorer leur survie par voie chimique ou physique modification de l'environnement à leur avantage en digérant les protéines de l'hôte.

IV.2.2. Diagnostic des mycoses à *Microsporum gypseum*:

Symptômes : Les dermatophytes envahissent en général les follicules pileux et la couche cornée de l'épiderme où ils se multiplient. L'inflammation cutanée et la fragilisation des poils sont à l'origine de l'apparition de zones dépilées (Figure IV.6). Toutes les parties du corps peuvent être atteintes, mais les lésions sont souvent mises en évidence sur la face, les oreilles et les membres antérieurs.

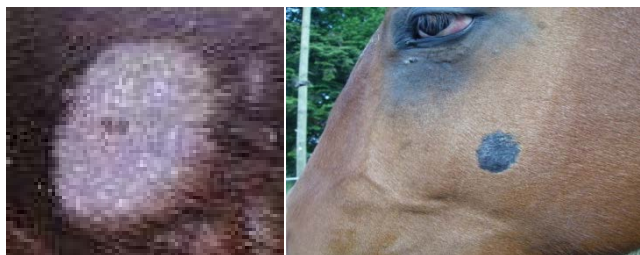


Figure IV.6 : Lésions de teigne à *M. gypseum* sur le tronc d'un chien (gauche) et la tête d'un cheval (droite).

Diagnostic : Le diagnostic peut être réalisé par microscopie : vérifié la présence des dermatophytes sur les poiles. L'espèce est vérifiée par la culture (figure IV.7). La culture est rapide sur Sabouraud avec et sans Actidione (25 à 30 °C) souvent caractéristique, la culture pousse rapidement en 4 à 5 jours.

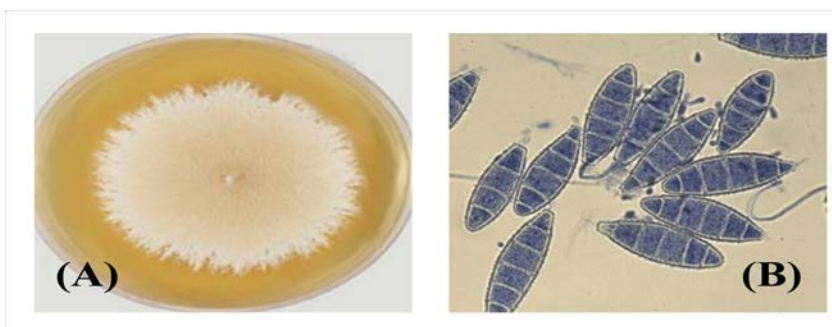


Figure IV.7 : Diagnostic de *M. gypseum* par culture. (A) une culture de *M. gypseum* de 12 jours sur le milieu Sabouraud, (B) microphotographie du *M. gypseum* cultivé.

• Morphologie des colonies:

Recto: Beige, surface poudreuse à granuleuse. Verso: Beige.

• Microscopie:

Les micronidies: sont piriformes, abondantes et disposées en acladium.

Les macroconidies: sont extrêmement nombreuses, elliptiques et ont une paroi assez mince et échinulée. Elles contiennent moins de six logettes.

IV.2.3. Traitement des mycoses à *Microsporum gypseum*:

C'est le même traitement que pour *M. canis*, décrit dans la section (IV.1.3).

IV.3. Les mycoses dues à *Candida albicans* : (candidose aviaire)

IV.3.1. Etude microbiologique de *Candida albicans*:

Agent pathogène : *Candida albicans*, levure ovoïde (McClary., 1952) qui se multiplie par bourgeonnement et peut émettre des filaments pseudo-mycéliens (Enfert., & Hube., 2007) (Figure IV.8). Elle est un hôte normal de la flore intestinale des oiseaux et des mammifères présent en petite quantité (McClary., 1952).

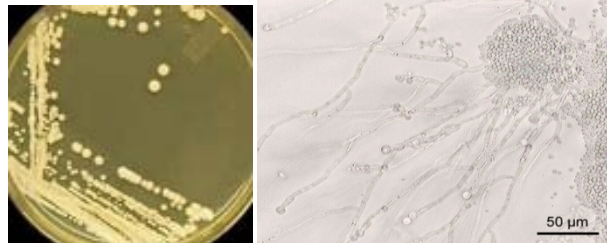


Figure IV.8 : *Candida albicans*. Culture de *candida albicans* (gauche) et Microphotographie de *Candida albicans* (droite).

Epidémiologie :

- Espèces cibles : Zoonose affectant surtout les oiseaux (en particulier palmipèdes, pintades).
- Facteurs de réceptivité : oiseaux débilisés, affections digestives, mauvaise hygiène ou mauvaise gestion d'antibiothérapie.
- Réservoirs : organisme ubiquitaire, présent dans l'intestin. En cas de déséquilibre de la flore, prolifération de la levure dans l'intestin et élimination dans le milieu extérieur (litière, eau, aliment).
- Transmission: Oro-fécale (nourriture/eau contaminée par les fèces d'animaux infectés).

Pathogénie :

Déséquilibre de la flore intestinale > Prolifération intestinale de la levure > Rejet dans le milieu extérieur > Contamination eau, litière, aliment > Ingestion > développement dans la muqueuse du jabot > Dysplasie de la muqueuse voire lésions nécrotiques et hémorragiques du jabot > Douleur > Anorexie, adipsie.

IV.3.2. Diagnostic des mycoses a *Candida albicans*:

Symptômes : Peut passer inaperçue dans les cas bénins. Dans les cas aigus : anorexie, adipsie (ingestion douloureuse), apathie. Croissance ralentie, hétérogénéité du lot. Jusqu'à 70% de mortalité.

Lésions : Enduit blanchâtre (allure de lait caillé) à jaunâtre, plus ou moins adhérent aux muqueuses de la cavité buccale, de l'œsophage et du jabot (parfois du proventricule), quelquefois associé à des lésions nécrotiques et hémorragiques. Le jabot est l'organe le plus affecté : muqueuse épaissie formant de nombreux replis.



Figure IV.9 : Jabot isolé de pintades de Numidie recouvert de *Candida* sp. Hyperplasie, inflammation et replis muqueux anormaux.

Diagnostic :

Clinique : Peu aisé, aucun symptôme pathognomonique. **Nécropsique :** Très évocateur (enduit blanchâtre tapissant le jabot). **De laboratoire :** Examen direct de frottis, histologie ou culture. **Prélèvement :** Frottis d'œsophage ou jabot et observation microscopique direct ou histologie/culture de la muqueuse de ces mêmes organes.

IV.3.3. Traitement des mycoses à *Candida albicans*:

Historiquement, la nystatine était utilisée comme traitement de choix des candidoses digestives chez l'oiseau : action antifongique digestive locale. Innocuité relativement bonne. (Nystatine : 3 000 U = 1 mg) . Dans les cas de candidose profonde: traitement oral à base de nystatine peut être insuffisant. Recours possible à des antifongiques systémiques : kétoconazole ou fluconazole (réservée aux candidoses sévères)(Tableau IV.3., voir en annexes)

IV.4. Les mycoses dues à *Aspergillus fumigatus*: (mammmites aspergillaires des ruminants)

Les mammmites à champignons sont imputables à 4 genres : *Candida* (*krusei*, *albicans*, *rugosa*, *tropicalis*, *pseudotropicalis*, *kefir*), *Trichosporon* spp., *Aspergillus* spp. et *Cryptococcus* (*neoformans*, *lactativirus*). Les champignons sont ubiquistes dans l'environnement. Certains aliments de la ration tels les pulpes fraîches de sucreries (*Candida krusei*) peuvent en renfermer de grandes quantités.

IV.4.1. Etude microbiologique d'*Aspergillus fumigatus*:

Aspergillus fumigatus est responsable d'infections sévères chez l'homme ou chez l'oiseau (Abad et al., 2010). Il s'agit d'un champignon filamenteux saprophyte ubiquiste. Le champignon est filamenteux, de type moisissure, dont la colonie se présente sous forme duveteuse. Le thalle, hyalin, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Abad et al., 2010).

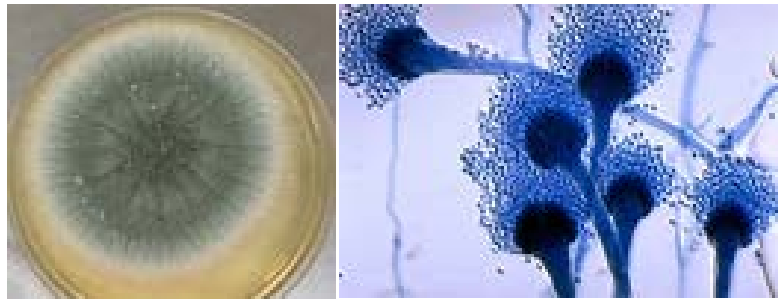


Figure IV.10 : *Aspergillus fumigatus*. Culture d'*Aspergillus fumigatus* (gauche) et Microphotographie d'*Aspergillus fumigatus* (droite).

Transmission : La contamination se fait par l'environnement, la porte d'entrée du champignon étant le trayon. L'agent pathogène est inoculé dans la mamelle à l'occasion d'un traitement intramammaire réalisé dans des conditions d'hygiène médiocre. La présence d'antibiotiques dans ces traitements inhibe la croissance bactérienne ce qui favorise celle du champignon. Le champignon est ensuite dispersé dans le reste de l'organisme par voie hématogène.

Filières affectées : La forme mammaire de l'aspergillose touche principalement les brebis laitières car elle est directement liée à l'administration d'un traitement au tarissement (L'apparition de mammites à champignons présuppose une infection bactérienne préexistante, un traitement antibiotique préalable et un nombre important de germes.).

Incubation : Les mammites se déclenchent un à plusieurs jours après le part, et dans quelques cas juste avant ce dernier. L'infection est aisée et apparaît en moyenne 4 à 10 jours après la contamination. Les infections à champignons sont à suspecter lorsque les traitements intramammaires apparaissent inopérants ou ont été effectués sans avoir respecté les mesures d'hygiène habituelles.

IV.4.2. Diagnostic des mycoses à *Aspergillus fumigatus*:

L'infection par un *Aspergillus* se traduit par l'apparition de multiples abcès dans le tissu mammaire. Ceux-ci s'entourent de tissu de granulation.



Figure IV.11 : Mammites aspergillaires d'une brebis.

Symptômes : Les individus touchés déclenchent un syndrome fébrile accompagné de perte d'appétit, de dépression, perte de poids et d'induration mammaire. Le décès est fréquent en l'absence de traitement (**Aller Gancedo et al., 2000**). L'aspergillose occasionne des lésions pulmonaires, hépatiques, rénales, mammaires et des avortements. Les reins sont parsemés de multiples foyers nécrotiques pâles et hémorragiques correspondant à des infarctus rénaux, accompagnés d'une néphrite interstitielle. Le foie est pâle, la vésicule biliaire hypertrophiée (jeûne) (**Garcia M et al., 2004**). *Aspergillus* peut donner des mammites pyogènes avec un chapelet d'abcès parasagittal (uni ou bilatéral) ou des mammites hypertrophiantes. La mamelle est hypertrophiée, indurée, et froide au toucher, des zones hémorragiques sont identifiables. La peau de la mamelle prend une coloration violacée. Le tissu mammaire est infiltré par des cellules de l'inflammation : neutrophile, lymphocytes et macrophages sont retrouvés de manière diffuse dans le parenchyme. Au centre des foyers de nécrose, des hyphes sont organisés. Les cellules épithéliales sont dégénérées, la lumière des galactophores est obstruée par des débris cellulaires, des cellules inflammatoires et des hyphes mycosiques. Le tissu interstitiel est œdémateux ou fibreux (**Las Heras et al., 2000**). Cette mammite s'accompagne d'une lymphadénite. Le nœud lymphatique supra mammaire est hypertrophié, parsemé de petits points pâles de nécrose. L'aspect du lait est modifié, il est d'aspect aqueux avec des floculats de pus. Cette forme aiguë peut devenir chronique dans certains cas lorsqu'elle n'occasionne pas la mort de la brebis. Des cas de rétention placentaire ou de métrite aiguë avec une nécrose des cotylédons sont identifiés sans pouvoir retrouver de champignons sur ces tissus. Dans les troupeaux touchés, il n'est pas rare que certaines brebis soient atteintes de manière inapparente (**Perez V et al., 1998**).

Diagnostic différentiel : Autres causes de mammites hypertrophiantes, autres causes de mammites pyogènes. L'hypothèse du diagnostic thérapeutique peut être avancée lorsque les antibiotiques s'avèrent inefficaces.

Examens Complémentaires :

Diagnostic direct :

- Sur prélèvement sanguin : La PCR permet la détection de l'ADN d'*Aspergillus* dans le sérum.
- Le kit platelia® *aspergillus* ou pastorex® *aspergillus* permettent d'identifier un galactomannane d'*Aspergillus* dans du sérum, il s'agit de tests immuno-enzymatiques humains. Ces tests sont faisables sur le terrain avec une réponse dans les 3 h. On voit néanmoins apparaître un certain nombre de faux négatifs (sensibilité de 50 à 70%), il est donc intéressant de tester plusieurs animaux atteints. Sur tissu
 - o Des prélèvements de tissu mammaire en post mortem permet au laboratoire d'identifier les pyogranulomes mycotiques à l'histologie.

- o De même à l'aide d'échantillons de tissu pulmonaire, hépatique ou rénal ou de nœuds lymphatiques

-Sur le lait, par culture.

Sérologie : L'ELISA indirect permet de détecter les IgG anti-*Aspergillus* du sérum, il s'agit du meilleur test sur prélèvement sanguin.

IV.4.3. Traitement des mycoses a *Aspergillus fumigatus*:

L'auto-guérison sans traitement anti-infectieux est possible pour autant que la fréquence des traites soit augmentée. Les champignons sont habituellement résistants aux antibiotiques mais sensibles aux dérivés iodés. *Aspergillus* s'est révélé sensible au clotrimazole, à la nystatine, à la polymyxine B, au miconazole.

Certains praticiens préconisent le recours à la traite fréquente combinée à l'injection d'AINS pendant 2 à 3 jours. L'application locale d'un onguent à base de salicylate de méthyl, menthol et eucalyptol est également conseillée. Une amélioration peut être observée rapidement ou prendre 15 jours.

Devenir des animaux : Les femelles atteintes deviennent rapidement des non-valeurs économiques. Les autres animaux doivent être surveillés, le mieux serait de les tester afin de traiter ceux qui sont infectés inapparents.

Prophylaxie : Elle passe par une hygiène irréprochable lors des traitements intra mammaires au tarissement. La mamelle doit être lavée ou propre à minima, le trayon doit être désinfecté avec un antiseptique actif sur les champignons (iode, chlorhexidine...) une canule stérile doit être utilisée pour chaque héli-mamelle et ne doit être introduite que de quelques millimètres afin de limiter les traumatismes.

Risques pour l'Homme : *A. fumigatus* est à l'origine de nombreuses maladies fongiques humaines.

L'augmentation de la stabilité et de l'efficacité thérapeutique des molécules bioactives d'origine naturelle par les Micro/Nano systèmes est très difficile à réaliser à cause des différents facteurs influençant la mise au point de ces derniers, c'est pour cela que le passage par une étape d'optimisation est souvent obligatoire. Dans ce chapitre nous allons décrire les méthodes et le matériel utilisé pour réaliser les trois étapes principales de notre projet qui sont : l'extraction et la caractérisation des molécules bioactives utilisées, la mise au point de la nanoformulation et enfin l'évaluation de l'activité biologique avant et après formulation.

V.1. Matériel :

V.1.1. Matériel végétal :

Les feuilles de *Pistacia lentiscus* ont été récoltées au stade de floraison (samedi 27 février 2016) à Roudah, commune de Ouled Sidi Brahim wilaya de Bouira, à 170 Km d'Alger, Algérie. (Geonames-ID: 2485311, Latitude: 36.36748, Longitude: 3.70329, Altitude: 801, Region: Bouira, Algeria, Time Zone: Africa/Algiers). (Figure V.1). Après la récolte, la plante est lavée puis séchée à l'ombre durant une semaine, après séchage la plante est directement utilisée pour l'extraction sans broyage ou autres prétraitements.

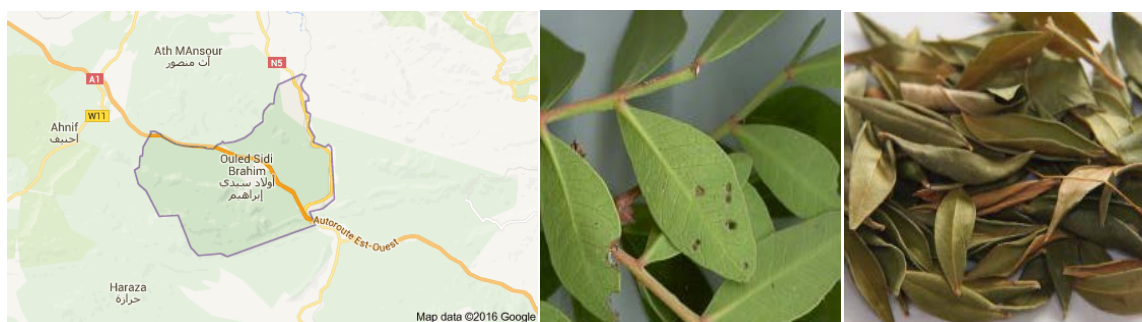


Figure V.1 : Position géographique de Roudah, Ouled Sidi Brahim, Bouira, Algérie (à gauche), *Pistacia lentiscus* avant séchage (milieu) et après séchage (à droite).

V.1.2. Produits chimiques :

Le **chitosane** utilisé est issu d'extraction par la méthode chimique (extrait par Mlle Lassal Sarah encadré par Pr AISSI Miriem à l'ENSV en juin 2014), il présente un degré de désacétylation de 84% et un poids moléculaire de 11 Daltons. La **gomme d'acacia** est achetée chez sigma Aldrich. Le réactif de Folin-Cicatu (Sigma Aldrich), l'acide gallique (Panreac Quimica), le carbonate de sodium (Sigma Aldrich), le méthanol, le tween 80 et tous les autres produits utilisés sont des « produits de grade pharmacopée ».

V.2.. Préparation et caractérisation de l'extrait :

V.2.1. Extraction de l'huile essentielle :

L'extraction de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* a été réalisée par hydrodistillation en utilisant l'appareil de Clevenger disponible au niveaux du laboratoire de génie de la réaction (USTHB). Le protocole utilisé est celui décrit par la pharmacopée européenne (**Pharmacopée Européenne, 1996**), 150 g de la plante sèche est introduite dans un ballon de 2l contenant 1.5l d'eau distillée ; après 3 heures d'extraction l'huile essentielle est récupérée puis pesée. Le rendement de l'extraction est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Rendement} = \frac{\text{masse de l'huile esentielle extraite}}{\text{masse de la plante utilisée}}$$

V.2.2. Composition chimique de l'huile essentielle :

La composition chimique de l'huile essentielle est déterminée en utilisant un appareil de chromatographie gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse (CG/SM) très performant de type Hewlett-Packard 6890 series GC systems (Agilent Technologies) couplé a spectrophotomètre de masse de type quadruple HP 5973 ; disponible au niveau du CRAPC (centre de recherche en analyses physicochimiques). Le système utilisé est équipé d'une colonne capillaire de type HP5MS (5 % phenyl methylsiloxane, 30m × 0.25 mm, 0.25 µm épaisseur du film). Les conditions analytiques sont : température de l'injecteur 250°C, température isotherme de 60°C, 8 min à 250°C , 30min avec un pal de 2°C/min ; l'hélium utilisé comme gaz vecteur (He, 0.5ml/min, split 1/20); un voltage d'ionisation de 70 eV et une gamme des scan de 35-500 uma. L'identification des composés est basée sur la comparaison des temps de rétention de ces derniers avec les standards identifiés et la base de données informatique en utilisant les temps de rétention d'une série d'alcane (**Van den Dool., & Kratz., 1963 et Adams., 2007**).

V.3. Formulation et caractérisation du nanosystème de délivrance :

Le nanosystème choisi dans cette étude est une nanoémulsion enrobée par une membrane polymérique (des systèmes réservoirs et non pas matricielles).

V.3.1. Formulation des nanoémulsions enrobées:

Les formulations ont été réalisées en deux étapes, la première est l'émulsification préliminaire ensuite la deuxième qui est le passage à l'échelle nanométrique en utilisant un ultra-turrax de type T 25 digital disponible au laboratoire de parasitologie/mycologie médicale de l'ENSV (Figure V.4) comme technique de réduction de taille.



Figure V.2 : Clevenger, Schématisation (à gauche) et photographie (à droite).



Figure V.3 : L'appareil GC/SM de type GC 6890 / 5973 MSD (Agilent).



Figure V.4 : Le système utilisé pour la réduction de taille (T 25 digital ULTRA-TURRAX®).

La première étape : 5ml d'huile essentielle est mélangé à 10ml de solution de chitosane (solubilisé dans l'acide acétique 1%) à 5%, après 30 minutes d'agitation à 500 RPM on ajoute 10 ml de solution aqueuse de gomme d'acacia à 5, 4 ou 3%. La concentration finale des nanoformulations en huile essentielle est de 20%. **La deuxième étape :** Le système est mis sous agitation ultra-turrax à 10000 RPM durant 5, 10 ou 15 min.

V.3.2. Optimisation de la formulation par la méthode de plan d'expériences :

Un plan factoriel complet à deux niveaux, deux facteurs et un point au centre a été utilisé, les facteurs sont : le ratio chitosane : gomme d'acacia (F1, GA: CH, sans unité) et le temps de mélange ultra-turrax (F2, Temps, en minutes). (Tableau V.1.). Nous avons sélectionné quatre réponses pour le plan d'expériences utilisé :

- La première réponse est la teneur en huile essentielle (R1, THE, en pourcentage).
- La deuxième est le diamètre moyen (R2, DM, en nanomètre).
- La troisième est l'index de polydispersité (R3, IP, sans unité).
- La quatrième réponse est le potentiel zêta (R4, PZ, en mV).

Tableau V.1 : Matrice des essais du plan factoriel.

Essais	F1	F2	le ratio GA:CH	Temps d'agitation
1	+1	+1	5 : 5	15 min
2	-1	+1	3 : 5	15 min
3	+1	-1	5 : 5	5 min
4	-1	-1	3 : 5	5 min
5	0	0	4 : 5	10 min

V.3.3. Caractérisation des nanoémulsions enrobées:

V.3.3.1. La teneur en huile essentielle (R1) :

Le pourcentage de l'huile essentielle contenu e dans chaque formulation est déterminée en utilisant la spectroscopie UV-visible à l'aide d'un spectrophotomètre de type Beckman DU 520 (figure V.5) disponible au niveau du laboratoire de parasitologie/mycologie médicale, ENSV. En premier lieu, la réalisation d'une courbe d'étalonnage de l'huile essentielle en utilisant l'hexane comme solvant a été réalisée en utilisant des concentrations de l'huile essentielle allant de 1% (v/v) à 0.0001%, les absorbances des solutions préparées sont mesurées a 270 nm. En second lieux 1ml de chaque nanoformulation est prélevé et mélangé à 10 ml d'hexane, le mélange est passé durant 15 min à l'ultra-turrax 10000 RPM puis la phase organique est séparée de la phase aqueuse à l'aide d'une ampoule a décanter (après 24H de décantation). Enfin l'absorbance de la phase organique contenant la totalité de l'huile essentielle du nanosystème est mesurée à 270 nm et le taux de l'huile essentielle contenue dans les nanoformulations est déterminé en utilisant la courbe d'étalonnage préalablement tracée.

V.3.3.2. La granulométrie laser (R2 et R3) :

Nous avons utilisé un granulomètre à diffraction de rayons lumineux de type SZ-100 Nanopartica (figure V.5) disponible au niveau du laboratoire de génie chimique, université Saad Dahleb de Blida1. L'échantillon est analysé après une dilution 1/100 à l'aide d'une cuve en cristal. Au cours de l'analyse granulométrique deux paramètres sont étudiés, le premier est le diamètre moyen (R2) et le deuxième est l'index de polydispersité.

V.3.3.3. La mesure du potentiel zêta (R4) :

Nous avons utilisé un zetamètre de type SZ-100 Nanopartica (figure V.5) disponible au niveau du laboratoire de génie chimique, université SAAD DAHLEB de Blida1. L'échantillon est analysé après une dilution 1/100 à l'aide d'une cuve en cristal muni de 2 électrodes en or.

V.3.3.4. La microscopie électronique :

La formulation optimale F2 est analysée par microscopie électronique à transmission en utilisant un appareil de type Zeiss LEO 900 (figure V.5), disponible au niveau de la faculté de biologie a l'USTHB.



Figure V.5 : Le spectrophotomètre de type Beckman DU 520 (à gauche), le granulomètre/zetamètre de type SZ-100 Nanopartica (au milieu) et le Microscope électronique en transmission type Zeiss LEO 900 (a droite).

V.3.4. Etude de stabilité des nanoémulsions enrobées:

V.3.4.1. Etude de stabilité physique de la nanoemulsion:

les cinq formulations préalablement préparées sont stockées à 40°C durant 20 jours (**Qian et al., 2012** et **Li., & Lu., 2016**). Chaque 10 jours les caractéristiques organoleptiques et les éventuelles séparations de phases sont évaluées (sédimentation, crémage, couleur, odeur ...), en même temps un prélèvement est effectué pour l'analyse granulométrique et la détermination du diamètre moyen (DM) mesuré en nanomètre a l'aide d'un granulomètre à diffraction de rayons lumineux de type SZ-100 Nanopartica (Figure V.5.).

V.3.4.2. Etude de stabilité chimique de l'huile essentielle avant et après encapsulation:

La formulation F2 et l'huile essentielle non encapsulée (introduite dans un placebo sans traitement, juste une simple agitation manuelle) sont stockées à 40°C durant 30 jours. Chaque

10 jours un prélèvement est effectué et le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode de folin-ciatleu (Zheng., & Wang., 2001) en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible de type Beckman DU 520 (figure V.5) disponible au niveau du laboratoire de parasitologie/mycologie médicale (ENSV). L'acide gallique est utilisé comme antioxydant de référence et les lectures sont faites à partir de la courbe d'étalonnage.

V.4. Evaluation de l'activité antifongique in-vitro

V.4.1. Les souches utilisées :

Nous avons sélectionné quatre souches microbiennes pour notre présente étude (Tableau V.2.), chacune d'elles provenant de différentes espèces et provoquant de différentes pathologies (pathologie des carnivores, pathologie des équidés, pathologie aviaire et une pathologie des ruminants). Le critère de choix de ces différents parasites est la diversité de pathologies afin de vérifier avec certitude l'effet de la formulation (le nanosystème) sur l'activité biologique du médicament (huile essentielle de *Pistacia lentiscus*).

Tableau V.2. : Souches microbiennes utilisées dans la présente étude

Souche	Provenance	Pathologie
<i>Microsporum canis</i>	Isolé (à partir d'un grattage cutané de chien présenté en clinique des carnivores) au laboratoire de parasitologie/mycologie médicale de l'ENSV.	Dermatophytose du chien.
<i>Microsporum gypseum</i>	Isolé à l'institut pasteur d'Alger (à partir d'un grattage cutané de cheval).	Dermatophytose du cheval.
<i>Candida albicans</i>	Isolé (à partir d'un jabot de la dinde) au laboratoire de parasitologie/mycologie médicale de l'ENSV.	Candidose aviaire
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Isolé (à partir d'une mammite de brebis) laboratoire de parasitologie/mycologie médicale de l'ENSV.	mammites aspergillaires de brebis

Préparation de l'inoculum : Une suspension des cellules fongiques dans l'eau physiologique stérile est préparée à partir de cultures de souches fongiques (des cultures de 7 jours) préalablement réalisées. Les concentrations cellulaires des inocula sont évaluées par la méthode de turbidité et sont exprimées par la mesure de la Densité Optique (DO à 620 nm) à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible de type Beckman DU 520 (Figure V.5). Une DO de 2-3 correspond à 10^7 à 10^8 germes/mL (Dorman., & Deans., 2000 et Wan et al., 1998).

V.4.2. La méthode de diffusion sur gélose à partir des disques :

La méthode utilisée est l'aromatogramme appelé aussi la méthode de diffusion en milieu gélosé (solide), en utilisant des disques stériles (Koga et al., 1999). Cette méthode consiste à estimer l'inhibition de la croissance des germes testés soumis au contact de l'huile essentielle.(figure V.6.).

Dans des boîtes de Pétrie contenant 15 ml de milieu de culture Sabouraud et préalablement inoculé à la surface de la gélose par les souches à tester à l'aide d'un écouvillon imbibé par la suspension des cellules fongiques, trois disques de 9mm sont déposés au centre de chaque tiers de la boîte, le premier disque est imbibé de 10 µl d'huile essentielle, le deuxième est imbibé d'une quantité équivalente de nanoémulsion (soit 50 µl de la formulation F2 qui contient 10 µl d'huile essentielle, car la formulation contient 20% d'huile essentielle), le troisième disque est imbibé de 50 µl du placebo de la formulation F2 (on remplace la quantité d'huile essentielle par la quantité de l'eau physiologique). Les boîtes préparées sont incubées à 25°C durant 48 heures. Après 48 heures d'incubation les zones d'inhibitions sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse (Meena, & Sethi., 1994), l'interprétation est faite selon le tableau V.3.

Tableau V.3 : Interprétation de l'activité antifongique en utilisant la méthode de diffusion sur gélose (pour des disques de 9 mm).

Diamètre d'inhibition :	Interprétation :
Inférieur à 10 mm	Non inhibitrice
10-16 mm	Légèrement inhibitrice
16-28 mm	Modérément inhibitrice
Supérieur à 28 mm	Fortement inhibitrice

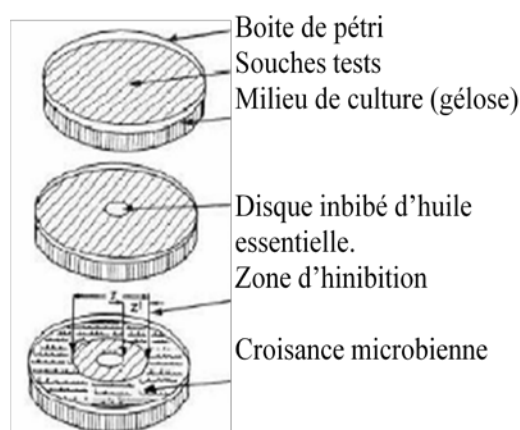


Figure V.6 : Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétrie.

V.4.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale fongicide (CMI/CMF) :

La méthode utilisée est la dilution en milieu solide (Espinel-Ingroff et al., 2002 ; Cantón et al., 2003 et Sóczó et al., 2007) qui permet de déterminer la CMI (concentration minimale inhibitrice) et la CMF (concentration minimale fongicide) pour chaque souche testée. Brièvement, le milieu de culture Sabouraud est chauffé à 95°C dans un bain marie, une première gélose de 1µl d'huile essentielle par 1 ml de gélose (suspension mère à 1µl/ml) est préparée, puis une série de dilutions est effectuée (0.5, 0.25, 2.0125 et 0.063 µl/ml). Une galerie de 5 tubes à essais contenant 10 ml de chaque solution, de 1µl/ml à 0.063 µl/ml (Figure V.7) est refroidie sur une surface inclinée de manière à obtenir un milieu solide incliné (pour une meilleure visibilité). Chaque galerie de dilution estensemencé par la suspension d'inoculum préalablement préparé et incubé directement à 25°C durant 48 heures. La CMI correspond à la concentration la plus faible à la quelle le germe n'a pas poussé (Figure V.7).

Afin de déterminer la CMF tout les tubes préalablement étudiés qui n'ont pas présenté de poussées sont repiqués sur des tubes inclinés contenant la gélose Sabouraud (qui ne contient pas de principe actif), La CMI correspond à la concentration la plus faible à la quelle le germe n'a pas poussé (Figure V.7) après 48 heures d'incubation.

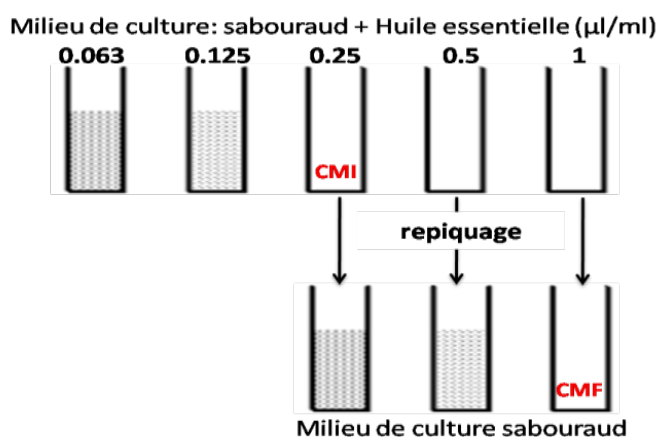


Figure V.7 : Illustration de la méthode des dilutions en milieu solide.

VI.1. Préparation et caractérisation du principe actif :

Le rendement de l'extraction est de 1.24 %. Le chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle extraite est présenté dans la figure VI.1, cette analyse a permis l'identification et la quantification de **52 composés** qui correspondent à un total de 95.04 % de l'huile de *Pistacia lentiscus*. Les composés majoritaires de cette huile essentielle sont le α -pinène (17.21 %), le limonène (16.17 %), le β -myrcène (7.59 %), le β -Caryophyllène (6.42 %) et le β -pinène (5.83%). Le tableau présentant la composition de l'huile est donné dans l'annexe IV.

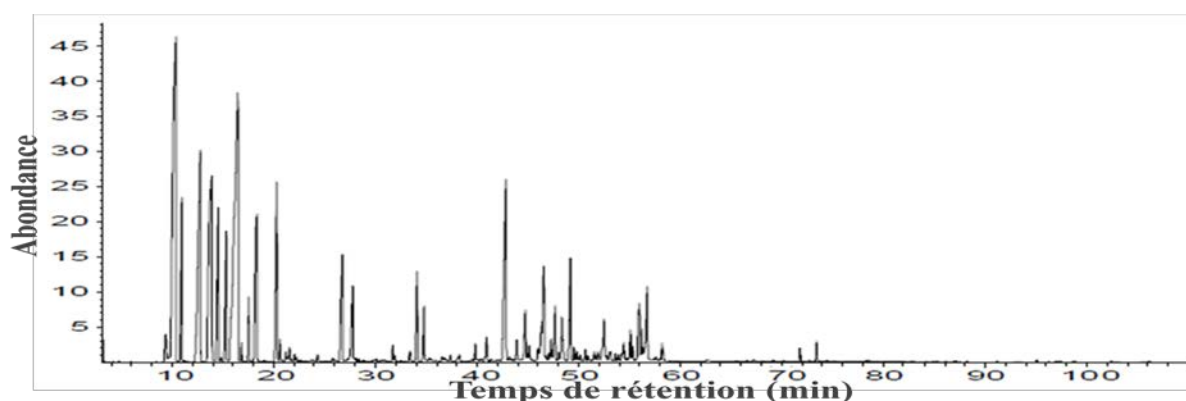


Figure VI.1 : Chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*.

La quasi-totalité des études publiées confirment notre résultat obtenu, effectivement le composé majoritaire de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* est le α -pinène selon les travaux effectués en Algérie (**Mecherara et al., 2008** et **Meriem et al., 2016**), en Grèce (**Magiatis et al., 1999** , **Koutsoudaki et al., 2005** et **Gardeli et al., 2008**), en France (**Castola et al., 2000**), au Maroc (**Zrira et al., 2003**), en Espagne (**Boelens et al., 1991**), en Italie (**Barra et al., 2007**), en Turquie (**Duru et al., 2003**) et en Tunisie (**Douissa et al., 2005** et **Bachrouh et al., 2015**).

Cependant quatre autres études ont montré d'autres composés majoritaires comme le terpinen-4-ol en Algérie (**Benyoussef et al., 2005**) et en Italie (**Congiu et al., 2002**), le myrcène en Espagne (**Fernandez et al., 2000**) et le δ -3-carène en Egypte (**Aboutabl et al 1990**).

Cette étude comparative très poussée a même été faite par rapport un produit commercial issu de l'agriculture biologique méditerranéenne (provenance de la plante est inconnue) commercialisé par Florame Aromathérapie (St Rémy de Provence, France) (**Djenane et al., 2011**) ; Ou encore des feuilles achetées à Sydney en Australie d'une provenance inconnue (**Wyllie et al., 1990**), qui ont toutes les deux montré que le α -pinène est le composé majoritaire.

VI.2. Préparation, caractérisation et étude de stabilité de la nanoformulation :

VI.2.1. Optimisation des paramètres de préparation de la nanoemulsion enrobée :

Les nanoemulsion obtenue avec les 5 essais sont présentées dans la figure VI.6 et les résultats du plan d'expériences sont donnés dans le tableau VI.1.

La première réponse (R1) qui correspond à la teneur en huile essentielle de chaque formulation est déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage représentée dans l'annexe V.

Tableau VI.1 : Matrice des résultats du plan d'expériences.

Essais	F1	F2	R1	R2	R3	R4
F1	+1	+1	99.23	633	0.285	12.47
F2	-1	+1	99.11	704	0.423	32.45
F3	+1	-1	99.12	796	0.283	9.62
F4	-1	-1	99.23	859	0.378	28.11
F5	0	0	99.21	721	0.317	17.73

VI.2.1.1. Effet des facteurs sur les réponses :

L'effet des facteurs sur chaque réponse est représenté sous forme de contours (Figure VI.2) et sous forme de surfaces de réponses dans l'annexe VI.

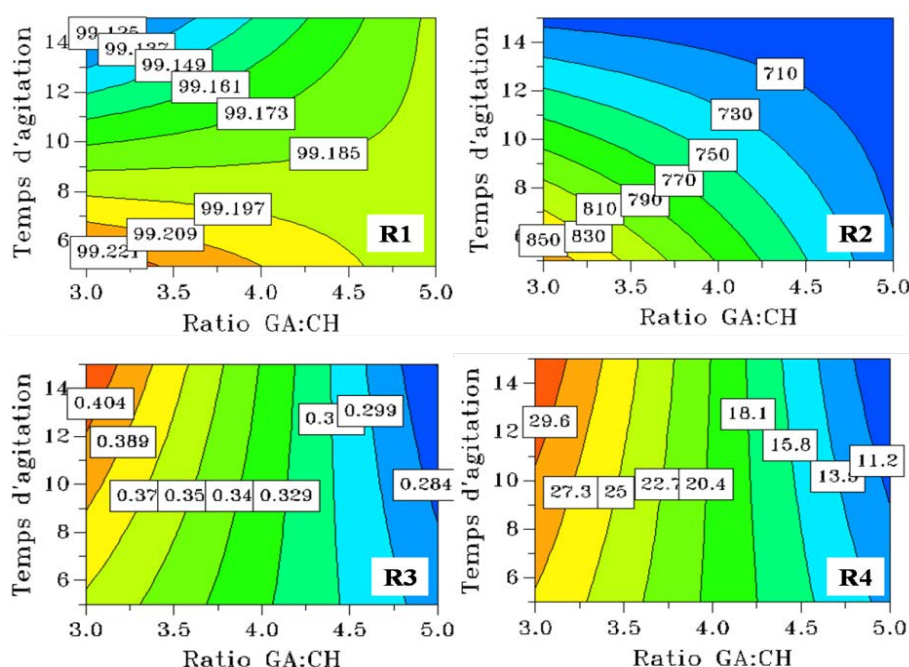


Figure VI.2 : les contours représentant l'effet des facteurs sur les réponses.

Effet des facteurs sur la teneur en huile essentielle (R1) : la teneur en huile essentielle augmente lorsque le temps d'agitation (F2) et le ratio GA : CH (F1) diminuent (Figure VI.2).

Effet des facteurs sur le diamètre moyen (R2) : le diamètre moyen augmente lorsque le temps d'agitation (F2) et le ratio GA : CH (F1) diminuent (Figure VI.2).

Effet des facteurs sur l'indice de polydispersité (R3) : l'indice de polydispersité augmente lorsque le temps d'agitation (F1) augmente et le ratio GA : CH (F2) diminue (Figure VI.2).

Effet des facteurs sur le potentiel zêta (R4) : le potentiel zêta augmente lorsque le temps d'agitation (F1) augmente et le ratio GA : CH (F2) diminue (Figure VI.2).

VI.2.1.2. Modélisation mathématique du procédé de formulation:

Grace à la méthode des plans d'expériences, les corrélations entre les facteurs et les réponses sont mis au point grâce au logiciel MODDE 6.0 (Umetrics Software Sweden) dont la licence est achetée par l'entreprise pharmaceutique nationale SAIDAL. La formule générale du modèle mathématique pour une réponse (Y) d'un plan factoriel complet à deux niveaux et deux facteurs (x_1 et x_2) est donnée par l'équation suivante (a, b et c sont les coefficients du modèle) :

$$Y = a x_1 + b x_2 + c$$

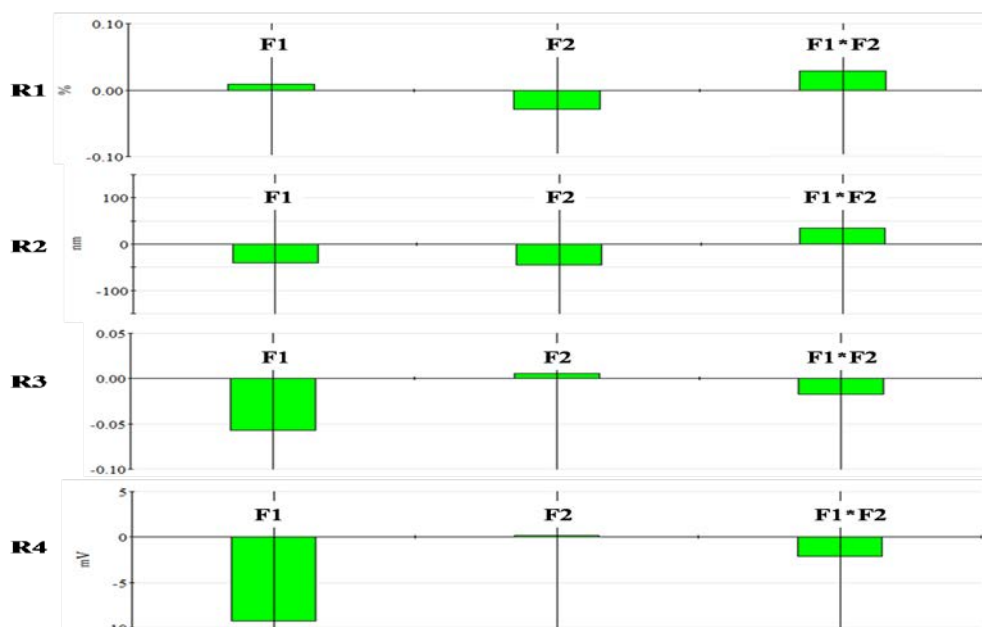


Figure VI.3 : les histogrammes représentant les coefficients des facteurs et leurs interactions sur chaque réponse.

La figure VI.3 représente les coefficients des modèles mathématiques pour chaque réponse, les différents modèles mathématiques sont régis par les formules suivantes :

$$R1 = 0.0084 F1 - 0.0291 F2 + 0.0291 F1 * F2 + 99.18.$$

$$R2 = - 41.0936 F1 - 45.6829 F2 + 34.1257 F1 * F2 + 742.6.$$

$$R3 = - 0.05688 F1 + 0.00566032 F2 - 0.0172554 F1 * F2 + 0.3372.$$

$$R4 = - 9.2528 F1 + 0.173497 F2 - 2.10737 F1 * F2 + 20.076.$$

VI.2.1.3. Etude statistique :

Afin de vérifier la significativité statistique de nos résultats, l'analyse ANOVA est effectuée à l'aide du logiciel MODDE 6.0 qui nous a permis d'obtenir des coefficients de corrélations R2 et de prédictions Q2, qui sont représentés dans la figure VI.4.

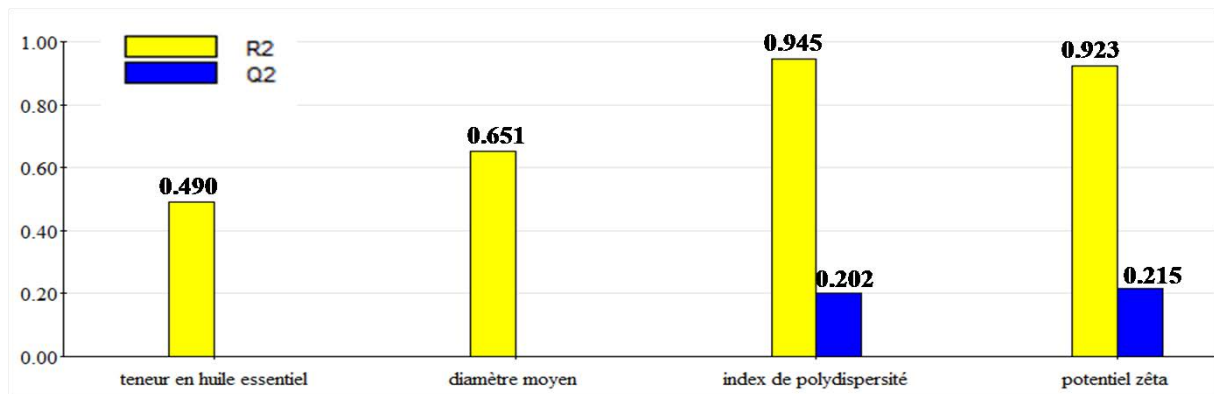


Figure VI.4 : les paramètres R2 et Q2 du plan d'expériences étudié.

Les coefficients de corrélations R2: le coefficient de corrélation de la teneur en huile essentielle est inférieure à 0.5 ; ce qui nous permet de déduire que les résultats obtenus pour cette réponse ne sont pas significatifs, les résultats pour le diamètre moyen sont significatifs car la valeur du R2 est de l'ordre de 0.651 (supérieure à 0.5). Les deux dernières réponses, l'index de polydispersité (R2 = 0.945) et le potentiel zêta (R2 = 0.923) sont jugés très significatifs.

Les coefficients de prédiction Q2: aucune prédiction ne peut être faite pour les deux premières réponses (la teneur en huile essentielle et le diamètre moyen), mais pour l'index de polydispersité et le potentiel zêta qui présentent de bons coefficients de corrélations entre les facteurs étudiés et les résultats obtenus, mais la prédiction des résultats en dehors de l'intervalle étudié reste très faible.

VI.2.1.4. Détermination de la formulation optimale :

Après l'étude statistique effectuée les deux réponses principales pouvant être utilisées pour déterminer la formulation optimale sont l'index de polydispersité et le potentiel zêta. On déduit que la formulation F2 préparée par un ratio de 3 : 5 en Gomme d'Acacia et Chitosane (F1) après 15 minutes d'agitation ultra-turrax (F2), présentant une teneur de 99.11% d'huile essentielle totale utilisée pour la formulation (R1), un diamètre moyen de 704 nm (R2), un index de polydispersité de 0.423 (R3) et un potentiel zêta de 32.45 mV (R4).

VI.2.2. Etude de stabilité des nanoformulations :

VI.2.2.1. Stabilité physique :

Les résultats de l'étude de stabilité sont donnés dans le tableau VI.2 et les photographies des différentes formulations au cours du stockage sont données dans la figure VI.5.

A J0 les caractéristiques organoleptiques (couleur, odeur et aspect) des 5 formulations étaient toutes similaires. Après 10 jours de stockage à 40°C dans une étuve, la formulation F3 a présenté un sédiment tandis que toutes les autres formulations n'ont présenté aucun changement. Après 20 jours de stockage la formulation F1 a présenté un sédiment et la formulation F3 a présenté un sédiment encore plus important que celui observé à J10 et un crémage caractéristique des macroémulsion (apparition d'une phase plus claire en bas du tube, signe de la migration des globules huileux vers le haut du tube par différence de densité).

Tableau VI.2 : Etude de stabilité physique des nanoemulsion a 40°C.

Durée de stockage	J 0	J 10		J 20	
Stabilité	DM	DM	Séparation de phases	DM	Séparation de phases
F1	633	863	-	1184	sédimentation
F2	704	711	-	717	-
F3	796	934	sédimentation	1450	Sédimentation crémage
F4	859	871	-	922	-
F5	721	736	-	802	-

- : pas de séparation de phases.

Au cours du stockage les diamètres des gouttelettes sont en augmentation continue, cette augmentation est due aux phénomènes de floculation, de coalescence et de maturation d'Ostwald dues à la variation du potentiel zêta (Wooster et al., 2008 ; Urbina-Villalba et al., 2009 et Lim et al., 2011). Effectivement, cette vitesse d'augmentation du diamètre est en fonction du potentiel zêta car les deux formulations F1 et F3 présentant les potentiels zêta les plus faibles ont

présenté des séparations de phases au cours du stockage. Les charges positives initiales des nanoemulsions sont dues à la charge positive du Chitosane utilisé comme agent enrobant (Qi et al., 2014), cette charge diminue lorsque la quantité de la Gomme Acacia augmente car cette dernière est chargée négativement (Jayme et al., 1999). Selon la bibliographie, les systèmes comme la formulation F2 présentant un potentiel zêta supérieur à 30 mV, sont considérés comme étant suffisamment forts pour maintenir les forces de répulsions entre les gouttelettes (Zhao et al., 2010 et Peng et al., 2010).



Figure VI.5 : Les photographies des 5 formulations à J 0, J 10 et J 20. Les cercles en rouge correspondent aux sédimentations et le cercle en bleu correspond au crémage.

VI.2.2.2. Stabilité chimique :

L'étude de stabilité chimique de l'huile essentielle et de la formulation F2 à 40°C est donnée dans le tableau VI.3. La quantité de polyphénols totaux de l'huile essentielle diminue d'une manière très importante au cours du stockage tandis que cette quantité reste pratiquement intacte pour la formulation F2 (tableau VI.3).

Tableau VI.3 : Etude de stabilité chimique de l'huile essentielle et de la formulation F2 à 40°C.

Durée de stockage	Dosage des polyphénols totaux en mg équivalent d'acide gallique / ml (mg EAG/ml)		
	J 0	J 10	J 20
Huile essentielle	1.22±0.16	1.04±0.24	0.86±0.19
F2	1.22±0.07	1.18±0.18	1.2±0.03

Les résultats obtenus dans cette étude concordent avec les résultats des travaux existant dans la bibliographie visant à la stabilisation des huiles essentielles par la mise au point des nano/micro systèmes (Gharibzahedi et al., 2015 et Nantaratet al., 2015).

La nanoencapsulation de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* dans une membrane polymérique à base de Chitosane et de Gomme d'Acacia permet d'augmenter sa stabilité à l'oxydation par sa protection des conditions externes (l'oxygène, l'humidité, les UV) (Ruberto., & Baratta., 2000).

VI.2.3. Caractérisation de la formulation par microscopie électronique à transmission :

La microphotographie de la formulation F2 obtenue par microscopie électronique à transmission est donnée dans la figure VI.6. Cette analyse nous permet de déterminer la structure sphérique des gouttelettes d'huile essentielle (structure conventionnelle permettant d'avoir la plus petite surface de contact entre les deux phases). En même temps ce résultat confirme les diamètres donnés par la granulométrie laser.

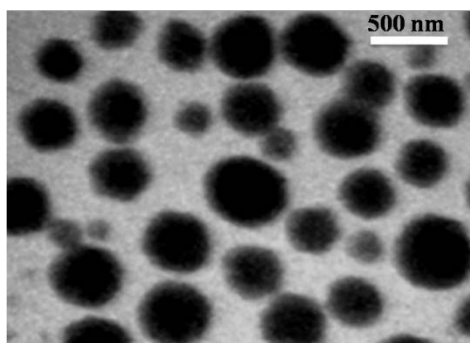


Figure VI.6 : Microphotographie de la formulation F2 sous microscope électronique à transmission.

V.3. Evaluation de l'activité antifongique in-vitro :

V.3.1. La méthode de diffusion sur gélose à partir des disques :

Les résultats de l'activité antifongique par la méthode de diffusion sur gélose en utilisant les disques de 9 mm sont donnés dans le tableau VI.4 et illustré dans la figure VI.7.

Toutes les souches testées ont présenté une sensibilité à l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*, à l'exception l'*aspergillus fumigatus*. Malgré sa résistance à l'huile essentielle elle a présenté une sensibilité pour la F2.

L'activité antifongique de l'huile essentielle a augmenté de 26.92 % pour *M. canis*, de 20.51 % pour *M. gypsum*, de 55.88 % pour *C. albicans* et de 100 % pour *A. fumigatus*. Effectivement, certaines études bibliographiques récentes permettent de confirmer les résultats obtenus (Donsi et al., 2011 ; Padmavathy et al., 2016 ; Glattard et al., 2016 ; Khan et al., 2016 et Shafaei et al., 2016).

Tableau VI.4 : Activité antifongique de l'huile essentielle et de la formulation F2 par la méthode des disques diffusion sur gélose.

Microorganismes	Diamètres de la zone d'inhibition (mm)			
	Placébo	Huile essentielle	F2	Effet de la formulation
<i>M. canis</i>	0	48	72	+ 26.92 %
<i>M. gypsum</i>	0	31	39	+ 20.51 %
<i>C. albicans</i>	0	15	34	+ 55.88 %
<i>A. fumigatus</i>	0	0	14	+ 100 %

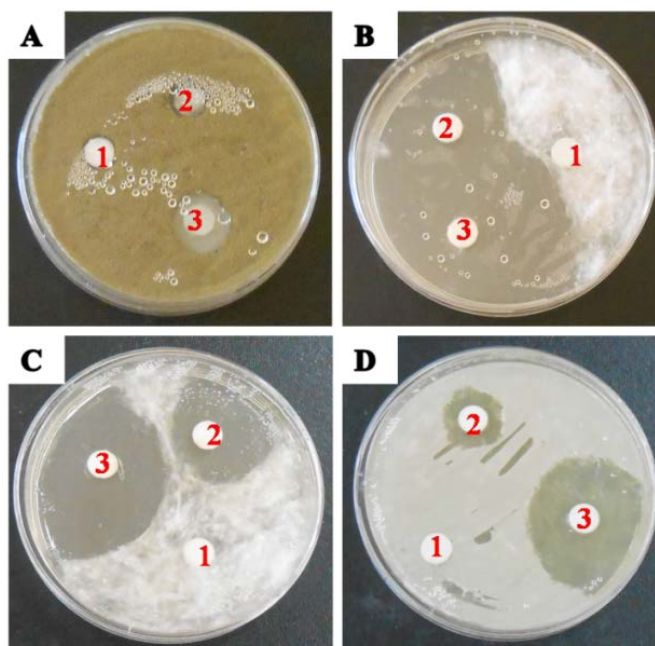


Figure VI.7 : les photographies des boîtes de Pétries dans lesquelles l'activité antifongique par la méthode de diffusion sur gélose a été réalisée. (1) disque imbibé de placébo, (2) disque imbibé d'huile essentielle, (3) disque imbibé de la formulation F2. (A) le teste sur *A. fumigatus*, (B) le teste sur *M. canis*, (C) le teste sur *M. gypsum* et (D) le teste sur *C. albicans*.

V.3.2. Méthode de dilution en milieu solide:

Les résultats de l'activité antifongique par la méthode de dilution en milieu solide sont donnés dans le tableau VI.4 et illustré dans la figure VI.7. Les CMI et les CMF de l'huile essentielle et de la formulation F2 pour chaque souche microbienne sont illustrés dans la figure VI.8.

Nous observons la diminution des CMI de 50-75% pour *M. gypsum*, *C. albicans* et *A. fumigatus*, tandis qu'elles ne se modifient pas pour *M. canis*. Nous observons aussi la diminution des CMFs de 50 % et 75% pour *M. gypsum* et *M. canis* respectivement (les dermatophytes); Tandis qu'elles ne changent pas pour les levures. Ces résultats sont probablement dus à la nature des germes.

Tableau VI.5 : Activité antifongique de l'huile essentielle et de la nanoémulsion par la méthode des discs diffusion sur gélose.

Microorganismes	CMI			CMF		
	Huile essentielle	F2	Effet de la formulation	Huile essentielle	F2	Effet de la formulation
<i>M. canis</i>	0.125	0.125	0%	0.5	0.125	75%
<i>M. gybsum</i>	0.5	0.25	50%	1	0.5	50%
<i>C. albicans</i>	0.5	0.125	75%	1	1	0%
<i>A. fumigatus</i>	1	0.5	50%	1	1	0%

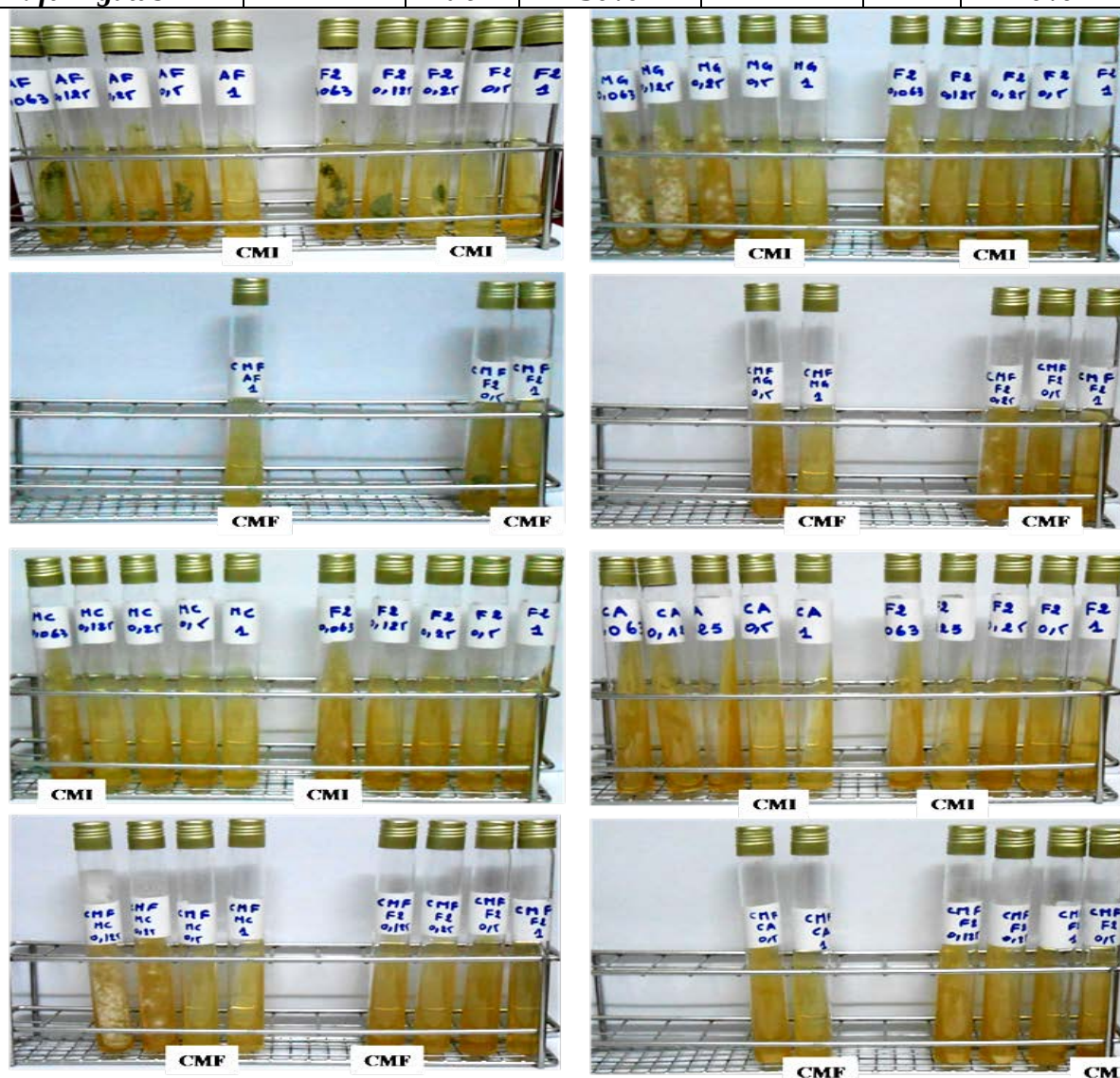


Figure VI.8 : résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle et de la formulation F2 par la méthode de dilution en milieu solide (suivre l'étiquetage des tubes).

De manière générale les propriétés antimicrobienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* décrites dans la bibliographie (Magiatis et al., 1999 ; Duru et al., 2003 ; Koutsoudaki et al., 2005 ; Barra et al., 2007 ; Derwich et al., 2010 et Mharti et al., 2011) sont confirmées par nos expérimentations. De plus cette activité a pu être optimisée par sa nanoémulsification.

Conclusion générale

Dans ce projet, nous avons pu proposer de nouvelles formes pharmaceutiques de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* basées sur le principe de la nanotechnologie.

L'enrobage des nano-gouttelettes d'huile essentielle par une membrane à base de chitosane et de gomme d'acacia à un ratio de 5 : 3, nous a permis d'obtenir un système présentant une teneur de 99.11% d'huile essentielle, un diamètre moyen de 704 nm, un index de polydispersité de 0.423 et un potentiel zêta de 32.45 mV. La caractérisation du nanosystème mis au point par la microscopie électronique à transmission nous a permis de déterminer son architecture structurale qui nous a confirmé l'étude par granulométrie laser préalablement effectuée. L'étude de stabilité de ces nanoformulations qui a été effectuée durant 20 jours à 40°C a montré une très bonne stabilité du système optimale.

Une évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* avant et après formulation a été effectuée par deux méthodes : la méthode de diffusion sur gélose et la méthode des dilutions en milieux solides. Cette étude a été effectuée sur 4 souches fongiques provoquant différentes pathologies sur différentes espèces animales, *Microsporum canis*, *Microsporum gypsum*, *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*. Les deux méthodes nous ont permis de confirmer que l'activité antifongique de l'huile essentielle augmente après sa nanoencapsulation.

Il s'est avéré que la formulation obtenue est très performante d'un point de vue pharmacologique, plus efficace que les formulations déjà existantes sur le marché et présentent moins d'effets indésirables, une étude technico-économique nous confirmera la diminution du coût de revient du traitement car nos formulations contiennent moins de substances actives que les formulations commercialisées actuellement.

Perspectives

Le travail effectué est estimé originale, n'ayant pas été abordé dans la bibliographie, nous prévoyons de le soumettre prochainement pour publication dans la revue scientifique « **Veterinaryparasitology** », cela après la réalisation de l'activité antifongique in-vivo (sur des souris de laboratoires) de l'huile essentielle avant et après formulation.

Nous invitons nos collègues vétérinaires/chercheurs à appliquer notre système mis au point dans le domaine de l'**HIDAOA** en encapsulant des conservateurs alimentaires d'origine naturelle, ou encore dans le domaine de la **chirurgie** en encapsulant des substances bioactives d'origine naturelles ayant des propriétés antimicrobiennes et cicatrisantes en même temps pour la mise au point des traitements préventives permettant de diminuer les risques des complications postopératoires et d'accélérer la guérison.

Bibliographie

Abad A, Fernández-Molina JV, Bikandi J, Ramírez A, Margareto J, Sendino J, Hernando FL, Pontón J, Garaizar J, Rementeria A (December 2010). "What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis."

Abdelwahed, A., Bouhlef, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., ... & Dijoux-Franca, M. G. (2007). Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*: Confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-biological interactions*, 165(1), 1-13.

Aboutabl, E. A., DePorter, H. L., ElTohamy, S. F., & Doss, S. L. (1990). Essential oils of the leaves of three *Pistacia* species grown in Egypt. *Planta Medica*, 56(06), 529-529.

Abreu, F. O., Oliveira, E. F., Paula, H. C., & de Paula, R. C. (2012). Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate polymers*, 89(4), 1277-1282.

Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation

Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875-877.

ALLER GANCEDO J.M., FREGENEDA GRANDES J.M., FERNÁNDEZ DÍEZ M., Mastitis por *Aspergillus fumigatus* en ganado ovino, Rev Iberoam Micol 2000, 17, S13-S17
GARCIA M.E., DURAN C., CRUZADO M., ANDRINO M., BLANCO J.L., Evaluation of molecular and immunological techniques for the diagnosis of mammary aspergillosis in ewes, Vet Microbio, 2004, 98, 17–21

Al-Said, M. S., Ageel, A. M., Parmar, N. S., & Tariq, M. (1986). Evaluation of mastic, a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *Journal of ethnopharmacology*, 15(3), 271-278.

Ammar, H. O., Salama, H. A., Ghorab, M., & Mahmoud, A. A. (2006). Formulation and biological evaluation of glimepiride–cyclodextrin–polymer systems. *International journal of pharmaceuticals*, 309(1), 129-138.

Andreadou, I., Paraschos, S. M. S., Efentakis, P., Magiatis, P., Kaklamanis, L., Halabalaki, M., ... & Iliodromitis, E. K. (2016). "*Pistacia lentiscus* L." reduces the infarct size in normal fed anesthetized rabbits and possess antiatheromatic and hypolipidemic activity in cholesterol fed rabbits. *Phytomedicine*.

Assimopoulou, A. N., & Papageorgiou, V. P. (2005). GC-MS analysis of penta-and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. Chia. *Biomedical Chromatography*, 19(4), 285-311.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.

Bachrouch, O., Msaada, K., Wannes, W. A., Talou, T., Ksouri, R., Salem, N., ... & Marzouk, B. (2015). Variations in composition and antioxidant activity of Tunisian *Pistacia lentiscus* L. leaf essential oil. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 149(1), 38-47.

- Balan, K. V., Prince, J., Han, Z., Dimas, K., Cladaras, M., Wyche, J. H., ... & Pantazis, P. (2007). Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. chia. *Phytomedicine*, 14(4), 263-272.
- Bampouli, A., Kyriakopoulou, K., Papaefstathiou, G., Louli, V., Aligiannis, N., Magoulas, K., & Krokida, M. (2015). Evaluation of total antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves extracts using UHPLC–HRMS. *Journal of Food Engineering*, 167, 25-31.
- Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., & Angioni, A. (2007). Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(17), 7093-7098.
- Barron, George L. (1983). The genera of Hyphomycetes from soil (Reprint. ed.). Malabar, Fla.: Krieger.
- Beghlal, D., El Bairi, K., Marmouzi, I., Haddar, L., & Mohamed, B. (2016). Phytochemical, organoleptic and ferric reducing properties of essential oil and ethanolic extract from *Pistacia lentiscus* (L.). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(4), 305-310.
- Benamar, H., Rached, W., Derdour, A., & Marouf, A. (2010). Screening of Algerian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Biological Sciences*, 10(1), 1-9.
- Benhammou, N., Bekkara, F. A., & Panovska, T. K. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2), 022-028.
- Benyoussef, E. H., Charchari, S., Nacer-Bey, N., Yahiaoui, N., Chakou, A., & Bellatreche, M. (2005). The essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 17(6), 642-644.
- Bhouiri, W., Derbel, S., Skandrani, I., Boubaker, J., Bouhlel, I., Sghaier, M. B., ... & Chekir-Ghedira, L. (2010). Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicology in Vitro*, 24(2), 509-515.
- Boelens, M. H., & Jimenez, R. (1991). Chemical composition of the essential oils from the gum and from various parts of *Pistacia lentiscus* L.(mastic gum tree). *Flavour and fragrance journal*, 6(4), 271-275.
- Boukeloua, A., Belkhiri, A., Yilmaz, M. A., & Temel, H. (2016). Chemical profiling and total thickness excised wound healing activity of *Pistacia lentiscus* L. fruits growing in Algeria. *Cogent Biology*, (just-accepted).
- Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé Volume 86, août 2008, 577-656.
- Cantón, E., Pemán, J., Viudes, A., Quindós, G., Gobernado, M., & Espinel-Ingroff, A. (2003). Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 45(3), 203-206.
- CARLOTTI D.N., Aspects cliniques et histopathologiques, diagnostic différentiel et traitements des dermatophytoses chez les carnivores domestiques. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, 147, 85-96.
- Castola, V., Bighelli, A., & Casanova, J. (2000). Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(1), 79-88.
- Charef, M., Yousfi, M., Saidi, M., & Stocker, P. (2008). Determination of the fatty acid composition of acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* seeds growing in Algeria. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(10), 921-924.

Chmel, L.; Buchvald, J. (1970). "Ecology and transmission of from soil to man". *Medical Mycology* 8 (2): 149–156.

Cho, Y. H., & Park, J. (2003). Evaluation of process parameters in the O/W/O multiple emulsion method for flavor encapsulation. *Journal of food science*, 68(2), 534-538.

Congiu, R., Falconieri, D., Marongiu, B., Piras, A., & Porcedda, S. (2002). Extraction and isolation of Pistacia lentiscus L. essential oil by supercritical CO₂. *Flavour and fragrance journal*, 17(4), 239-244.

Courtois, S., Cappellano, C. M., Ball, M., Francou, F. X., Normand, P., Helynck, & August, P. R. (2003). Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Applied and environmental microbiology*, 69(1), 49-55.

Craveiro, A. A., Matos, F. J. A., Alencar, J. W., & Plumel, M. M. (1989). Microwave oven extraction of an essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 4(1), 43-44.

Daoued, K. B., Chouaibi, M., Gaout, N., Haj, O. B., & Hamdi, S. (2016). Chemical composition and antioxidant activities of cold pressed lentisc (Pistacia lentiscus L.) seed oil. *RIVISTA ITALIANA DELLE SOSTANZE GRASSE*, 93(1), 31-38.

DE JAHAM C., PAGE N., LAMBERT A.J., PARADIS M. Enilconazole emulsion in the treatment of dermatophytosis in Persian cats: tolerance and suitability. In: Kwochka K.W., Willemse T. and von Tschärner C. (eds.) *Advances in Veterinary Dermatology*, vol.3. Butterworth Heinemann: Oxford, 1998, 299-307.

DEBOER D.J., MORIELLO K.A. Inability of two topical treatments to influence the course of experimentally induced dermatophytosis in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1995, **207**, 52-57.

Dedoussis, G. V., Kaliora, A. C., Psarras, S., Chiou, A., Mylona, A., Papadopoulos, N. G., & Andrikopoulos, N. K. (2004). Antiatherogenic effect of Pistacia lentiscus via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis*, 174(2), 293-303.

Derwich, E., Manar, A., Benziane, Z., & Boukir, A. (2010). GC/MS analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil isolated from leaf of Pistacia lentiscus growing in Morocco. *World Applied Sciences Journal*, 8(10), 1267-1276.

Dias, R. C., Faria, A. F. D., Mercadante, A. Z., Bragagnolo, N., & Benassi, M. D. T. (2013). Comparison of extraction methods for kahweol and cafestol analysis in roasted coffee. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(3), 492-499.

DiSalvo, Arthur F. (1983). *Occupational mycoses*. Philadelphia, Pa.: Lea and Febiger.

Djenane, D., Yangüela, J., Montañés, L., Djerbal, M., & Roncalés, P. (2011). Antimicrobial activity of Pistacia lentiscus and Satureja montana essential oils against Listeria monocytogenes CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control*, 22(7), 1046-1053.

Djerrou, J., Maameri, Z., Hamdo-Pacha, Y., Serakta, M., Riachi, F., Djaalab, H., & Boukeloua, A. (2010). Effect of virgin fatty oil of Pistacia lentiscus on experimental burn wound's healing in rabbits. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 7(3).

Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., & Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9), 1908-1914.

Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., & Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9), 1908-1914.

Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.

Douissa, F. B., Hayder, N., Chekir-Ghedira, L., Hammami, M., Ghedira, K., Mariotte, A. M., & Dijoux-Franca, M. G. (2005). New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L.(Anacardiaceae) from Tunisia. *Flavour and fragrance journal*, 20(4), 410-414.

Duru, M. E., Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Harmandar, M., Izumi, S., & Hirata, T. (2003). Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia*, 74(1), 170-176.

Enfert C; Hube B (editors) (2007). *Candida: Comparative and Functional Genomics*. Caister Academic Press.

Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Peter, J., Rinaldi, M. G., & Walsh, T. J. (2002). Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. *Journal of clinical microbiology*, 40(9), 3204-3208.

Fernandez, A., Camacho, A., Fernandez, C., Altarejos, J., & Pérez, P. (2000). Composition of the essential oils from galls and aerial parts of *Pistacia lentiscus* L. *Journal of Essential Oil Research*, 12(1), 19-23.

Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R. N., & Willmitzer, L. (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature biotechnology*, 18(11), 1157-1161.

Foddai, M., Kasabri, V., Afifi, F. U., Azara, E., Petretto, G. L., & Pintore, G. (2015). In vitro inhibitory effects of Sardinian *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia terebinthus* L. on metabolic enzymes: Pancreatic lipase, α -amylase, and α -glucosidase. *Starch-Stärke*, 67(1-2), 204-212.

Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., & Komaitis, M. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food chemistry*, 107(3), 1120-1130.

Gharibzahedi, S. M. T., Rostami, H., & Yousefi, S. (2015). Formulation Design and Physicochemical Stability Characterization of Nanoemulsions of Nettle (*Urtica dioica*) Essential Oil Using a Model-Based Methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 2947-2958.

Gilles Grosmond. (2012). *Santé animale et solutions alternatives*.

Gioxari, A., Kaliora, A. C., Papalois, A., Agrogiannis, G., Triantafillidis, J. K., & Andrikopoulos, N. K. (2011). *Pistacia lentiscus* Resin Regulates Intestinal Damage and Inflammation in Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis. *Journal of medicinal food*, 14(11), 1403-1411.

Glattard, E., Salnikov, E. S., Aisenbrey, C., & Bechinger, B. (2016). Investigations of the synergistic enhancement of antimicrobial activity in mixtures of magainin 2 and PGLa. *Biophysical chemistry*, 210, 35-44.

Gong, Y., Hou, Z., Gao, Y., Xue, Y., Liu, X., & Liu, G. (2012). Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, 90(1), 9-16.

Hammond, J. A., Fielding, D., & Bishop, S. C. (1997). Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Veterinary research communications*, 21(3), 213-228.

Hare, D. (1999). Complementary and alternative veterinary medicine. *The Canadian Veterinary Journal*, 40(6), 376.

Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., & Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15(8), 639-652.

Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibanez, E. (2006). Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food chemistry*, 98(1), 136-148.

HNILICA K.A., MEDLEAU L. Evaluation of topically applied enilconazole for the treatment of dermatophytosis in a Persian cattery. *Vet. Derm.*, 2002, 13, 28-28.

Howard, Dexter H. (2003). Pathogenic fungi in humans and animals (2nd ed.). New York: Marcel Dekker.

Iauk, L., Ragusa, S., Rapisarda, A., Franco, S., & Nicolosi, V. M. (1996). In vitro antimicrobial activity of Pistacia lentiscus L. extracts: preliminary report. *Journal of chemotherapy*, 8(3), 207-209.

Jamshidi, R., Afzali, Z., & Afzali, D. (2009). Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries. *American-Eurasian J of Agric Environ Sc*, 5, 78-81.

Janakat, S., & Al-Merie, H. (2002). Evaluation of hepatoprotective effect of Pistacia lentiscus, Phillyrea latifolia and Nicotiana glauca. *Journal of Ethnopharmacology*, 83(1), 135-138.

Jayme, M. L., Dunstan, D. E., & Gee, M. L. (1999). Zeta potentials of gum arabic stabilised oil in water emulsions. *Food hydrocolloids*, 13(6), 459-465.

Joseph, N. J., Lakshmi, S., & Jayakrishnan, A. (2002). A floating-type oral dosage form for piroxicam based on hollow polycarbonate microspheres: in vitro and in vivo evaluation in rabbits. *Journal of controlled release*, 79(1), 71-79.

Kane, Julius, ed. (1997). Laboratory handbook of dermatophytes : a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails. Belmont, CA: Star Pub.

Khajeh, M., Yamini, Y., Sefidkon, F., & Bahramifar, N. (2004). Comparison of essential oil composition of Carum copticum obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food chemistry*, 86(4), 587-591.

Khan, A. A. P., Khan, A., Rahman, M. M., Asiri, A. M., & Oves, M. (2016). Lead sensors development and antimicrobial activities based on graphene oxide/carbon nanotube/poly (O-toluidine) nanocomposite. *International journal of biological macromolecules*, 89, 198-205.

Kim, M. S., Jin, S. J., Kim, J. S., Park, H. J., Song, H. S., Neubert, R. H., & Hwang, S. J. (2008). Preparation, characterization and in vivo evaluation of amorphous atorvastatin calcium nanoparticles using supercritical antisolvent (SAS) process. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 69(2), 454-465.

Kıvçak, B., & Akay, S. (2005). Quantitative determination of α -tocopherol in Pistacia lentiscus, Pistacia lentiscus var. chia, and Pistacia terebinthus by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia*, 76(1), 62-66.

Klibet, F., Boumendjel, A., Khiari, M., El Feki, A., Abdenmour, C., & Messarah, M. (2016). Oxidative stress-related liver dysfunction by sodium arsenite: Alleviation by Pistacia lentiscus oil. *Pharmaceutical biology*, 54(2), 354-363.

Koga, T., Hirota, N., & Takumi, K. (1999). Bactericidal activities of essential oils of basil and sage against a range of bacteria and the effect of these essential oils on Vibrio parahaemolyticus. *Microbiological research*, 154(3), 267-273.

Kordali, S., Cakir, A., Zengin, H., & Duru, M. E. (2003). Antifungal activities of the leaves of three Pistacia species grown in Turkey. *Fitoterapia*, 74(1), 164-167.

Koutsoudaki, C., Krsek, M., & Rodger, A. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. chia. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(20), 7681-7685.

Kraft, K., & Hobbs, C. (2004). *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag.

Kwon-Chung, K.J.; Bennett, John E. (1992). *Medical mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger.

LAS HERAS A. et al., Intramammary *Aspergillus fumigatus* infection in dairy ewes associated with antibiotic dry therapy, *Vet Rec*, 2000, 147, 578-580

Li, P. H., & Lu, W. C. (2016). Effects of storage conditions on the physical stability of d-limonene nanoemulsion. *Food Hydrocolloids*, 53, 218-224.

Li, Y., Skouroumounis, G. K., Elsey, G. M., & Taylor, D. K. (2011). Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chemistry*, 129(2), 570-576.

Lim, S. S., Baik, M. Y., Decker, E. A., Henson, L., Popplewell, L. M., McClements, D. J., & Choi, S. J. (2011). Stabilization of orange oil-in-water emulsions: a new role for ester gum as an Ostwald ripening inhibitor. *Food Chemistry*, 128(4), 1023-1028.

Ljubuncic, P., Song, H., Cogan, U., Azaizeh, H., & Bomzon, A. (2005). The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1), 198-204.

Longo, L., Scardino, A., & Vasapollo, G. (2007). Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3), 360-364.

Loscertales, I. G., Barrero, A., Guerrero, I., Cortijo, R., Marquez, M., & Ganan-Calvo, A. M. (2002). Micro/nano encapsulation via electrified coaxial liquid jets. *Science*, 295(5560), 1695-1698.

Loutrari, H., Magkouta, S., Pyriochou, A., Koika, V., Kolisis, F. N., Papapetropoulos, A., & Roussos, C. (2006). Mastic oil from *Pistacia lentiscus* var. chia inhibits growth and survival of human K562 leukemia cells and attenuates angiogenesis. *Nutrition and cancer*, 55(1), 86-93.

Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounis, A. L., Chinou, I. B., & Mitaku, S. (1999). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. chia. *Planta medica*, 65(8), 749-752.

Magnetic Resonance Imaging. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 72, No. 6, p. 585). Elsevier.

MANSOUR-DJAALAB¹, H., KAHLOUCHE-RIACHI¹, F., Djerrou, Z., SERAKTADELM¹, M., Hamimed, S., Trifa, W., ... & PACHA¹, Y. H. (2012). In vitro evaluation of antifungal effects of *Lawsonia inermis*, *Pistacia lentiscus* and *Juglans regia*. *In vitro*, 2(2), 263-268.

Marcel Caude et Alain Jardy, Méthodes chromatographiques - Introduction, PE 1 445, Éditions techniques de l'ingénieur, 1996.

Marone, P., Bono, L., Leone, E., Bona, S., Carretto, E., & Perversi, L. (2001). Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* mastic gum against *Helicobacter pylori*. *Journal of Chemotherapy*, 13(6), 611-614.

Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13(8), 833-839.

Maxia, A., Sanna, C., Frau, M. A., Piras, A., Karchuli, M. S., & Kasture, V. (2011). Anti-inflammatory activity of *Pistacia lentiscus* essential oil: involvement of IL-6 and TNF-alpha. *Natural product communications*, 6(10), 1543-1544.

McClary, Dan Otho (May 1952). "Factors Affecting the Morphology of Candida Albicans". *Annals of the Missouri Botanical Garden* 39 (2): 137–164.

Mecherara-Idjeri, S., Hassani, A., Castola, V., & Casanova, J. (2008). Composition and chemical variability of the essential oil from *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Algeria part I: leaf oil. *Journal of Essential Oil Research*, 20(1), 32-38.

MEDLEAU L., CHALMERS S.A. Ketoconazole for treatment of dermatophytosis in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1992b, **200**, 77-78.

MEDLEAU L., CHALMERS S.A. Resolution of generalized dermatophytosis without treatment in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1992a, **201**, 1891-1892.

Meena, M. R, Sethi, V. (1994): Antimicrobial activity of essential oils from spices. 1. Food Sci. Technol. 31,68-70.

Mehenni, C., Kilani-Atmani, D., Dumarçay, S., Perrin, D., Gérardin, P., & Atmani, D. (2016). Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. *Journal of Food and Drug Analysis*.

Mercurio, M. D., & Smith, P. A. (2008). Tannin quantification in red grapes and wine: Comparison of polysaccharide-and protein-based tannin precipitation techniques and their ability to model wine astringency. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(14), 5528-5537.

Meriem, M., Rachida, A., Housseyn, M., Farida, T., Abdelaziz, M., & Fouzia, M. (2016). Antimicrobial Activity of the Essential Oil Isolated from *Pistacia lentiscus* Leaves Against *Helicobacter pylori* Algerian Clinical Isolates. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(2), 466-474.

Mezni, F., Aouadhi, C., Khouja, M. L., Khaldi, A., & Maaroufi, A. (2015). In vitro antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. edible oil and phenolic extract. *Natural product research*, 29(6), 565-570.

Mezni, F., Labidi, A., Khouja, M. L., Martine, L., Berdeaux, O., & Khaldi, A. (2016). Diversity of Sterol Composition in Tunisian *Pistacia lentiscus* Seed Oil. *Chemistry & biodiversity*, 13(5), 544-548.

Mezni, F., Shili, S., Ben Ali, N., Larbi Khouja, M., Khaldi, A., & Maaroufi, A. (2015). Evaluation of *Pistacia lentiscus* seed oil and phenolic compounds for in vitro antiproliferative effects against BHK21 cells. *Pharmaceutical biology*, 1-5.

Mharti, F. Z., Lyoussi, B., & Abdellaoui, A. (2011). Antibacterial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* used in Moroccan folkloric medicine. *Natural product communications*, 6(10), 1505-1506.

Mosbah, R., Mokrani, N., Mosbahi, I., Rouabhi, S., & Mantovani, A. (2016). Effect of methomyl on the biochemical and reproductive parameters in pregnancy rats: the protective role of *Pistacia Lentiscus* oil.

Muthaiyan, A., Martin, E. M., Natesan, S., Crandall, P. G., Wilkinson, B. J., & Ricke, S. C. (2012). Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of applied microbiology*, 112(5), 1020-1033.

Nahida, A., & Siddiqui, A. N. (2012). *Pistacia lentiscus*: A review on phytochemistry and pharmacological properties. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(4), 16-20.

Nantararat, T., Chansakaow, S., & Leelapornpisid, P. (2015). Optimization, characterization and stability of essential oils blend loaded nanoemulsions by PIC technique for anti-tyrosinase activity. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(3), 308-312.

Ozel, M. Z., & Kaymaz, H. (2004). Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 379(7-8), 1127-1133.

Padmavathy, N., & Vijayaraghavan, R. (2016). Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. *Science and Technology of Advanced Materials*.

Peng, L. C., Liu, C. H., Kwan, C. C., & Huang, K. F. (2010). Optimization of water-in-oil nanoemulsions by mixed surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 370(1), 136-142.

PEREZ V., CORPA J.M., GARCIA MARIN J.F., ADURIZ J.J., JENSEN H.E., Mammary and Systemic Aspergillosis in Dairy Sheep, *Vet Path*, 1998, 35, 235-240

Petry, R. D., Ortega, G. G., & Silva, W. B. (2001). Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride--flavonoid complex. *Die Pharmazie*, 56(6), 465-470.

Pharmacopée Européenne. (1996). Conseil de l'Europe. Maisonneuve SA Editions, Sainte Ruffine.

PUCCINI S., VALDRÉ A., PAPINI R., MANCIANTI F. In vitro susceptibility to antimycotics of *Microsporum canis* isolates from cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1992, **201**, 1375-1377.

Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., & Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate research*, 339(16), 2693-2700.

Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2012). Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. *Food Chemistry*, 132(3), 1221-1229.

Quartu, M., Serra, M. P., Boi, M., Pillolla, G., Melis, T., Poddighe, L., ... & Cordeddu, L. (2012). Effect of acute administration of *Pistacia lentiscus* L. essential oil on rat cerebral cortex following transient bilateral common carotid artery occlusion. *Lipids in health and disease*, 11(1), 1.

Ranganathan; Balajee (2000). "Microsporum gypsum complex in Madras, India". *Mycoses* 43 (5): 177–180.

Remila, S., Atmani-Kilani, D., Delemasure, S., Connat, J. L., Azib, L., Richard, T., & Atmani, D. (2015). Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *European Journal of Integrative Medicine*, 7(3), 274-286.

Rippon, John Willard (1988). Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes (3rd ed.). Philadelphia, PA: Saunders.

Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L., & Fernie, A. R. (2001). Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *The Plant Cell*, 13(1), 11-29.

Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., & Tattini, M. (2002). Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 79-86.

Ruberto, G., & Baratta, M. T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food chemistry*, 69(2), 167-174.

Sarı ^a, A., Alkan, C., & Bilgin, C. (2014). Micro/nano encapsulation of some paraffin eutectic mixtures with poly (methyl methacrylate) shell: Preparation, characterization and latent heat thermal energy storage properties. *Applied Energy*, 136, 217-227.

Sarı^b, A., Alkan, C., Döğüşcü, D. K., & Biçer, A. (2014). Micro/nano-encapsulated n-heptadecane with polystyrene shell for latent heat thermal energy storage. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 126, 42-50.

Schoen, A. M., & Wynn, S. G. (1998). *Complementary and alternative veterinary medicine*. Mosby.

Shafaei, S., Van Opdenbosch, D., Fey, T., Koch, M., Kraus, T., Guggenbichler, J. P., & Zollfrank, C. (2016). Enhancement of the antimicrobial properties of orthorhombic molybdenum trioxide by thermal induced fracturing of the hydrates. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 1064-1070.

Shampo, M. A., & Kyle, R. A. (1997, January). Edward M. Purcell—Nobel Prize for

Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., & Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 53, 10-23.

Singh, C. J. (2011). "Extracellular protease expression in *Microsporium gypseum* complex, its regulation and keratinolytic potential". *Mycoses* 54 (4): e183–e188.

Sóczó, G., Kardos, G., McNicholas, P. M., Balogh, E., Gergely, L., Varga, I., ... & Majoros, L. (2007). Correlation of posaconazole minimum fungicidal concentration and time–kill test against nine *Candida* species. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(5), 1004-1009.

SPARKES A.H., GRUFFYDD-JONES T.J., STOKES C.R. Acquired immunity in experimental feline *Microsporium canis* infection. *Res. Vet. Sci.*, 1996, **61**, 165-168.

Sparkman, O. D. (2005). Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy Robert P. Adams. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16(11), 1902-1903.

Starmans, D. A., & Nijhuis, H. H. (1996). Extraction of secondary metabolites from plant material: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 7(6), 191-197.

Tassou, C. C., & Nychas, G. J. E. (1995). Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in model food system. *International biodeterioration & biodegradation*, 36(3), 411-420.

Trabelsi, H., Cherif, O. A., Sakouhi, F., Villeneuve, P., Renaud, J., Barouh, N., ... & Mayer, P. (2012). Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food chemistry*, 131(2), 434-440.

Urbina-Villalba, G., Forgiarini, A., Rahn, K., & Lozsán, A. (2009). Influence of flocculation and coalescence on the evolution of the average radius of an O/W emulsion. Is a linear slope of R [combining macron] 3 vs. t an unmistakable signature of Ostwald ripening?. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(47), 11184-11195.

van den Berg, K. J., van der Horst, J., Boon, J. J., & Sudeijer, O. O. (1998). Cis-1, 4-poly- β -myrcene; the structure of the polymeric fraction of mastic resin (*Pistacia lentiscus* L.) elucidated. *Tetrahedron Letters*, 39(17), 2645-2648.

Van den Dool, H., & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11, 463-471.

Vaya, J., & Mahmood, S. (2006). Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *Biofactors*, 28(3, 4), 169-175.

Villar, A., Sanz, M. J., & Paya, M. (1987). Hypotensive effect of *Pistacia lentiscus* L. *International Journal of Crude Drug Research*, 25(1), 1-3.

Vuorinen, A., Seibert, J., Papageorgiou, V. P., Rollinger, J. M., Odermatt, A., Schuster, D., & Assimopoulou, A. N. (2015). *Pistacia lentiscus* oleoresin: Virtual screening and identification of masticadienonic and isomasticadienonic acids as inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1. *Planta Med*, 81, 525-532.

Wan, J., Wilcock, A., & Coventry, M. J. (1998). The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(2), 152-158.

Wang, X., Wenk, E., Matsumoto, A., Meinel, L., Li, C., & Kaplan, D. L. (2007). Silk microspheres for encapsulation and controlled release. *Journal of Controlled Release*, 117(3), 360-370.

WHITE-WEITHERS N., MEDLEAU L. Evaluation of topical therapies for the treatment of dermatophytosis in dogs and cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 1995, 31, 250-253.

Wooster, T. J., Golding, M., & Sanguansri, P. (2008). Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir*, 24(22), 12758-12765.

WYLLIE, S. G., BROPHY, J. J., SARAFIS, V., & HOBBS, M. (1990). Volatile components of the fruit of *Pistacia lentiscus*. *Journal of Food Science*, 55(5), 1325-1326.

Wynn, S. G., & Fougere, B. (2006). *Veterinary herbal medicine*. Elsevier Health Sciences.

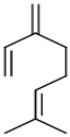
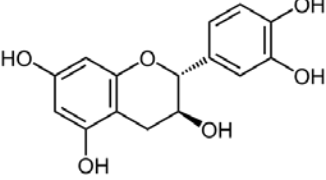
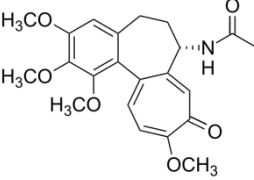
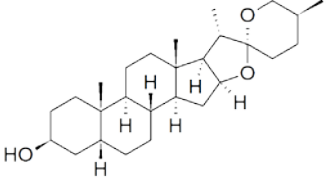
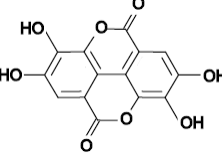
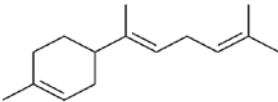
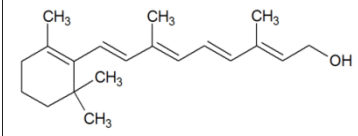
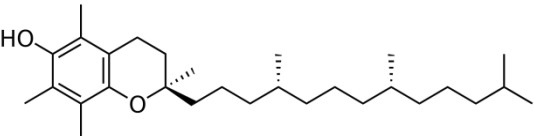
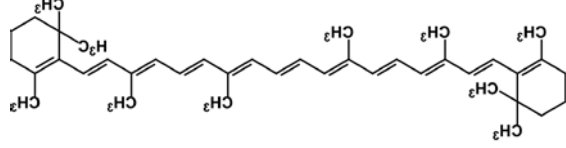
Wynn, S. G., & Marsden, S. (2003). *Manual of natural veterinary medicine: science and tradition*. Mosby Inc..

Zhao, Y., Wang, C., Chow, A. H., Ren, K., Gong, T., Zhang, Z., & Zheng, Y. (2010). Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil: formulation and bioavailability studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 383(1), 170-177.

Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49(11), 5165-5170.

Zrira, S., Elamrani, A., & Benjilali, B. (2003). Chemical composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Morocco—a seasonal variation. *Flavour and fragrance journal*, 18(6), 475-480.

Annexe 1 :

Phénols (hydroquinone) 	Phénols (hydroquinone) 
Flavonoïdes (catéchine) 	Alcaloïdes (Colchicine) 
Saponosides (spirostane) 	Tanins (Ellagique) 
Sesquiterpènes (Bisabolène) 	Diterpènes (vitamine A) 
Triterpènes (vitamine E) 	Tetraterpènes (β-carotène) 

Les différentes familles photochimiques

Annexe 2 :

Type d'extrait	Composition chimique	Références bibliographiques
Huile essentielle (les composés volatiles)	Feuilles: myrcene, germacrene D, E-caryophyllene, α-cadinol and 5-cadinene. Branches : myrcene ,germacrene D and E-caryophyllene. Mastic: a-pinene. Feuilles: a-Pinene, p-Cymene, Limonene, Terpinen-4-ol and α-Terpineol. feuilles: R-pinene, -pinene, -myrcene and limonene. Mastic: R-pinene, -pinene,-myrcene, limonene, and -caryophyllene. Feuilles: Myrcene, limonene, terpinen-4-ol, α-pinene, β-pinene, α-phellandrene, sabinene, p-cymene et γ-terpinene Feuilles: a-pinene et P-myrcene. Feuilles: a-pinene, P-myrcene, p-Cymene et terpinen-4-ol. Feuilles: a-Pinene, limonene, Terpinen-4-ol, Terpineol, (Z)-3-Hex-1-enyl benzoate et b-Caryophyllene. Feuilles: a-pinene, P-myrcene et 1.8-Cineole. Feuilles: caryophyllene, germacrene D et –cadinene. Feuilles: α-Pinene, γ-terpinene et terpinen-4-ol. Feuilles: a-pinene, limonene et P-myrcene.	(Magiatis et al., 1999) (Gardeli et al., 2008) (Koutsoudaki et al., 2005) (Castola et al., 2000) (Zrira et al.,2003) (Boelens et al., 1991) (WYLLIE et al., 1990) (Barra et al., 2007) (Duru et al., 2003) (Bachrouch et al., 2015) (Djenane et al., 2011) (Congiu et al., 2002) (Douissa et al., 2005) (Meriem et al.,2016)
Les composés non-volatiles du Mastic	tyrosol,p-hydroxy-benzoic acid, p-hydroxy-phenylacetic acid, vanillic acid and traces of gallic andtrans-cinnamic acids. Cis-1, 4-poly-β-myrcene Moronic acid, oleanonic acid, olean-12,18-dien-3-olic acid, 24Z-masticadienonic acid, 24Z-isomasticadienonic acid. penta- et tetra- triterpene cycliques. Anthocyanins Triterpenoids: masticadienonic acid and isomasticadienonic acid.	(Dedoussis et al., 2004) (van den Berg et al., 1998) (Andreadou et al. 2016) (Assimopoulou et al., 2005) (Longo et al., 2007) (Vuorinen et al.2015)
Composition de l'Extrait aqueux	steroids-triterpenes, catechin tannins, flavonoids, sugars, resins and saponins.	(Villar et al., 1987)
Composition de l'extrait ethanolique des feuilles	flavonols, phenolic acids, flavones, anthocyanins, gallic acid and para-coumaric acid. alkaloids, anthocyanins, leuco-anthocyanins, saponosides, coumarins, flavonoids, tannins et terpenoids. Phenols (gallic acid, catechin, syringic acid, ellagic acid, quercetin-3-O-rhamnoside, and luteolin), flavonoids, and tannins.	(Benhammou et al., 2008) (Beghlal et al., 2016) (Mehenni et al., 2016)

Annexe 2 :

	galloyl quinic acid, quercetin and kaempferol glucosides, luteolin and neorehmannioside. Glucogallin, gallic acid, galloyl quinic acid and myricetin-rutinoside.	(Bampouli et al., 2015) (Remila et al., 2015)
Polyphénols isolés	Acide gallique et 1,2,3,4,6-Pentagalloylglucose. (i) gallic acid and galloyl derivatives of both glucose and quinic acid; (ii) flavonol glycosides, i.e. myricetin and quercetin glycosides; and (iii) anthocyanins, namely delphinidin 3-O-glucoside, and cyanidin 3-O-glucoside. Flavonoids : Kaempferol, Myricetin, Quercetin, Luteolin, Genistein et Taxifolin. Digallic acid	(Abdelwahed et al., 2007) (Romani et al., 2002) (Vaya et al., 2006) (Bhourri et al., 2010)
Composition de l'Huile des fruits	Acides gras dans les fruits : palmitic C16:0, oleic C18:1 and linoleic C18:2. Sterols: β -sitosterol, cycloartenol et 24-methylene-cycloartenol. phenolic acids (protocatechuic, caffeic, syringic, gallic, p-coumaric, p-hydroxybenzoic and ferulic acids). Tocols: δ -tocopherol, α -tocopherol and δ -tocotorienol. fatty acids: oleic, palmitic and linoleic acids.	(Charef et al., 2008) (Trabelsi et al., 2012) (Boukeloua et al., 2016) (Mezni et al., 2016) (Daoued et al., 2016)
Composition de l'Extrait hexanique des feuilles	α -tocopherol	(Kıvçak & Akay, 2005)

Photochimie de Pistacia lentiscus

Annexe 3 :
Activités pharmacologiques de *Pistacia lentiscus*

Type d'extrait	Activité biologique	Références bibliographiques
Huile essentielle	Activité antimicrobienne Activité antioxydante Activité antifongique Activité anti- <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935. rôle protecteur contre la toxicité induite par le méthomyl chez les rats femelles gravides. Activité hépatoprotectrice. Activité cicatrisante. Activité antiproliférative des cellules BHK21. Effet sur le cortex cérébral. Activité anti-inflammatoire.	(Magiatis et al., 1999) (Koutsoudaki et al., 2005) (Derwich et al., 2010) (Mharti et al., 2011) (Gardeli et al., 2008) (Beghlal et al., 2016) (Daoued et al., 2016) (Bachrouch et al., 2015) (Barra et al., 2007) (Duru et al., 2003) (Djenane et al., 2011) (Mosbah et al., 2016) (Klibet et al., 2016) (Boukeloua et al., 2016) (Djerrou et al., 2010) (Mezni et al.2015) (Quartu et al., 2012) (Maxia et al., 2011)
Mastic	Activité antiulcéreugénique Anti-helicobacter pylori Activité antimicrobienne Activité antiproliférative des cellules conserveuses de colon humain HCT116. Activité anti-athérogène (via GSH et l'ARNm CD36) Activité anti-angiogénétique sur des cellules de leucémie humaine K562. activité anti-athéromateuse, hypolipémiant et réduction de la taille de l'infarctus. activité inhibitrice du 11β-hydroxysteroid dehydrogenase 1 (activité antidiabétique). Activité anti-inflammatoire	(Al-Said et al., 1986) (Marone et al.2001) (Koutsoudaki et al., 2005) (Tassou et al., 1995) (Balan et al., 2007) (Dedoussis et al., 2004) (Loutrari et al., 2006) (Andreadou et al. 2016) (Vuorinen et al.2015) (Gioxari et al., 2011)
Extrait aqueux	Activité antimicrobienne Activité hépatoprotectrice Activité anti-hyper tension artérielle. Activité inhibitrice des lipase, α-amylase, et α-glucosidase. Activité inhibitrice de l' acetylcholinesterase.	(Iauk et al., 1996) (Janakat et al., 2002) (Ljubuncic et al 2005) (Villar et al., 1987) (Foddai et al., 2015) (Benamar et al., 2010)
extrait méthanolique	Activité antioxydante	(Gardeli et al., 2008)
Extrait éthanolique	Activité antimicrobienne Activité antifongique Activité antioxydante Activité antidiabétique, antioxydante et hépatoprotectrice.	(Iauk et al., 1996) (Benhammou et al., 2008) (Mezni et al., 2015) (Kordali et al., 2003) (MANSOUR et al., 2012) (Beghlal et al., 2016) (Bampouli et al., 2015) (Mehenni et al., 2016)

ANNEXE 4

Tableau IV.1 : Agents antifongiques topiques utilisables en France dans le traitement des dermatophytoses. (Carlottid., 2002)

Molécule	Classe	Mode d'action	Présentation et posologie	Effets secondaires	Noms déposés et disponibilité en France
énilconazole	imidazole	action sur la paroi (inhibition de la synthèse d'ergostérol) - fongicide	solution concentrée à 10 % - à diluer 50 fois (0,2 %) et à utiliser en friction 2 fois par semaine -	Légère coloration du pelage	<u>Imaveral</u> ® lotion
kétoconazole	imidazole	action sur la paroi (inhibition de la synthèse d'ergostérol) - fongistatique à fongicide	solution moussante (shampooing) - 2 fois par semaine ?	? parfois irritant	Ketoderm® gel moussant
chlorhexidine	biguanide	inconnu sur les champignons (bactéries : action sur la membrane et les constituants cytoplasmiques) - activité limitée sur les dermatophytes	solution moussante (shampooing) ou solution concentrée à diluer - 2 fois par semaine ?	rarement irritante	<u>Pyoderm</u> ® (3 %) shampooing <u>Douxo chlorhexidine</u> ® (2 %) shampooing <u>Vetiderm chlorhexidine</u> ® (2,5 %) shampooing <u>Hibitan</u> ® solution - divers topiques à usage humain
polyvidone iodée (povidone iode)	dérivé iodé (iodophore)	inconnu - fongicide	solution prête à l'emploi - solution moussante (shampooing)	coloration du pelage parfois irritante	<u>Vétédine</u> ® solution, savon <u>Iodoskin</u> ® shampooing Bétadine®, Poliodine® solutions

Tableau IV.2 : Agents antifongiques **systémiques** utilisables en France dans le traitement des dermatophytoses. (Carlottid., 2002).

Molécule	Classe	Mode d'action	Posologie	Contre-indication	Effets secondaires	Noms déposés et disponibilité en France
griséofulvine	antibiotique benzo-furanique élaborés par des <i>Penicillium</i>	action sur le noyau (stoppe la mitose à l'interphase) « curling factor » - fongistatique	50 mg/kg/j (1 prise) (absorption favorisée par les lipides)	gestation	térogène - troubles digestifs, hépatiques, sanguins, neurologiques, cutanés	<u>Fungeki</u> ® comp. <u>Fulsan</u> ® comp. <u>Dermogine</u> ® poudre <u>Fulviderm</u> ® comp. Fulcine® comp. Griséfuline® comp.
kétoconazole	imidazole	action sur la paroi (arrêt de la synthèse d'ergostérol par action sur le cytochrome P450, co-enzyme de la stérol déméthylase) - fongistatique à fongicide	10 mg/kg/j (1 prise) (meilleure absorption à pH acide - pendant les repas -)	traitement récent avec la griséofulvine (hépatotoxicité)	accidents cutanés, hépatiques, hypoglycémie bloque la synthèse des stéroïdes à plus forte dose (sexuels, surrénaux) - probablement térogène chez le chat (comme chez le rat et le chien)	Ketofungol 50, 200® comp. Nizoral® comp. et suspension buvable
itraconazole	triazole	action sur la synthèse d'ergostérol (pas d'inhibition du cytochrome P 450) inhibition de la phase d'envahissement - fongicide	10 mg/kg/j (1 prise) (meilleure absorption à pH, acide - pendant les repas -)	néant	bonne tolérance troubles digestifs, hépatiques - effet térogène possible (comme chez le rat et la souris)	Sporanox® gélules (en pharmacie d'hôpitaux en France, d'officine dans les autres pays de l'Union Européenne)
terbinafine	dérivé des allylamines	action sur la paroi (arrêt de la synthèse d'ergostérol par inhibition de la squalène-époxydase) - fongicide (par accumulation intracellulaire de squalène)	20 mg/kg/48 h (?)	?	troubles digestifs, cutanés - absence probable d'effet térogène	Lamisil® comp.

Tableau IV.3 : Agents antifongiques utilisables dans le traitement des candidoses aviaires.

Molécule	Espèce	Posologie
Parconazole	Dindes/Pintades	Traitement : 12 mg/kg/j, 10 j puis 6 mg/kg/j, 10 j Prévention : 6 mg/kg/j dans l'aliment, 4 sema.
Iode	Dindes/Pintades	0,01 mg de Vétédine® /L d'eau de boisson
Nystatine	Dindes traitement Dindes prévention Poules prévention Passereaux Psittacidés	220 mg/kg d'aliment 110 mg/kg d'aliment 142 mg/kg d'aliment 100000 U/L de boisson ou/kg d'aliment pdt 3-6 sem 100 000-300 000 U/kg PO deux à trois fois/j
Kétoconazole	Psittacidés	20 à 30 mg/kg PO BID 14-30j
	Rapaces	15mg/kg PO BID
	Passereaux	2-5 mg/kg PO SID 7-10j
Fluconazole	Psittacidés	10-20mg /24h PO (attention à ne pas dépasser les doses pour gris du Gabon).
	Rapaces	5-15 mg/kg PO SID pdt 14 à 60 j

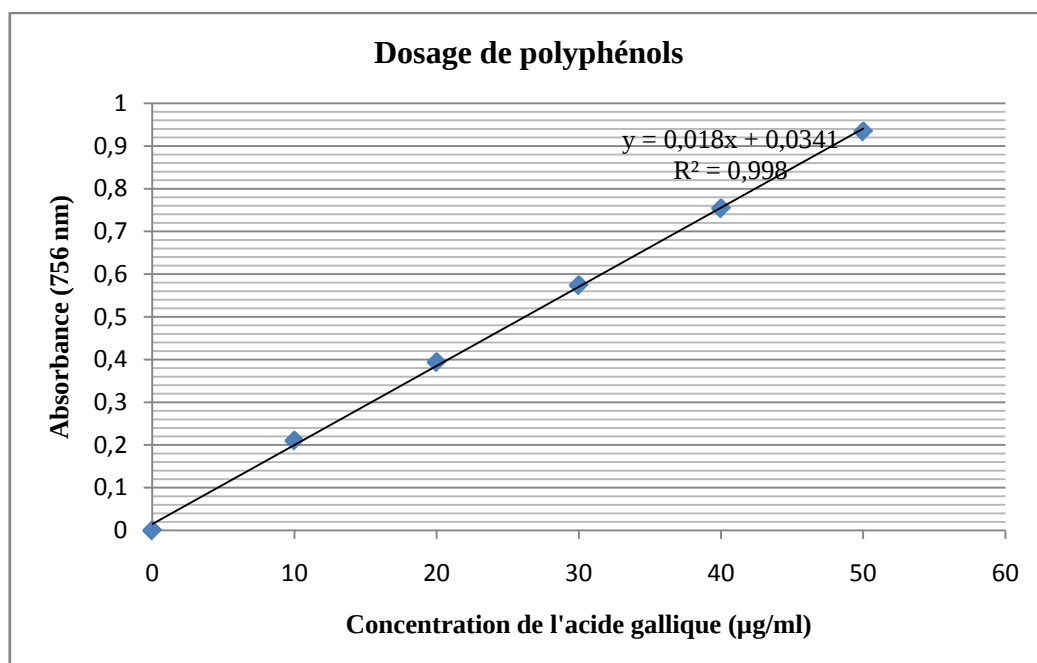
ANNEXE 5

No.	Compounds a	%	RI b
1	Tricyclene	0.71	927
2	α -Thujene	0.94	935
3	α-Pinene	17.21	939
4	Camphene	2.11	954
5	β-Pinene	5.83	979
6	β-Myrcene	7.59	991
7	α -Phellandrene	3.01	1003
8	δ -3-Carene	t	1011
9	α -Terpinene	2.64	1018
10	Limonene	16.17	1029
11	trans-Ocimene	t	1033
12	(Z)- β -Ocimene	0.46	1037
13	(E)- β -Ocimene	1.01	1049
14	γ -Terpinene	4.03	1060
15	p-mentha-3,8-diene	t	1072
16	2-Nonanone	t	1079
17	α -Terpinolene	2.4	1089
18	Isoamyl isovalerate	t	1104
19	cis-p-Menth-2-en-1-ol	0.01	1121
20	Isopinocarveol	T	1148
21	4-Terpineol	3.02	1176
22	Cryptone	t	1187
23	α -Terpineol	2.3	1189
24	Borneol	0.04	1196
25	Bornyl acetate	0.63	1285
26	2-Undecanone	0.33	1293

27	α -Cubebene	t	1340
28	γ -Pyronene	0.04	1345
29	Ylangene	0.09	1371
30	α -Copaene	0.51	1377
31	β -Elemene	0.76	1391
32	Benzyl isovalerate	0.01	1395
33	β-Caryophyllene	6.42	1421
34	Aromadendrene	t	1441
35	α -Amorphene	2.51	1442
36	Geranyl acetone	0.07	1455
37	α -Humulene	1.4	1457
38	Germacrene-D	2.09	1480
39	Valencene	0.19	1482
40	α -Muurolene	0.82	1499
41	(E,E)- α -Farnesene	0.66	1507
42	δ -Cadinene	4.19	1523
43	Cadina-1.4-diene	0.25	1532
44	α -Cadinene	0.23	1539
45	α -Calacorene	0.1	1546
46	Nerolidol	t	1561
47	Caryophyllene oxide	0.94	1583
48	T-Muurolol	0.62	1642
49	β -Eudesmol	0.84	1651
50	α -Cadinol	1.68	1654
51	Benzyl Benzoate	t	1753
52	Hexahydrofarnesyl acetone	0.18	1844
Total		95.04	

Composition chimique de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*.

ANNEXE 6



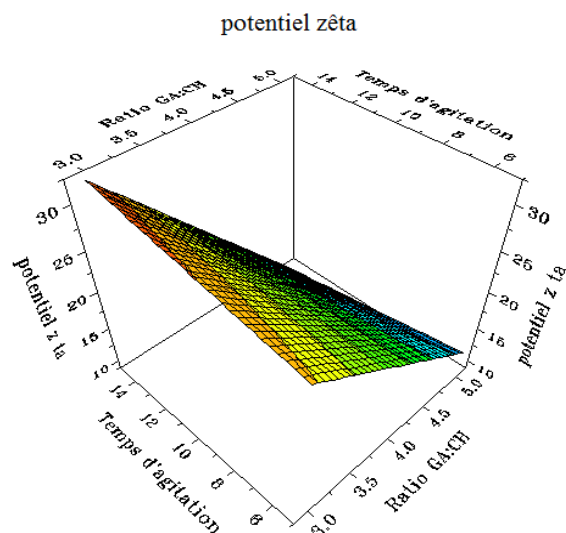
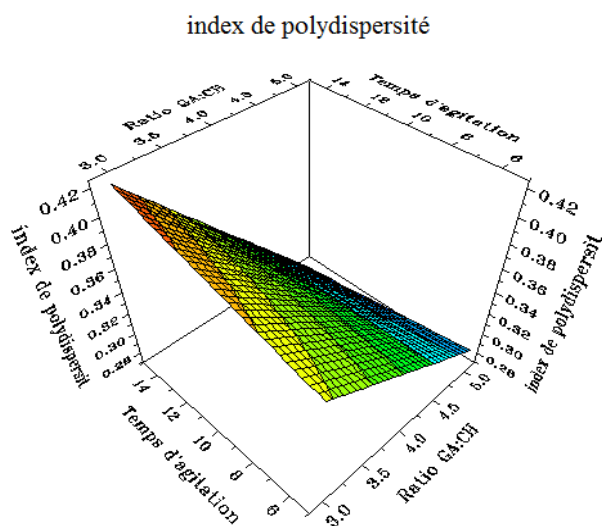
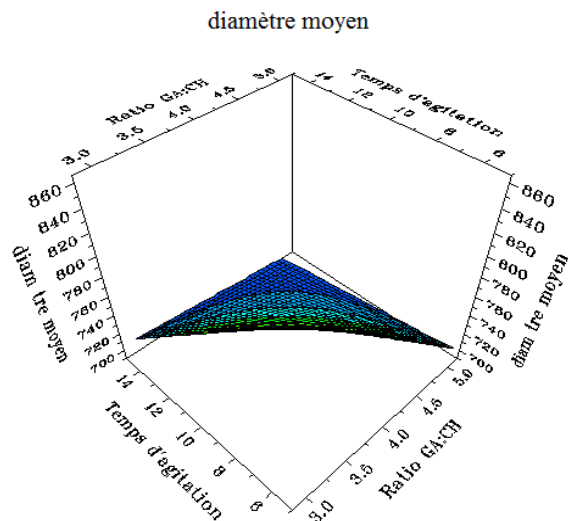
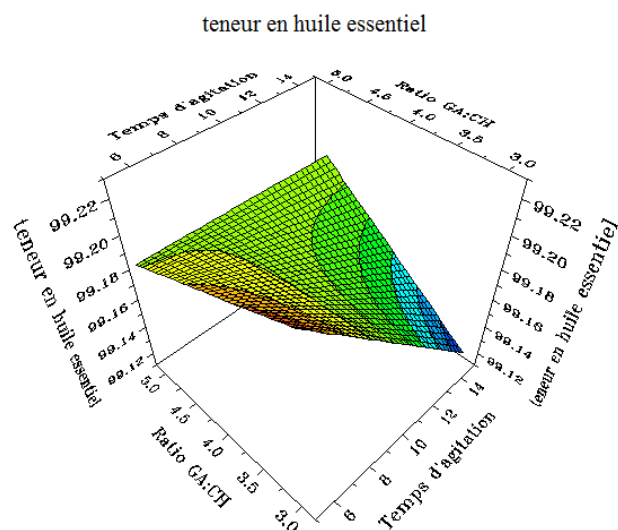
Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



Photographie de solutions utilisées

ANNEXE 7

Représentation de l'effet des facteurs dur les réponses sous forme de surfaces de réponses.





Nom : **NAIT BACHIR**
Prénom : **YACINE**
Docteur Vétérinaire
Diplômé de l'ENSV d'Alger
Promotion 2015/2016

Résumé :

La première étape de ce travail est l'extraction de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* et la détermination de sa composition chimique par CG/SM. La deuxième étape est la nanoencapsulation de cette huile essentielle dans une membrane à base de chitosane et de gomme d'acacia, l'optimisation de cette formulation a été effectuée à l'aide des plans d'expériences et sa caractérisation a été effectuée par granulométrie laser, zetamétrie et microscopie électronique, l'étude de stabilité physicochimique des systèmes mis au point a été réalisée à 40°C durant 20 jours. La dernière étape de ce travail était l'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle avant et après formulation, les résultats obtenus ont montré que cette activité augmente après formulation.

Summary:

The first step of this work is the extraction of the essential oil of *Pistacia lentiscus* and the determination of its chemical composition by GC / MS. The second step is the nanoencapsulation of this essential oil in a chitosan-based membrane and gum acacia, optimization of this formulation was made using the experimental design and characterization was carried out by size laser zeta-meter and electron microscopy, the physicochemical stability study of the developed systems was carried out at 40 ° C for 20 days. The last step of this work was the evaluation of the antifungal activity of the essential oil before and after formulation, the results obtained showed the increases of this activity after formulation.

ملخص:
المرحلة الأولى من هذا العمل هي استخراج الزيت العطري من بطم عدسي وتحديد تركيبه الكيميائي من خلال كروماتوغرافيا الغاز / مطياف الكتلة. الخطوة الثانية هي نانوكبسلة هذا الزيت العطري في غشاء من الصمغ العربي و الكيتوزان، وقدم تعظيم الاستفادة من هذه التركيبة باستخدام تصميم التجارب، تم تم تحديد خواصها باسئمال محدد الجسيمات الليزري، الزيتامتر و المجهر الإلكتروني. تم تحديد دراسة الاستقرار الفيزيوكيميائي للتركيبات التي وضعت تحت 40 درجة مئوية لمدة 20 يوم. و الخطوة الأخيرة من هذا العمل كانت تقييم النشاط المضاد للفطريات لهذا الزيت العطري قبل وبعد تركيبه، وقد أظهرت النتائج زيادة هذا النشاط بعد التركيب.