

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité Microbiologie appliquée



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude de l'effet antifongique de l'huile essentielle
encapsulée avec les cyclodextrines**

Présenté par :

Boudraa Samy & Lalam Amel

Soutenu le : **16 Septembre 2021**

Devant le jury composé de :

Mme. BELHAMICHE N.	MAA	Présidente
M. CHIKHOUNE A.	MCA	Encadreur
M. LADJOUZI R.	MAA	Examineur

Année universitaire : 2020 / 2021

Dédicaces

Je tiens sincèrement à dédier ce modeste travail :

A la mémoire de mon père, qui m'a souvent encouragé et m'a toujours souhaité la réussite. Que Dieu l'accueille dans son vaste paradis.

A ma très chère maman : Aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je te porte. Pour ton soutien, tes sacrifices, tes encouragements, surtout ton amour ; Que Dieu te protège et t'accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur.

A mes trois sœurs: Melissa, Lynda et Leticia que Dieu veille toujours sur vous.

Dédicaces

Je tiens sincèrement à dédier ce modeste travail :

A mes parents exceptionnels, je ne trouve pas les mots pour traduire tout ce que je ressens envers vous. Quisse Dieu, le tout puissant, vous protège et vous accorde meilleure santé et longue vie afin que je puisse vous rendre un minimum de ce que je vous dois.

A mon frère, Jugurtha, et ma sœur thinhinane, merci d'être toujours là quand il le faut.

Remerciement

Nous remercions le bon Dieu le Tout-Puissant de nous avoir donné la force nécessaire et la patience qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail.

On tient à remercier notre promoteur, Mr Chikhouné. Pour avoir accepté de nous encadrer et d'avoir proposé ce sujet, pour son soutien, son dévouement, et surtout pour sa patience.

Nous exprimons aussi nos meilleurs sentiments de gratitude aux honorables membres de Jury qui ont accepté d'évaluer notre modeste travail.

On tient à exprimer nos remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce Travail.

Enfin nos remerciements sont adressés plus particulièrement à nos familles qui ont su nous soutenir, nous encourager, nous aider et nous supporter tout au long des années.

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction.....	1

Synthèse bibliographique

1. Le clou de girofle.....	3
1.1.Description botanique.....	3
1.2.Classification.....	3
1.3.Répartition géographiques.....	4
1.4.Principales utilisations	4
2. Les huiles essentielles.....	5
2.1.Définition et généralités.....	5
2.2.Huile essentielle de clou de girofle	5
2.3.Composition chimique de l'HE du clou de girofle	6
2.4.Localisation de l'huile essentielle.....	6
2.5.Toxicité.....	7
2.6.Activités biologiques	7
2.6.1.Activité antioxydante	7
2.6.2.Activité antidiabétique et anticancéreuse	7
2.6.3.Activités anti-inflammatoires.....	8
2.6.4. Activité antibactérienne.....	8
2.6.5.Activité antivirale.....	8
2.6.6.Activité antifongique	8
2.7. Méthodes d'extraction	9
3. Les cyclodextrines.....	9
3.1.Définition.....	9
3.2.Structure	9
3.3.Propriétés physico-chimiques des cyclodextrines.....	10
3.4.Toxicité des cyclodextrines.....	11
3.5.Complexes d'inclusion	11
3.5.1 Définition	11
3.5.2.Mécanisme de formation	12
3.5.3.Facteurs influençant le phénomène d'inclusion.....	12
3.5.4.Méthodes de préparation des complexes d'inclusion.....	13

4. <i>Botrytis cinerea</i>	13
4.1 Description de l'agent pathogène.....	13
4.2. Classification de <i>Botrytis cinerea</i>	14
4.3. Cycle de développement de la pourriture grise.....	14
4.4. Gamme d'hôte	15
4.5. Facteurs influençant le développement de <i>botrytis cinerea</i>	15
4.6. Importance économique.....	16

Matériel et méthodes

Objectifs.....	17
I. Matériel.....	17
1. Matériel végétal	17
2. Matériel fongique	17
3. Choix du milieu de culture	18
4. Matériel de laboratoire.....	18
II. Méthodes.....	18
1. Extraction de l'huile essentielle	18
Protocole d'extraction.....	19
Rendement de l'extraction	19
2. Préparation des complexes d'inclusion dans la phase aqueuse	20
3. Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i>	20
Repiquage des souche pathogène.....	20
Préparation des solutions de l'huile essentielle et de complexe d'inclusion.....	20
L'ensemencement.....	21
Lecture.....	21

Resultats et discussion

1. Resultats.....	22
1.1. Le rendement d'extraction en HE.....	22
1.2. Evaluation de l'effet antifongique de l'huile essentille de clou de girofle sur la croissance mycélienne de <i>B. cinerea</i>	23

2.Discussion	25
Conclusion.....	27
Références bibliographiques.....	28
Résumé	

Liste des abréviations

HHCG : Huile essentielle du clou de girofle

HE : Huile essentielle

CI : Complexe d'inclusion

B.cinerea : *Botrytis cinerea*

PDA : potato dextrose agar

S.aromaticum : *Syzygium aromaticum*

Liste des tableaux

Tableau I	Pourcentages relatifs des principaux constituants isolé à partir de l'HE de clou de girofle de différentes provenances.	6
Tableau II	Propriétés physico-chimiques de α -, β - et γ -cyclodextrines.	11
Tableau III	Classification sexuée et asexuée de <i>B. cinerea</i> .	14
Tableau IV	Résultat du rendement.	22

Liste des Figures

Figure 1	Photographies de l'arbre (A), des feuilles et des boutons floraux (B) de <i>Syzigium aromaticum</i>	3
Figure 2	Photographie de l'huile essentielle et des boutons floraux du clou de girofle	6
Figure 3	Structures de α -CD, β -CD et γ -CD	10
Figure 4	Complexe d'inclusion	12
Figure 5	Photographies d'une tomate (A), et d'une fraise (B) infectées par <i>Botrytis cinerea</i>	14
Figure 6	Cycles de vie de <i>Botrytis cinerea</i>	15
Figure 7	Photographie des souches de <i>Botrytis cinerea</i> de droite à gauche	18
Figure 8	photographie d'un appareil pour l'hydrodistillation	19
Figure 9	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des souches traitées par le complexe d'inclusion et l'huile essentielle du clou de girofle à 100 PPM	23
Figure 10	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des souches traitées par le complexe d'inclusion et l'huile essentielle du clou de girofle à 250 PPM.	24

Introduction

Depuis des siècles, l'homme a utilisé les plantes, et en particulier les plantes aromatiques, dans plusieurs domaines tels que la parfumerie, la pharmacologie et l'agroalimentaire, grâce à leurs propriétés découvertes par hasard (**Himed,2018**).

Dans la nature, en particulier dans le règne végétal, les plantes contiennent de nombreuses substances biologiquement actives qui peuvent fournir des sources naturelles et nouvelles d'agents antibactériens (**Zellagui et al., 2012**). Comme le clou de girofle (*Syzygium aromaticum*L), qui est une plante médicinale traditionnellement utilisée,elle est riche en métabolites secondaires, en particulier avec une variété d'effets biologiques, y compris des activités anti-inflammatoires, antimicrobiennes, anticancéreuses et antioxydanteset antifongiques.Il existe de nombreux rapports sur ses activités étendues dans la littérature(**Abd El Azim et al., 2014 ; Eman-Abdeen et al., 2015 ; Božiket al., 2017**).

Parmi les métabolites secondaires des végétaux, les huiles essentielles sont les plus étudiées et ont suscité, ces dernières années, un intérêt croissant dans de nombreux domaines pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétique, notamment par leurs propriétés antioxydante et antimicrobienne(**Bakkali et al.,2008**).

Toutefois, les huiles essentielles en générale sont des substances volatiles, faiblement solubles dans l'eau et sensibles aux conditions environnementales (lumière, chaleur, oxygène), limitant ainsi leurs applications. Ainsi, divers procédés d'encapsulation ont été développés pour bénéficier de leurs propriétés tels que l'encapsulation dans les cyclodextrines (**Drulis-Kawa et al., 2010**).

L'encapsulation est l'une des techniques couramment utilisées. Elle permet d'immobiliser les composés volatils des huiles essentielles, de stabiliser cette dernière et de la protéger contre la lumière, l'oxygène et la température ainsi que de moduler sa libération en prolongeant son profil cinétique (**Hill, 2009**). Par conséquent, ce procédé a tendance à protéger et préserver les activités biologiques de ces huiles.

La moisissure grise causée par *Botrytis cinerea* a un impact économique important sur la production végétale de diverses cultures (**Mónaco et al., 2009, Daniel et al., 2015, Elad et al., 2016**). Par exemple la tomate est l'un des hôtes et peut être endommagée à différents stades de croissance.

La lutte contre *B. cinerea* repose toujours sur de multiples applications de fongicides pendant les périodes de floraison et de fructification. À l'heure actuelle, on a tendance à l'échelle mondiale à explorer de nouvelles solutions de rechange aux fongicides synthétiques afin de réduire au minimum les risques associés au développement de populations insensibles à ces composés chimiques (Elad, 1992; Yourman et Jeffers, 1999).

Le présent travail constitue l'ébauche d'un projet de recherche visant à proposer des molécules naturelles douées d'activité antifongique manifeste pouvant enrichir le spectre actuel des antifongiques et permettrait de cerner le problème de résistances en plein essor.

Ce travail est divisé en deux parties principales : dans un premier temps, nous proposons une mise au point bibliographique. Cette partie rassemble une synthèse de travaux sur les huiles essentielles du clou de girofle, une synthèse de travaux sur l'encapsulation et des généralités sur la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea*.

La deuxième partie est la partie expérimentale, dans laquelle nous décrivons les protocoles d'extraction et l'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* suivit des résultats obtenus et enfin une conclusion.

Synthèse

bibliographique

1. Clou de girofle

1.1. Description botanique

Le girofle ou giroflier, connu scientifiquement sous le nom de *Syzygium aromaticum* L., *Eugenia aromaticum* ou *Eugenia caryophyllata*, est un arbre très répandu en Indonésie appartenant à la famille des myrtacées (Chaieb *et al.*, 2007). L'arbre a une forme conique de 10 à 12 mètres de hauteur pouvant atteindre jusqu'à 20 mètres de hauteur (Singh *et al.*, 2012).

Généralement *Syzygium aromaticum* est de taille moyenne, avec une base de cime basse, des branches semi-dressées (Figure 1). Les feuilles sont glabres et il y a de nombreuses glandes sébacées en dessous. Les fleurs sont petites, et dans les grappes de cymes terminales, les fleurs de chaque pédoncule ont trois ou quatre tiges à leurs extrémités, tandis que les sépales sont petits et ont des protubérances triangulaires (Figure 01). Les boutons floraux ont d'abord une légère ombre, puis deviennent progressivement verts. Les fruits du giroflier sont des baies pourpres comestibles (Mbaveng *et al.*, 2017).

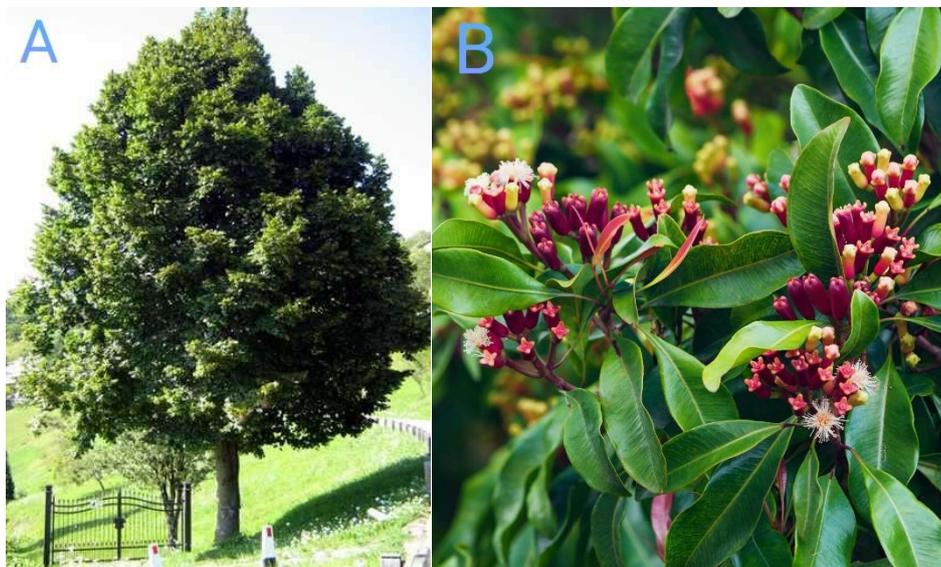


Figure 1 : Photographies de l'arbre (A), des feuilles et des boutons floraux (B) de *Syzygium aromaticum* (D'après Googleimages)

1.2. Classification

La classification botanique du giroflier (*Syzygium aromaticum*) comme suit d'après Ghedira *et al.* (2010) :

Règne :	<i>Plantae</i>
Embranchement :	Magnoliophyta
Sous-embranchement :	Magnoliophytina
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre :	Myrtales
Famille :	<i>Myrtaceae</i>
Genre :	<i>Syzygium</i>
Espèce :	<i>Syzygium aromaticum</i>

1.3. Répartition géographique

Originaires de Madagascar, la Réunion, les Antilles, le giroflier est également cultivé en Indonésie et en Tanzanie. Les clous de girofle américains sont réputés être de qualité inférieure à cause de leur plus faible teneur en huile essentielle (**Demangel,2011**).

1.4. Principales utilisations

Cette plante est utilisée en alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. Les huiles essentielles issues des différentes parties de l'arbre (clous, griffes, feuilles...) sont très demandées sur le marché mondial comme source principale d'eugénol.

Les industries pharmaceutiques et chimiques utilisent l'eugénol pour la production d'analgésiques, de vanilline artificielle, de peinture et de vernis. Ces produits sont aussi utilisés dans la parfumerie et rentrent dans les préparations dentaires tels que les bains de bouche, les dentifrices, les ciments... Le clou de girofle a des propriétés antiseptiques et anesthésiques reconnues depuis longtemps, mais aussi un pouvoir antifongique (**Demangel, 2011**), anti-infectieux ; antibactérien puissant à large spectre d'action; mais aussi antivirale, et antiparasitaire (**Koroch et al., 2007**).

Il est utilisé par les industries agroalimentaires (produits carnés, biscuiterie...). Le clou de girofle peut être utilisé sous forme moulue, d'huile essentielle ou entier(**Demangel,2011**). Ils servent à aromatiser les conserves de légumes, le chou rouge ou

la choucroute, les compotes de pommes et autres fruits (Davet *et al.*,1997). En agriculture, l'huile essentielle possède un effet herbicide et protecteur des cultures contre les insectes et les champignons (Georgetti *et al.*, 2003).

2. Les huiles essentielles

2.1. Définition et généralités

D'après l'Association Française de Normalisation (AFNOR) les huiles essentielles sont des produits obtenus à partir d'une matière première d'origine végétale soit par entraînement à la vapeur d'eau soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus* soit par distillation sèche (Afnor, 2000). Cette définition est restrictive, car elle exclut les huiles essentielles obtenues avec d'autres procédés d'extraction, comme l'utilisation de solvants non aqueux ou l'enfleurage (Besombes, 2008).

Les huiles essentielles sont incolores ou jaune pâle à l'état liquide et à température ordinaire. Toutes les huiles essentielles sont volatiles et odorantes. Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les huiles végétales, dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques (El-Azrak, 2017).

2.2. Huile essentielle du clou de girofle

Elle est extraite à partir des boutons floraux cueillis avant épanouissement que l'on appelle les clous de girofle (koroch, 2007). Il ont un aspect caractéristique brun foncé, à saveur chaude, brûlante, légèrement amère et fortement aromatique (Ghedira, 2010).

Les racines, les rameaux, les feuilles les fleurs et les fruits contiennent tous une HE dont la composition diffère. Par exemple l'HE des feuilles contient seulement 2 à 3 % d'eugénol. L'huile essentielle de girofle provient de la distillation des boutons de giroflier traités à la vapeur (figure 2) (Rakotoatimanana, 1999).



Figure 2 : Photographie de l'huile essentielle et des boutons floraux du clou de girofle
(D'après Google images)

L'une des caractéristiques fondamentales de l'huile essentielle de clou de girofle est sa densité élevée ($d = 1,066 > d \text{ eaux} = 1,00$), ce qui nous permet de les séparer par simple décantation (Treiner, 2000).

2.3. Composition chimique de l'HE du clou de girofle

L'huile essentielle de clou de girofle, extraite par hydrodistillation est caractérisée par la présence d'un propénylphénol largement prépondérant, l'eugénol. Majoritairement libre et en partie sous 4 formes d'acétate d'eugényle. Sa teneur oscille entre 70 et 85 %. L'eugénol est accompagné de plusieurs dizaines de composés terpéniques (Bruneton, 1999).

Les principaux composés chimiques des huiles essentielles de clou de girofle *S. aromaticum* issues de trois régions sont indiqués dans le tableau I (Muchamad *et al.*, 1982).

Tableau I : Pourcentages relatifs des principaux constituants isolé à partir de l'HE de clou de girofle de différentes provenances

Composés	Pourcentage relatif (%)		
	Comores	Madagascar	Zanzibar
B-caryophyllène	3,2	3,2	3,2
Eugénol	63,8	73,8	70,0
Acétate d'eugényle	21,8	14,2	11,0

2.4. Localisation de l'huile essentielle

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites

cellules à huiles essentielles (*Lauraceae*), dans des poches sécrétrices (*Myrtacée*), dans des canaux sécréteurs (*Astraceae*). Elles peuvent être stockées dans divers organes végétaux : les fleurs (bergamotier, rose,..), les feuilles, les racines, les rhizomes, les fruits, le bois, ou les graines (**Oussala et al., 2006**).

2.5. Toxicité

L'HE de clou de girofle est généralement reconnu comme sûrlorsqu'elle est consommée à des concentrations plus faiblesque 1500 mg/kg. D'autre part, l'Organisation mondiale de la santé(OMS) a établi que la quantité quotidienneacceptable de clou de girofle par jour est de 2,5 mg/kg de poids corporel (**Gulçin et al.,2012**).

2.6. Activités biologiques

Le clou de girofle est une plante médicinale importante en raison de la vastegamme d'effets pharmacologiques consolidés parl'utilisation traditionnelle depuis des siècles et rapportés dans la littérature.

2.6.1. Activité antioxydante

L'extrait méthanolique des boutons floraux de *S.aromaticum* a montré une forte activité de piégeage des radicaux libres contre le 2,2-diphényl-1-pyridohydrazino (DPPH*) (**Abd El Azim et al., 2014**). Les extraits phénoliques de clou de girofle ont également une activité antioxydante élevée, telle que leur pouvoir réducteur élevé et captent le 2,2-azabis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS*) (**Adefegha et Oboh, 2012**).

2.6.2. Activité antidiabétique et anticancéreuse

Il a été constaté que le clou de girofle et l'insuline peuvent réguler de manière similaire l'expression de gènes liés au diabète, tels que les gènes de phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et de glucose 6 phosphatase (G6Pase) (**Prasad et al., 2005**).

L'HE de clou de girofle a montré des effets cytotoxiques sur les lignées cellulaires cancéreuses et l'activité antimutagène (**Abd El Azim et al., 2014**). Il a également été signalé que l'extrait de méthanol du bourgeon de clou de girofle est cytotoxique pour la formation de mélanine dans les cellules de mélanome B16 (**Arung et al., 2011**). **Liu et al. (2014)** ont aussi montréque l'extrait du clou de girofle peut représenter un remède à base de plantes pour le cancer, et l'acide oléanolique semble être l'un de ses ingrédients biologiquement actifs.

2.6.3. Activités anti-inflammatoires

L'extrait du clou de girofle et l'eugénol ont des effets immunomodulateurs et anti-inflammatoires sur la production de cytokines par les macrophages murins à des concentrations non cytotoxiques (**Bachiega et al., 2012**).

2.6.4. Activité antibactérienne

L'extrait méthanolique du clou de girofle s'est révélé avoir de bonnes propriétés antibactériennes contre *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* et *Staphylococcus aureus* à une concentration de 10 mg/ ml (**Abd El Azim et al., 2014**).

2.6.5. Activité antivirale

Selon des rapports, l'extrait de *S. aromaticum* inhibe de manière significative la production de *cytomégalo virus murin* dans les poumons des souris traitées et serait bénéfique pour la prévention de la maladie du cytomégalo virus chez les patients immunodéprimés (**Yukawa et al., 1996**). La forte activité inhibitrice de l'extrait de clou de girofle et de l'acyclovir sur le HSV-1 a également été signalée (**Kurokawa et al., 1995**).

2.6.6. Activité antifongique

Dans le domaine phytosanitaire et agro alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (**Lis-Balchin, 2002**). l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (**Viennot-Bourgin, 1967**).

L'activité antifongique décroît selon le type de fonction chimique : Phénols >Alcools>Aldéhydes>Cétones >Ethers. En ce qui concerne les composés phénoliques, l'activité antifongique augmente avec l'encombrement stérique de la molécule (p-n-propylphénol> thymol > isoeugénol> eugénol) (**Treiner, 2000**).

Des travaux ont été réalisés et ont démontré que le clou de girofle présente une activité antifongique « *in vitro* » contre plusieurs espèces de champignons tels que *Aspergillus spp*, *Penicillium citrinum* (**Valnet, 1984**), *Candidaalbicans*, (**Garg et al., 2011 ; Pinto et al., 2009**), *Saccharomyces cerevisiae* (**Khan et al., 2012**), *Aspergillus flavuset*, *Rhizopus nigricans* (**Xing et al., 2012**), *Trichophyton rubrum* (**Oliveira Pereira**

et al., 2013), *Aspergillus terreus*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus niger* (*Belhouan et al.*, 2017). Des extraits de clou de girofle ont montré une activité antifongique significative contre *B. cinereain vitro* (Šernaite *et al.*, 2020).

2.7. Méthodes d'extraction

Le procédé d'obtention des HE intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique (Garnero, 1977). Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants. Parmi ces méthodes on peut citer Extraction par entraînement à la vapeur d'eau, Extraction par hydro distillation d'huile essentielle, Expression à froid, Extraction par solvants organiques, Extraction par fluide à l'état supercritique.

3. Les cyclodextrines

3.1. Définition

Les cyclodextrines (CDs) ont été découvertes par Villiers en 1891. Ce sont des oligosaccharides cycliques non réducteurs (Arun *et al.*, 2008). Elles sont issues de la dégradation enzymatique de l'amidon par une enzyme la Cyclodextrine Glucosyl Transférase (CGTases), d'origine bactérienne produite par *Bacillus macerans* et *Alcaliphilic bacilli* (Tharin, 2002).

3.2. Structure

Les principales cyclodextrines (figures 3) sont l' α -CD (6 unités glucopyranose), le β -CD (7 unités) et le γ -CD (8 unités). Ces unités glucopyranose, en conformation chaise rigide, sont reliées entre elles par des liaisons glycosidiques α (1-4) (Gabelica *et al.*, 2002).

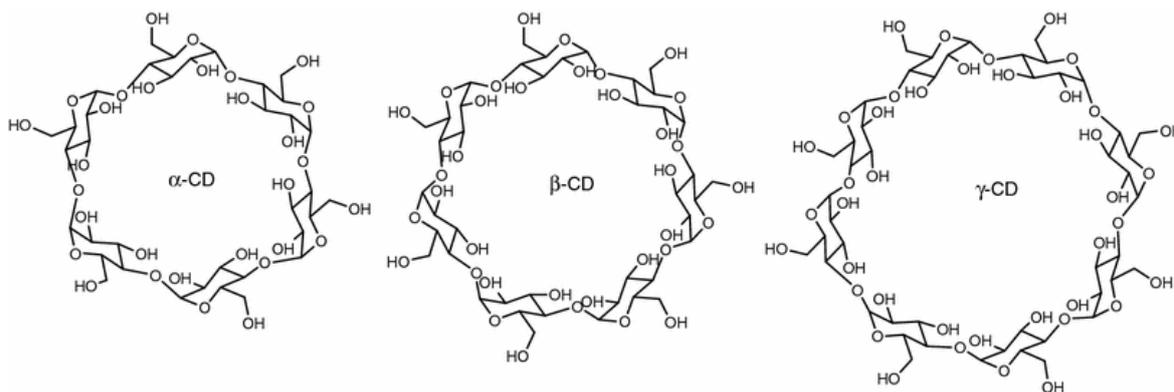


Figure 3 : Structures de α -CD, β -CD et γ -CD (Billard *et al.*, 2011).

Grâce à la conformation de type chaise des unités glucopyranoses, les molécules de cyclodextrines ont la forme d'un cône tronqué dont l'extrémité la plus large est bordée par les groupements hydroxyles secondaire portés par les carbones C2 et C3 et la plus étroite par le groupement hydroxyle primaire en C6. La partie extérieure est donc hautement hydrophile.

L'intérieur de la cavité est constitué d'atomes d'hydrogène (portés par les carbones C3 et C5) ainsi que d'atomes d'oxygène participant à la liaison glucidique ; ce qui confère aux cyclodextrines un caractère hydrophobe (Castagne, 2010).

Le diamètre de la cavité et la masse moléculaire augmentent avec le nombre d'unités glucopyranose constitutives. Bien que toutes les cyclodextrines soient solubles en milieu aqueux, leur solubilité dans l'eau augmente dans le sens : β - < α - < γ - CD (Castagne, 2010).

Grâce, à cette cavité apolaire, les cyclodextrines sont capables de former des complexes d'inclusion en solution aqueuse avec une grande variété de molécules-hôtes hydrophobes (Boutelliez, 2009).

3.3. Propriétés physico-chimiques des cyclodextrines

Les CDs natives sont des composés cristallins, homogènes et non-hygroscopiques (Zafar *et al.*, 2014). Leurs principales propriétés d'après Challa *et al.* (2005) sont regroupées dans le tableau II.

Tableau II : Propriétés physico-chimiques de α -, β - et γ -cyclodextrines

Propriété	α -CD	β -CD	γ -CD
Nombres d'unités de glucose	6	7	8
Formule moléculaire	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Masse moléculaire (g/mol)	972	1135	1297
Diamètre de la cavité (Å)	5.7	7.8	9.5
Diamètre de la périphérie (Å)	14.6-15	15.4-15.8	17.5-17.9
Hauteur du cône (Å)	7.8	7.8	7.8
Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/ml)	145	18.5	232

Les cyclodextrines sont solubles dans l'eau et leur solubilité augmente avec la température. La β -CD est la moins soluble des cyclodextrines natives, à cause de l'orientation et de l'intensité des liaisons hydrogènes établies entre les groupes hydroxyles (C2-OH) et (C3-OH) des entités glucoses adjacents, car ces derniers interagissent moins avec l'eau (Benhadi, 2010).

Cependant elle reste la plus intéressante du point de vue de la complexation. Plusieurs méthodes ont été développées pour améliorer sa solubilité en solution. L'une d'elles consiste en l'addition de solvants organiques. Il a été montré que l'acétonitrile et l'éthanol permettent d'augmenter cette solubilité, contrairement au méthanol (Antonopoulos *et al.*, 2004 ; Clarot *et al.*, 2000).

3.4. Toxicité des cyclodextrines

Toutes les études ont montré que la toxicité orale des cyclodextrines est presque nulle, car elles ne sont pas absorbées au niveau du tractus digestif puisqu'elles ne peuvent pas être hydrolysées par les amylases salivaires et pancréatiques humaines. Cependant, la α -CD et la β -CD peuvent être fermentés par la flore microbienne intestinale. L'administration par voie orale des CDs est, généralement tolérée et n'est pas associée aux effets nuisibles significatifs (Brewster *et al.*, 2007 ; Gould *et al.*, 2005)

3.5. Complexes d'inclusion

3.5.1. Définition

Un complexe d'inclusion (figure 4) est une association d'au moins deux molécules, dont l'une, le substrat ou « molécule invitée » est encapsulée totalement ou partiellement

(suivant sa taille) par l'autre appelée le récepteur ou « molécule hôte », sous l'effet d'interactions faibles. Aucune liaison covalente n'est créée, ce qui permet une dissociation aisée et douce du complexe formé (**Karakasyan, 2006**).

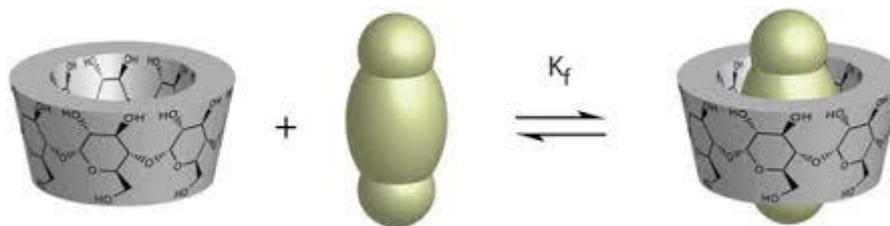


Figure 4 : complexe d'inclusion (Benhadi, 2010)

Les cyclodextrines peuvent former des complexes d'inclusion à l'état solide ou en solution avec une grande variété de substances allant des composés organiques ou inorganiques, neutres ou ioniques, polaires ou apolaires et gaz nobles (**Karakasyan, 2006**).

3.5.2. Mécanisme de formation

Le principe général d'inclusion d'un invité dans la cavité moléculaire de la CD est basé sur le gain énergétique réalisé par le système hôte-invité lors du processus. En effet, en solution aqueuse, la cavité légèrement apolaire de la CD est occupée par des molécules d'eau qui engendrent des interactions énergétiques défavorables de type polaire/apolaire (**Fleury, 2005**). Ainsi ces molécules d'eau peuvent être substituées par une molécule invitée moins polaire que les molécules d'eau.

Les molécules pénètrent dans la cavité par la plus grande ouverture et le côté le plus accessible. La molécule invitée est incluse d'une manière à éloigner sa portion polaire pour avoir un maximum de contact avec la cavité hydrophobe, et sa partie polaire interagit avec la surface hydrophile de la CD (**Benhadi, 2010**).

La formation d'un complexe d'inclusion est engendrée par plusieurs interactions parmi lesquelles on distingue : des interactions hydrophobes, des interactions de Van Der Waals, des liaisons hydrogènes (**Charumanee, 2004**).

3.5.4. Facteurs influençant le phénomène d'inclusion

Un des paramètres importants pour la formation des complexes d'inclusion est la taille de la molécule substrat (invitée) par rapport à celle de la cavité de la cyclodextrine. Et la complexation des CDs avec les molécules ionisables devra nécessairement prendre en compte l'influence du pH. Toutefois, la complexation peut aussi dépendre d'autres facteurs

comme les propriétés de la molécule hôte (composition des fonctions chimiques, solubilité...) et les structures des CDs (ioniques, ramifiés...), finalement plus la molécule est hydrophobe, plus le complexe formé est stable (Yang, 2008).

3.5.5. Méthodes de préparation des complexes d'inclusion

Il existe différents procédés pour réaliser des complexes d'inclusion (Doijad *et al.*, 2005). Pour toutes ces techniques et pour chaque molécule invitée, les quantités d'eaux, la vitesse et le temps d'agitation, la température et le temps de chauffage doivent être optimisés (Challa *et al.*, 2005).

Parmi ces méthodes de préparation on retrouve : la co-précipitation, le pétrissage, la lyophilisation, le co-mélange, l'extrusion, la co-évaporation, l'atomisation ou pulvérisation, l'inclusion à sec, l'inclusion par micro-ondes et l'inclusion au CO₂ supercritique (Nasir *et al.*, 2012).

4. *Botrytis cinerea*

4.1. Description de l'agent pathogène

Le nom du genre *Botrytis* a été introduit pour la première fois par Micheli en 1729 et validé en 1801 par Persoon. En 1949 Gregory a considéré *Botrytis cinerea* comme une espèce. Après la description de Persoon le genre *Botrytis* a été élargi par l'addition de 280 espèces et soumis aux révisions périodiques donnant naissance à des nouveaux genres séparés (Hawksworth, 1993).

Ce champignon connu sous le nom de pourriture grise est un champignon phytopathogène, ubiquiste, nécrotrophe et polyphage qui induit la mort de la cellule hôte ayant pour résultat de sérieux dommages aux tissus végétaux (Dean, 2012).

Il cause des maladies de pré et post-récoltes dans au moins 235 espèces de plantes y compris une large gamme de plantes importantes telles que la vigne, la tomate, la fraise, le concombre et les plantes ornementales (figure 5). Toutes les autres espèces de *Botrytis* n'infectent qu'une ou quelques espèces étroitement liées dans le même genre de la plante. Le nom de l'étape asexuée ou l'anamorphe de *Botrytis cinerea* est préféré au nom du téléomorphe (étape sexuée) qui est rarement détecté dans les champs (Prins, 2000 ; Staats, 2005 ;Blancard, 2009).



Figure 5 : Photographies d'une tomate (A), et d'une fraise (B) infectées par *Botrytis cinerea* (D'après Google images)

4.2. Classification de *Botrytis cinerea*

La classification du genre *Botrytis* est en grande partie basée sur les caractères morphologiques. Actuellement une classification du genre a été établie et basée sur les données de séquençage d'ADN des gènes codant pour des protéines nucléiques (Romanazzi *et al.*, 2015).

Botrytis cinerea connaît une double classification selon la forme sous laquelle il se reproduit (Chardonnet *et al.*, 2000 et Staats, 2005). La classification est donnée dans le tableau III.

Tableau III: Classification sexuée et asexuée de *B. cinerea* (Romanazzi *et al.*, 2015).

	Forme sexuée	Forme asexuée
Classe	Leotiomycete	Hyphomycete
Ordre	Helotiale	Moniliale
Famille	Sclerotiniaceae	Moniliaceae
Genre	Botryotinia	Botrytis
Espèce	Botryotiniafuckeliana	Botrytiscinerea

4.3. Cycle de développement de la pourriture grise

B. cinerea peut produire du mycélium, des spores asexuées ou conidies, des spores sexuées ainsi que des sclérotés. Le mycélium de *B. cinerea* comprend des filaments articulés, grisâtres ou olivâtres, cylindriques, quelquefois vésiculeux. Lorsque le mycélium est au stade de fructification, il produit des touffes de conidiophores grisâtre (Viennot-Bourgin, 1967).

Le cycle de vie de *Botrytis* comporte deux étapes (figure 6) : une étape somatique (asexuée) ou végétative ou anamorphe dans laquelle le mycélium produit les conidies asexuelles (macroconidies) et des sclérotés dans des conditions environnementales difficiles. Une étape sexuée (téleomorphe) où le champignon forme des microconidies et qui fonctionne principalement comme spermaties (**Romanazzi et al., 2015**).

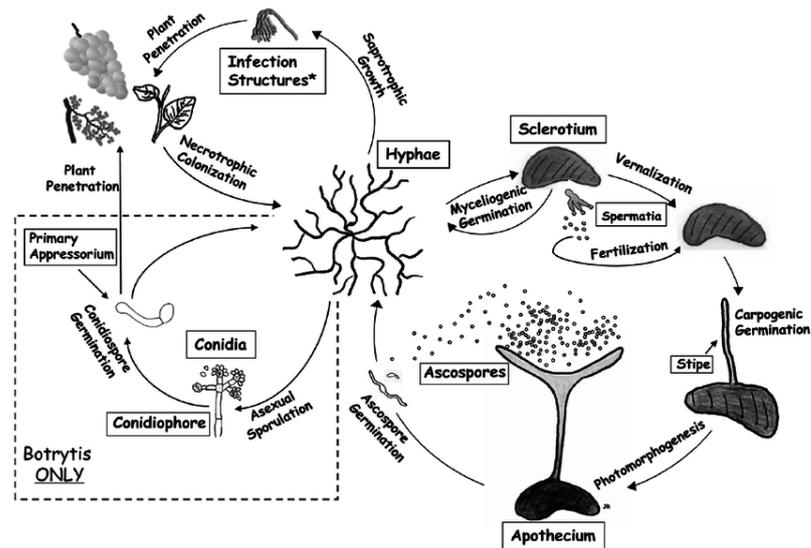


Figure 6: Cycles de vie de *Botrytis cinerea* (Romanazzi et Feliziani, 2014).

Les symptômes qui sont les plus typiques pour les feuilles et les petits fruits sont l'apparition de taches brunes, suivies par l'apparition de feutrage grisâtre, qui sont en fait les conidies (**Williamson et al., 2007**).

4.4. Gamme d'hôte

Botrytis cinerea est ubiquiste et on dénombre de nombreuses espèces de plantes sur lesquelles il peut engendrer des dégâts sérieux avant et après la récolte. Le risque d'infection est considérablement augmenté chez la culture de plantes hors saison, sous serres et sous tunnels plastiques, afin de produire davantage de fruits, de légumes, d'herbes et de fleurs particulièrement chez la tomate, le concombre et le poivron (**Williamson et al., 2007**).

4.5. Facteurs influençant le développement de *Botrytis cinerea*

Pour *Botrytis cinerea*, différents facteurs d'origines extérieures ou dépendants de la plante interviennent dans les premiers stades d'infection, dans le développement de la maladie et dans la sporulation du champignon (**Elad and Yunis, 1993; Yunis et al., 1990**). Parmi ces facteurs ; il y a des facteurs abiotique et des facteurs biotique.

Les facteurs climatiques température (**Gomez, 2007**), humidité (**Corbez, 1994**), lumière (**Nicot *et al.*, 1996**), exigences nutritives (**Yoder *et al.*, 1975**) sont des des facteurs abiotiques qui influence le développement de ce champignon.

En revanche parmi les facteurs biotiques qui influence l'infection par *B. cinerea* figure l'état physiologique de la plante hôte (**Jarvis, 1977**) et le système d'irrigation (**Dik *et al.*, 2007**).

4.6.Importance économique

Botrytis cinerea est l'agent responsable de la pourriture grise. Cet agent pathogène peut entraîner la destruction partielle ou totale de la plante hôte, et dans certains cas de la récolte. Sur le plan économique, ce champignon est par exemple considéré comme un problème phytosanitaire majeur en viticulture dans le monde (**Martinez *et al.*, 2005**). En culture sous abris, les risques d'attaque par ce champignon pathogènes sont permanents sur par exemple, la tomate, le poivron, la laitue ou la fraise (**Jarvis, 1992**). Dans les serres chauffées de tomates, l'infection des blessures peut résulter des chancres sur tiges ou ils peuvent directement détruire la plante entière (**Decognet *et al.*, 2010**) avec des pertes estimées chaque année à 2 Milliards de dollars (**Elmer *et al.*, 2004**)

l'utilisation de fongicides entraîne des coûts financiers importants. Le marché mondial des produits de contrôle de *B.cinerea* est estimé entre 15 et 25 millions de dollars par an (**Elad *et al.*, 2004**).

Partie pratique

Objectifs

L'huile essentielle du clou de girofle et son constituant majeur l'Eug sont des molécules d'origine naturelle à activités biologiques remarquables, notamment antimicrobienne, anti-oxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse, ect. Par conséquent, ces molécules peuvent constituer des alternatives aux composés synthétiques sans présenter les mêmes effets secondaires. Toutefois, en raison de leur faible solubilité dans l'eau, leur volatilité et leur sensibilité à la lumière limitent leur application.

Des systèmes d'encapsulation de cette huile ont été développés pour bénéficier de ses propriétés et améliorer sa stabilité. L'encapsulation de l'huile essentielle du clou de girofle produit un complexe d'inclusion.

Le but de cette étude est de mettre en place un protocole expérimental afin d'évaluer l'activité antifongique de l'huile essentielle de clou de girofle et du complexe d'inclusion sur *Botrytis cinerea*.

I. Matériel

1. Matériel végétal

Dans le cadre de notre étude, la matière végétale utilisée est le clou de girofle, il provient d'Inde et a été acheté du commerce. En vue d'en extraire l'huile essentielle, les bourgeons ont été soumis à la méthode d'hydrodistillation.

2. Matériel fongique

Dans ce présent travail, trois souches (ALG 227, ALG66, BC1) de *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise sont utilisées. Elles ont été obtenues de la collection du laboratoire de mycologie de l'université de Bejaia (**figure 7**).

Le choix de ces souches a été parce qu'elle sont fréquemment impliquée dans diverses infections qui posent des problèmes sur les récoltes.

Les isolats sont entretenus par un repiquage bimestriel sur milieu PDA incliné et les milieux ensemencés sont incubé à 28 C° pendant 5 à 7 jours puis conservés à 4 C° afin de garder la viabilité de la souche



Figure 7: Photographie des souches de *Botrytis cinerea* de droite à gauche

3. Choix du milieu de culture

Le milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) est utilisé tout au long de l'étude pour l'obtention de cultures en boîtes de Pétri. Ce milieu a été utilisé pour l'étude de la croissance mycélienne. Il a été préalablement autoclavé à 120°C pendant 20 minutes, puis coulés dans des boîtes de Pétri stériles. Le choix de ce milieu de culture est basé sur son adéquation pour un bon développement du pathogène.

4. Matériel de laboratoire

Au cours de notre travail, nous avons utilisé divers matériels et consommables de laboratoire à savoir : boîtes de Pétri en plastique de 9cm de diamètre, tubes eppendorf, Vortex, cones de pépétage, micro pipettes, bec Bunsen, incubateur, bain-marie, balance de précision, autoclave, plaque chauffante agitatrice, ect.

II. Méthodes

1. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction a été réalisée au laboratoire de physicochimie des aliments de l'université de Bejaia en utilisant la méthode de l'hydrodistillation (water distillation).

Cette méthode consiste en une distillation d'un mélange hétérogène d'eau et d'un liquide organique, non miscible à l'eau qui permet d'extraire à température assez basse (<100 C°) l'huile essentielle.

Protocole d'extraction

La matière végétale (100 g), constituée de boutons floraux, est introduite dans un ballon de 2 L rempli d'eau jusqu'au (2/3) de son volume. Ce dernier est ensuite mis à ébullition pendant 2 heures. Le ballon ainsi chauffé produit de la vapeur chargée de produits volatils. Cette vapeur se condense au contact d'un réfrigérant. Le condensât est ensuite recueilli dans une ampoule à décanter lieu où s'effectue la séparation des deux phases non miscibles : phase aqueuse et phase organique. Cette dernière constitue l'HE qui sera récupérée et conservée à une température de 4°C dans un flacon en verre fumé, en vue de son analyse. Le dispositif d'extraction est illustré dans la figure 8.



Figure 8: photographie d'un appareil pour l'hydrodistillation

Rendement de l'extraction

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile essentielle extraite et le poids du matériel végétal utilisé. Il est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante (Mrabkt *et al*, 1999).

$$\text{Rdt \%} = (\text{Mi} / \text{Mvs}) * 100$$

Avec : **Rdt %:** Rendement en HE.

Mi : Masse de l'huile essentielle extraite (g).

Mvs : Masse de la matière végétale sèche (g).

2. Préparation des complexes d'inclusion dans la phase aqueuse

Le complexe d'inclusion(β -cyclodextrine – HECG) a été obtenu par la méthode de lyophilisation décrite par Emerson Santos *et al* en 2014 avec certaines modifications.

Pour une ration de **1:1** nous avons ajouté **2,77 g** de β -cyclodextrine dans **75 ml** d'eau distillée préalablement chauffée à 50°C. Une fois la **β -cyclodextrine** dissoute dans l'eau, nous avons ajouté **0,5 g** de l'HE de **clou de girofle** et nous avons laissé le mélange en agitation pendant 24h, à l'abri de la lumière et à température ambiante. Le mélange ainsi obtenu a été congelé à -80 °C, puis lyophilisé pendant 48 heures. Le complexe d'inclusion obtenu a été conservé au réfrigérateur à +4°C jusqu'à utilisation.

3. Évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*

L'activité antifongique a été évaluée par la méthode de dilution en milieu solide pour déterminer les taux d'inhibition.

Repiquage des souches pathogènes

Les souches ALG66, ALG 227, BC1 de *B. cinerea* ont été repiquées sur milieu PDA et incubées à 22°C pour avoir des cultures jeunes de 3 à 4 jours. Le repiquage des souches est effectué par prélèvement d'un hyphe terminal après culture en boîte de Pétri sur un milieu PDA neuf. Les souches sont ensemencées au centre de la boîte. Le prélèvement a lieu lorsque le développement de la souche est suffisant.

Préparation des solutions de l'huile essentielle du clou de girofle et de complexe d'inclusion

En se basant sur des essais préalables, deux concentrations ont été préparées à savoir : 100 et 250 ppm. La concentration 1 (100 PPM) a été préparée par l'addition de 10

µl de l'huile essentielle de clou de girofle à 100 ml de milieu PDA en surfusion en ce qui concerne la gélose contenant l'huile essentielle de clou de girofle. Nous avons ajouté 65,2 mg du complexe d'inclusion à 100 ml de milieu PDA en surfusion pour la gélose contenant le complexe d'inclusion. La concentration 2 (250 PPM) a été préparée en rajoutant 25 µl de l'huile essentielle ou de 163 mg du complexe d'inclusion à 100 ml de milieu PDA en surfusion.

L'ensemencement

L'huile essentielle et le complexe d'inclusion ont été pesés, puis incorporés au milieu PDA en surfusion à 45°C de manière à obtenir la gamme souhaitée de concentrations. Le milieu est coulé à raison de 20 ml dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre. Après solidification, un disque mycélien de 5 mm de diamètre, prélevé sur une jeune colonie de trois jours de *B. cinerea*, est déposé au centre de la boîte. L'incubation a lieu à 22°C.

Un témoin sans traitement a été réalisé pour chaque souche.

Lecture

La croissance de filaments sur chaque boîte est relevée et il est procédé, à une mesure des diamètres de différentes colonies de champignons filamenteux pour calculer le taux d'inhibition (I %) (**Kordali et al., 2003**). Pour cette méthode, la technique consiste à mesurer les diamètres de champignon après le temps d'incubation requis. Le pourcentage d'inhibition (I) de la croissance mycélienne est calculé selon la formule suivante :

$$I(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

Où : **A** : diamètre des colonies témoins

B : diamètre des colonies traitées

Résultats et discussion

3. Résultats

L'activité antifongique de l'huile essentielle du Clou de girofle et du complexe d'inclusion a été évaluée *in vitro* vis-à-vis de trois souches de *Botrytis cinerea*; un champignon phytopathogène.

1.1. Le rendement d'extraction en HE

Le rendement de l'HE extraite par hydrodistillation à l'échelle de laboratoire à partir des clous de girofle est donné dans le tableau IV.

Tableau IV : Rendement d'extraction en HECG

	Huile du clou de girofle	Norme AFNOR	
		Minimum	maximum
Rendement (%)	3,5	5	8

D'après le tableau IV, nous avons enregistré un rendement faible en HE. Cette faiblesse de rendement est probablement due à une perte d'huile dans la phase aqueuse du distillat et la simplicité de notre dispositif d'hydro distillation. On peut dire qu'en terme de quantité et malgré ce pourcentage qui semble inférieur dans la pratique ce rendement reste satisfaisant pour mener notre étude.

En termes de valeurs, le rendement en huile essentielle du clou de girofle extrait est meilleur par rapport à celui signalé par Naili *et al.* (2013) qui a eu un rendement égal à 0.84%. Selon certains auteurs, la composition chimique et le rendement en HE varient suivant diverses conditions à savoir : la méthode employée, les parties végétales utilisées et les produits et réactifs utilisés pendant l'extraction, l'environnement, le génotype de la plante, son origine géographique, la période de récolte de cette plante, le degré de séchage, les conditions de séchage, la température et la durée de séchage, présence de parasites, de virus et mauvaises herbes (Naili *et al.*, 2013).

1.2. Évaluation de l'effet antifongique de l'huile essentielle du clou de girofle sur la croissance mycélienne de *B. cinerea*

L'activité antifongique de l'huile essentielle du clou de girofle et du complexe d'inclusion a été évaluée *in vitro* vis-à-vis de trois isolats (BC1, ALG 227, ALG66) de *Botrytis cinerea*. Elle est exprimée par le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne radiale (I%). Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures 14 et 15.

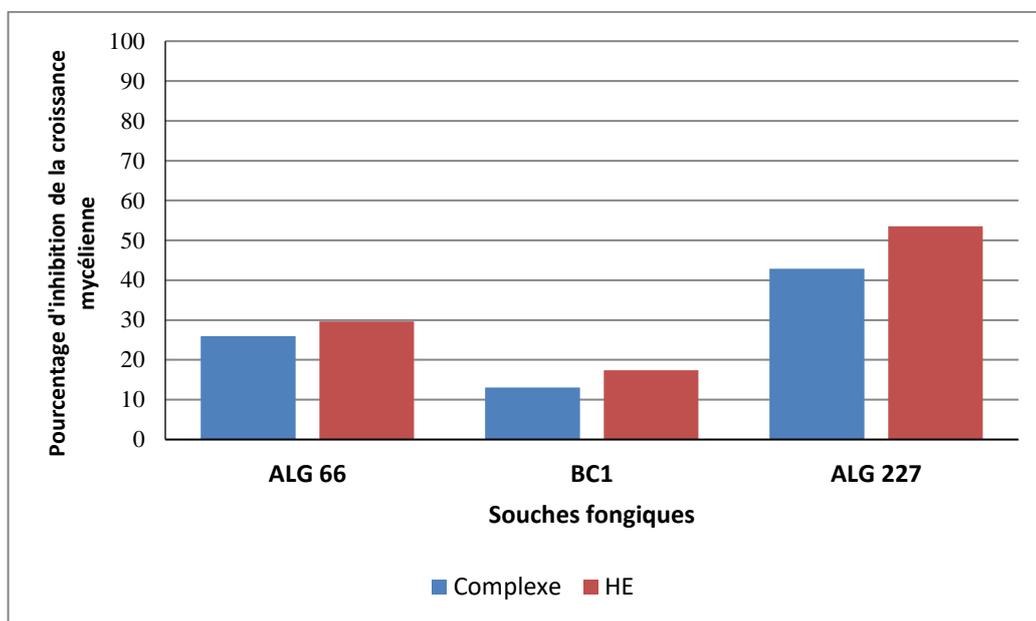


Figure 9 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des souches traitées par le complexe d'inclusion et l'huile essentielle du clou de girofle à 100 PPM

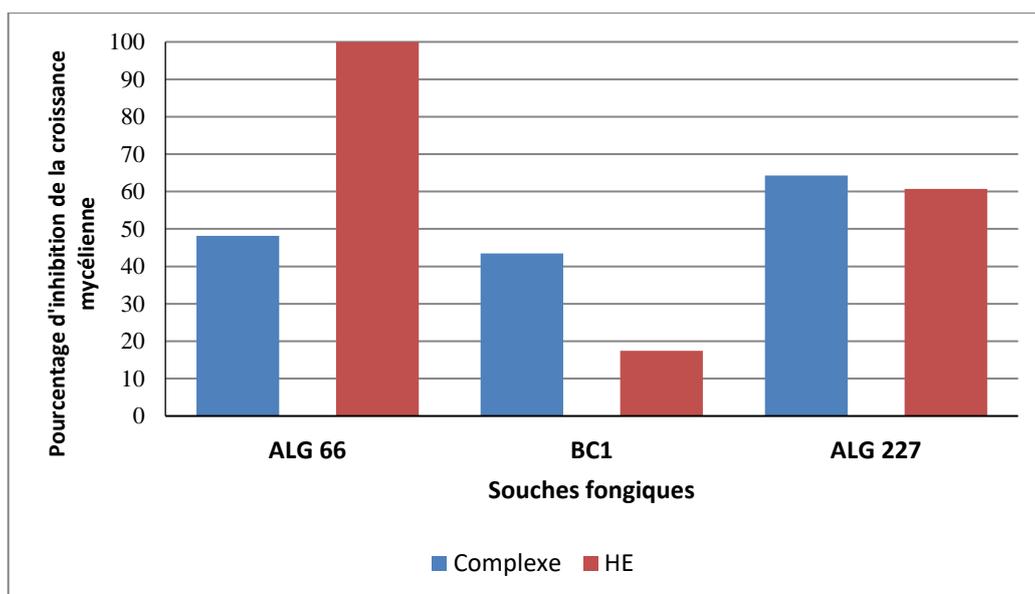


Figure 10 :Taux d’inhibition de la croissance mycélienne des souches traitées par le complexe d’inclusion et l’huile essentielle du clou de girofle à 250 PPM.

Les résultats indiqués dans les figures 14 et 15 montrent un pouvoir inhibiteur sur la croissance mycélienne radiale exercé par l’HECG et le CI. Il est à noter que le pourcentage d’inhibition augmente avec l’augmentation de la concentration.

A 100 ppm, le pourcentage d’inhibition de la croissance mycélienne de la souche ALG 66 par l’HE est faible (29,63 %). Cette valeur est supérieure à celle observée avec le CI (25,93%).

En ce qui concerne la souche ALG 227, le taux d’inhibition de l’HE à 100 PPM est de 53,57 %, le taux d’inhibition du CI 42,86 %. Ceci montre que l’activité antifongique de l’HE est plus élevée que celle du CI.

A 100 ppm le pourcentage d’inhibition de BC1 est faible en ce qui concerne la souche traitée par l’HE seulement (17,39 %), et le pourcentage d’inhibition de l’échantillon traité par le CI est beaucoup plus faible (13,04 %).

A 250 PPM l’HE a complètement inhibé la croissance radiale de ALG 66 et cet effet est observé pendant toute la durée de l’expérience. De plus le pourcentage d’inhibition à 250 ppm de ALG 66 par le CI est de 48,15 %, ceci montre que l’activité antifongique de l’HE est plus élevée par rapport à celle du CI sur la souche ALG66.

Dans le cas de ALG 227 lorsqu'elle est traitée avec l'HE et le CI à 250 ppm le pourcentage d'inhibition est respectivement de 64.29 % et 60.71 %, ceci montre que le taux d'inhibition n'est pas très élevée et ne varie pas vraiment si les souches sont traitées avec l'HE ou le CI.

En ce qui concerne la souche BC1, lorsqu'elle est traitée par le CI à 250 ppm le taux d'inhibition est de 43.48 %, donc le taux d'inhibition est faible, mais reste plus élevée par rapport à celui observé avec l'HE (17.39 %), ceci montre que l'activité antifongique du CI est plus élevée sur BC1 que celle de l'HE.

4. Discussion

Les résultats obtenus dans cette étude révèlent une inhibition significative par l'huile essentielle du clou de girofle et par le complexe d'inclusion de la croissance mycélienne des trois souches de *Botrytis cinerea*.

D'après les allures des graphiques présentés dans les figures (14 et 15), l'HECG et le complexe d'inclusion manifestent une activité inhibitrice vis-à-vis des souches fongiques testées variables selon plusieurs facteurs, dont la concentration de l'huile essentielle ou du complexe d'inclusion ainsi que de la souche fongique utilisée.

Il est à noter que l'HE de *Syzygium aromaticum* a exercé un effet inhibiteur de la croissance mycélienne considérable vis-à-vis de toutes les souches fongiques testées. La comparaison des taux d'inhibitions de la croissance mycélienne des différentes souches traitées avec cette huile révèle que la souche la plus sensible est ALG 227 à 100 PPM (53,57 %) et ALG 66 à 250 PPM (100 %) qui a été complètement inhibée tandis que la souche la plus résistante à l'action de cette huile est BC1 à 100 PPM et à 250 PPM (17.39 %).

En ce qui concerne le complexe d'inclusion, d'après les figures 14 et 15 la souche la plus sensible est ALG 227 à 100 PPM (42,86 %) et à 250 PPM (64.29 %) tandis que la

souche la plus résistante à l'action du complexe d'inclusion est BC1 à 100 PPM et 250 PPM.

A 250 PPM le taux d'inhibition de BC1 et ALG 227 par le complexe d'inclusion est plus élevée que celle de l'HECG, cela peut s'expliquer, car plusieurs études ont montré que l'encapsulation des molécules, en particulier l'Eug dans des complexes d'inclusion augmente leur solubilité aqueuse (**Hill et al., 2013 ; Kfoury et al., 2014 ;**), et de ce fait augmente son efficacité.

En effet, l'activité biologique des huiles essentielles est probablement liée à une relation avec les groupes fonctionnels des composants, leurs proportions et l'interaction entre eux (**Dorman et Deans, 2000**).

Le Clou du girofle est constitué principalement d'eugénol (72 à 84%) et **Neri et al. (2006)** ont rapporté que l'eugénol peut exercer, en fonction de sa concentration, une activité fongistatique ou fongicide sur *Botrytis cinerea*.

À travers ces résultats, on peut suggérer que l'activité antifongique de clou de girofle est due principalement à son profil chimique riche en l'eugénol qui est très actif contre différents micro-organismes. Ces composés sont solubles dans les milieux aqueux et provoquent d'importants dégâts sur les parois cellulaires des microorganismes (**Dorman & Deans, 2000**).

Des recherches récentes sur l'action antimicrobienne de l'eugénol a montré une perturbation de la membrane des champignons et des bactéries (**Gill et Holley, 2006**). Tous ces rapports suggèrent que ce mécanisme antimicrobien est dû à l'endommagement de la membrane. L'eugénol, connu pour être un composé lipophile peut pénétrer entre les chaînes d'acides gras qui composent la bicouche lipidique membranaire, altérant ainsi la fluidité et la perméabilité des membranes cellulaires (**Braga et coll., 2007**).

D'après **Gu et al. (2010)**, l'eugénol pourrait inhiber directement la croissance de *B. cinerea* *in vitro*. L'eugénol peut être utilisé dans le contrôle de *B. cinerea* et d'autres champignons phytopathogènes et peuvent également être considérés comme une alternative potentielle aux fongicides synthétiques.

Conclusion

L'huile essentielle de clou de girofle et son constituant majeur l'eugénol sont des composés aromatiques naturels qui se caractérisent par un large spectre d'activités biologiques. Toutefois, les constituants de l'HECG sont volatils, sensibles aux conditions environnementales et faiblement solubles dans l'eau.

Les huiles essentielles ouvrent une voie prometteuse dans la lutte contre les maladies en post-récolte des fruits. L'analyse de l'huile essentielle de clou de girofle obtenue par hydrodistillation a montré un pouvoir inhibiteur sur la croissance mycélienne de *B.cinerea*.

La valeur enregistrée du rendement en huile essentielle était de 3.5% .Cette valeur est supérieure par rapport aux proportions acquises auparavant par les études sur la même espèce.

Dans ce travail, nous avons évalué l'activité antifongique de l'huile essentielle de clou de girofle et celle du complexe d'inclusion sur un champignon parasite de tomate ; *B.cinerea* par la méthode de dilution en milieu solide pour déterminer les taux d'inhibition de la croissance mycélienne sur trois souches (ALG 227, ALG 66, BC1).

Les variations de l'activité antifongique évaluées sont liées à plusieurs paramètres dont la nature et la concentration de l'huile essentielle, la méthode d'application ainsi que la souche fongique utilisée.

Pour la mise en évidence de l'activité antifongique in vitro de l'huile essentielle, les résultats obtenus mentionnent le grand pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle du clou de girofle sur la croissance mycélienne de *B.cinerea*.

Ces résultats ne sont que la première étape préliminaire et méritent d'être poursuivis dans l'avenir afin d' :

- ✓ Élargir l'échantillonnage afin de confirmer les résultats obtenus dans cette étude.
- ✓ Étendre cette étude sur d'autres souches ;
- ✓ Étudier d'autres méthodes de préparation des complexes d'inclusion ;
- ✓ Réaliser une étude statistique.

Références bibliographiques

Abd El Azim MHM, El-Mesallamy AM, El-Gerby M, Awad A. (2014). Anti-tumor, antioxidant and antimicrobial and the phenolic constituents of clove flower Buds (*Syzygium aromaticum*). J Microb Biochem Technol 10 : 8-007.

Adefegha SA, Oboh G. (2012). In vitro inhibition activity of polyphenol-rich extracts from *Syzygium aromaticum* Merr. & Perry (Clove) buds against carbohydrate hydrolyzing enzymes linked to type 2 diabetes and Fe²⁺ -induced lipid peroxidation in rat pancreas. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2(10) : 774-781.

Afnor. (2000). Association française de normalisation. Normes française : huile essentielle. Ed. Afnor, Paris.

Antonopoulos A, Favetta P, Helbert W, Lafosse M. (2005). On-Line Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Characterization of κ - and ι -Carrageenans. Application to the Hybrid ι - ν -carrageenans. J Analytical Chemistry 77 : 4125-4136.

Arun R, Ashok Kumar CK, Sravanthi VVNSS. (2008). Cyclodextrins as drug carrier molecule : a review. Science Pharmaceutics 76 : 567-598.

Arung ET, Matsubara E, Kusuma IW, Sukaton E, Shimizu K, Kondo R.. (2011). Inhibitory components from the buds of clove (*Syzygium aromaticum*) on melanin formation in B16 melanoma cells. Fitoterapia 82(2) : 198-202.

Bachiega TF, de Sousa JPB, Bastos JK, & Sforcin JM. (2012). Clove and eugenol in noncytotoxic concentrations exert immunomodulatory/anti-inflammatory action on cytokine production by murine macrophages. Journal of Pharmacy and Pharmacology 64(4) : 610-616.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils A review. Food Chem Toxicology 46: 446-475.

Belhouan W, Boussaha A. (2017). Activité antifongique de trois huiles essentielles sur deux champignons pathogènes de la tomate; *Botrytis cinerea* et *Fusarium oxysporum*. Mémoire de Master. Université 8 Mai 1945 Guelma. 41 p.

Benhadi S. (2010). Greffage de cyclodextrines modifiées par traitement Corona sur matériaux cellulosiques, Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré Nancy 1. 155 p.

Besombes C. (2008). Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermo-mécanique d'herbes aromatiques: Applications généralisées thèse de doctorat. Université de La Rochelle. 289 p.

Billard A, Fillinger S, Leroux P, Bach J, Lanen C, Lachaise H, Beffa R, Debieu D. (2011). Fenhexamid resistance in the *Botrytis* species complex, responsible for grey mould disease. Fungicides—beneficial and harmful aspects. ed. Tech, Rijeka. France. Pp : 61-78.

Blancard D. (2009). Les maladies de la tomate, identifier, connaître maîtriser. In :ed. Quae. Paris. 691 p.

Boutelliez CB. (2009). Desulfovibrio spp dans la maladie parodontale, Interactions avec les cellules épithéliales KB et activité de l'amoxicilline libre ou complexée sur ses formes extracellulaires et intracellulaires, Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy-1. 186 p.

Božik M, Nový P, Klouček P. (2017). Chemical composition & antimicrobial activity of cinnamon, thyme, oregano & clove essential oils against plant pathogenic bacteria. Acta Univ. Agric. Silvic Mendel Brun 65 : Pp 1129–1134.

Braga PC, Sasso MD, Culici M, Alfieri M. (2007). Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. Fitoterapia 78 : 396-400.

Brewster ME, Loftsson T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, Sciences Direct. J Advanced Drug Delivery 59 : 645–666.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. In : Technique et Documentation Lavoisier. Paris. Pp : 418-419.

Castagne D. (2010). Etude des interactions entre les cyclodextrines et les membranes liposomes ou biologiques. Thèse Doctorat. Université de Liège. 135 p.

Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Mahmoud R, Mahdouani K, Bakhrouf A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential

oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*): a short review. *Phytotherapy Research* 21: 501-506.

Challa R, Ahuja A, Ali J. (2005). Cyclodextrins in Drug Delivery. *J AAPS Pharm SciTech* : 329-350.

Chardonnet CO, Sams CE, Trigiano RN, Conway WS. (2000). Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. *J Phytopathology* 90 : 769-774.

Charumanee S, Okonoki S, Sirithunyalug J. (2004). Improvement of the Dissolution Rate by Surface Solid Dispersion, *J CMU* (3): 77.

Clarot I, Cledat D, Guillaume YC, Cardot PJP. (2001). Chromatographic study of terpene- β -cyclodextrin complexes on porous graphitic carbon stationary phase. *J chromatographia* 54 : 447-453.

Corbez R. (1994). Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. (Eds) Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. Paris. 298 p .

Daniel CK, Lennox CL, Vries FA. (2015). In vivo application of garlic extracts in combination with clove oil to prevent postharvest decay caused by *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Neofabraea alba* on apples. *J Postharvest Biol Technol* 99 : 88–92.

Davet P, Rouxel F. (1997). Détection et isolement des champignons du sol. Paris. Cedex 07 : 147 p.

Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, H-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *J Molecular Plant Pathology* 13(4) : 414–430.

Decognet V, Ravetti F, Martin C, Nicot PC. (2010). Improved leaf pruning reduces development of stem cankers caused by grey mould in greenhouse tomatoes. *Agron. Sustain. Dev* 30: 465-472.

Demangel A. (2011). Faisabilité de la mise en place d'une Indication Géographique Sur le Clou de girofle, Thèse. Ecole supérieure d'Agro-Développement International ISTOM.

Dik AJ, Wubben J. (2007). Epidemiology of *Botrytis cinerea* Diseases in Greenhouses. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N. (eds) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Edition Springer, Dordrecht. Pp: 319-333.

Doijad C, Kanakal M, Manvi F. (2007). Effet of processing variables on dissolution and solubility of piroxam: Hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexe, *J of Pharmaceutical Sciences* 69 : 323- 326.

Dorman HJD, Deans SG. (2008). In Agents antimicrobiens des plantes: activité antibactérienne des huiles volatiles végétales. *J of Applied Microbiology* 88(2) : 308-316.

Drulis-Kawa Z, and Dorotkiewicz-Jach A. (2010). Liposomes as delivery systems for antibiotics. *Int J Pharm* **387** : 187– 198.

Elad Y, Stewart A. (2004). Microbial Control of *Botrytis* spp. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N. (eds). Springer Netherlands Pp:223-241.

Elad Y, Vivier M, Fillinger S. (2016). *Botrytis*, the good, the bad and the ugly. In *Botrytis The Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*; Fillinger, Eds.; Springer International Publishing: Basel, Switzerland. Pp : 1–15.

Elad Y, Yunis H, Katan T. (1992). Multiple resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. *Plant Pathology* 41 : 41-46.

Elad Y, Yunis H. (1993). Effect of microclimate and nutrients on development of cucumber gray mold (*Botrytis cinerea*). *J Phytoparasitica* 21: 257-268.

El-Azrak H. (2017). Extraction et distillation d'une plante aromatique et médicinale : *Rosmarinus officinalis*. Mémoire de Master. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès. 33 p.

Elmer PAG, Michailides TJ. (2004). Epidemiology of *B. cinerea* in orchard and vinein *Botrytis: biology, pathology and control*. Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.crops. Pp: 243-272.

Eman-Abdeen E, El-Diasty EM. (2015). Antifungal activity of clove oil on dermatophytes and other fungi. *Int. J Adv Res* 3 : 1299–1305.

Fleury G. (2005). Des polyrotaxanes de haute masse moléculaire au réseau topologique : les gels à points de réticulation glissants. Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur – Strasbourg I. 21 p..

Gabelica V, Galic N, De Pauw E. (2002). On the specificity of cyclodextrin complexes detected by electrospray mass spectrometry. *J Elsevier Science Inc* 13(8) : 946-953.

Garg A, Singh S. (2011). Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. *Colloid and surfaces B : Biointerfaces* 87 : 280-288.

Georgetti SR, Casagrande R, Di Mambro VM, Azzolini Ana ECS, Fonseca Maria JV. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the Chemiluminescence Methode. *AAPS Pharm Sci.* 5 (2) : 1-5.

Ghedira K, Goetz P, Le Jeune R. (2010). *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflie. *Phytothérapie.* 8(1) : 37-43.

Gill AO, Holley RA. (2006). Inhibition of membrane bound ATPase of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology* 111:170-174.

Gould S, Robert CS. (2005). 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. *J Food and Chemical Toxicology* 43 : 1451–1459.

Gu C, Pan H, Sun Z, Qin G. (2010). Effect of soybean variety on anti-nutritional factors content, and growth performance and nutrients metabolism in rat. *Int J Mol Sci* 11 (3): 1048-1056

Gülçin I, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. (2012). Antioxidant activity of clove oil-A powerful antioxidant source. *Arab J Chem* 5(4) : 489-499.

Hill M. (2009). Chemical product engineering-the third paradigm, *Comput. J Chem. Eng* 33 : 947–953.

Himed L. (2018). Évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citron (*Citrus limon*): encapsulation et application comme agent conservateur à la margarine allégée. Thèse de Doctorat. Université Frères Mentouri Constantine 1. 105 p.

Jarvis WR. (1977). Botryotinia and *Botrytis* species: Taxonomy, Physiology, and Pathogenicity. (Eds) Research Branch, Department of Agriculture. Canada. 195 p.

Jarvis WR. (1992). Managing diseases in greenhouse crops. In: Paul ST, Minn., U.S.A. APS Press American Phytopathological Society 288 p.

Karakasyan C. (2006). Fonctionnalisation de surfaces par l'intermédiaire du couple Adamantane/ β -cyclodextrine : Application du procédé pour l'élaboration d'un immunocapteur. Thèse de Doctorat. Université Paris XII-Val-de-Marne. 174 p.

Kfoury M. (2015). Préparation caractérisation physicochimique et évaluation des propriétés biologiques de complexes d'inclusion à base de cyclodextrines : applications à des principes actifs de type phénylpropanoïdes. Thèse de Doctorat. Université du Littoral Côte d'Opale. 189 p.

Khan MSA, Ahmad I. (2012). Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. J of Ethnopharmacology 140 : 416-423.

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

Koroch A, Ranarivelo L, Behra O, Juliani HR, Simon JE. (2007). Quality Attributes of Ginger and Cinnamon Essential Oils from Madagascar. In : ed by Janick and A. Issues in new crops and new uses. Alexandria. Pp : 338-341.

Kurokawa M, Nagasaka K, Hirabayashi T, Uyama SI, Sato H, Kageyama T, & Shiraki K. (1995). Efficacy of traditional herbal medicines in combination with acyclovir against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. Antiviral research 27(1-2) : 19-37.

Lis-Balchin M, (2002). Lavender: the genus *Lavandula*. ed : Taylor and Francis, London. Pp :155-200.

Liu H, Schmitz JC, Wei J, Cao S, Beumer JH, Strychor S, Zhao X. (2014). Clove extract inhibits tumor growth and promotes cell cycle arrest and apoptosis. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics 21(5) : 247-259.

Martinez F, Dubos B, Fermaud M. (2005). The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *J Phytopathology* 95: 692-700.

Mbaveng A. (2017). Epices et légumes médicinaux africains populaires, et leur effets sur la santé. In : ed. Kuete V. Epices médicinales et légumes d’Afrique. Cameroon. Pp : 611- 625.

Mónaco C, Dal Bello G, Rollán MC, Ronco L, Lampugnani G, Arteta N, Abramoff C, Aprea A, Larran S, Stocco M. (2009). Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato using naturally occurring fungal antagonists. *Arch Phytopathol Plant Prot* 42 : 729–737.

Muchamad M, Crouzet J. (1982). Composition de l’huile essentielle de clous de girofle de différentes provenances. In *Annales Techniques. VII Congrès International des Huiles Essentielles*. Montpellier, ed. Fedarom Grasse. 255-258.

Naili N, Kesraoui EP. (2013). Activité antibactérienne du Cumin velu *Ammodaucus leucotrichus*, Mémoire d’études médicales Spécialisées (DEMS) en Botanique médicale et Cryptogamie. 156 p.

Nasir A, Harikimar SL, Amanpreet K. (2012). Cyclodextrins: an excipient tool in drug delivery. *International Research. J of Pharmacy* 3 : 44-50.

Nicot Pc., Alain B. (1996). Integrated control of *Botrytis cinerea* on greenhouse tomatoes, In: Morris C E, Nicot P C, Nguyen-The C. *Aerial Plant Surface Microbiology*. (Eds) Springer. Boston. Pp: 169-189.

Oussala M, Caillet S, Saucier L. (2006). Lacroix m-antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat-meat science. 73 : 236-244.

Pereira MP, Teixeira RSS, Oliveira MAL, Silva M, Ferreira-Leitão VS. (2013). Optimized Atrazine Degradation by *Pleurotus ostreatus* INCQS 40310: an Alternative for Impact Reduction of Herbicides Used in Sugarcane Crops. *J Microbial & Biochemical Technology*. 12 : 1948-5948.

Pinto E, Silva LV, Calvaeiro C, Salgueiro L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida Aspersgillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology* 58 : 1454-1462.

Prasad RC, Herzog B, Boone B, Sims L, Waltner-Law M. (2005). An extract of *Syzygium aromaticum* represses genes encoding hepatic gluconeogenic enzymes. *Journal of ethnopharmacology* 96(1-2) : 295-301.

Prins TW, Tudzynski P, Von Tiedemann A, Tudzynski B, Ten Have A, Hansen M.E, Tenberge K, Van Kan JAL. (2000). Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. In: Kronstad J (ed) *Fungal Pathology*. 106 : 693–698.

Rakotoatimanana BV. (1999). Contribution à l'optimisation d'une unité de production d'huiles essentielles », mémoire de Master. Université d'Antananarivo. 73 p.

Robert M. (2007). Protection de la vigne contre *B. cinerea* et stimulation des mécanismes de défense à l'aide de Bacteria issues du vignoble champenois. Thèse Doctorat. Université de Reims Champagne. 198 p.

Romanazzi G, Feliziani E. (2015). *Botrytis cinerea* (Gray Mold). In *Postharvest decay Control Strategies*. *J of Berry Research* 6 : 47-63.

Šernaite L. (2020). Neringa Rasiukeviciute and Alma Valiuškaite. The Extracts of Cinnamon and Clove as Potential Biofungicides against Strawberry Grey Mould. *J plants* 9 : 613.

Singh J, Baghotia A, Goel SP. (2012). *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae). *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* Dis 3: 1469- 1475.

Staats M, Baarlen PV, Van Kan JAL. (2005). Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *J Molecular Biology and Evolution* 22(2) : 333-346.

Tharin M. (2002). Synthèse de polyéthers linéaires cycliques substitués par des cyclodextrines. Application en chromatographie gazeuse et électrophorèse capillaire. Thèse de Doctorat. Université de Neuchâtel. 198.

Treiner J. (2000). Extrait du Bulletin officiel n° 6 du 12 août 1999, France. 39-143.

Valnet J. (2007). Aromathérapie : traitement des maladies par les essences de plantes : se soigner par les huiles essentielles. ed : De France N. France. 545-613.

Viennot-Bourgin G. (1967). Les champignons parasites des plantes cultivées. Edition Masson. France. 1431p.

Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan JAL. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. J Molecular Plant Pathology 8: 561–580.

Xing Y, Xu Q, Li X, Che Z, Yun J. (2012). Antifungal activities of clove oil against *rhizopus nigricans*, *aspergillus flavus* and *penicillium citrinum* in vitro and in wounded fruit test. J of Food Safety 32 : 84-93.

Yang H. (2008). Beta-cyclodextrin complexation and formulation as an antihiv microbicide. Thèse de Doctorat. Université de Pittsburg. 201p.

Yoder OC, Whalen ML. (1975). Factors affecting postharvest infection of stored cabbage tissue by *Botrytis cinerea*. Canadian Journal of Botany 53: 691-699.

Yourman LF, Jeffers SN. (1999). Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*.. Plant Disease 83 : 569-575.

Yukawa TA, Kurokawa M, Sato H, Yoshida Y, Kageyama S, Hasegawa T, Shiraki K. (1996). Prophylactic treatment of cytomegalovirus infection with traditional herbs. Antiviral research 32(2) : 63-70.

Yunis H, Elad Y, Mahrer Y. (1990). Effects of air temperature, relative humidity and canopy wetness on gray mold of cucumbers in unheated greenhouses. J Phytoparasitica 18: 203-215.

Zafar N, Fessi H, Elaissari A. (2014). Cyclodextrin containing biodegradable particles: From preparation to drug delivery applications. International Journal of Pharmaceutics. VI 461 : 351-366.

Zellagui A, Gherraf NM, Hegazy EF, Akkal S, Rhouati S, Dendougui H, Ahmed AA. (2012). Phytochemical investigation and antimicrobial activity of the roots of *Ferula vesceritensis*. Chemistry of Natural Compounds. J of chemistry of natural compounds 48(5) :891-892.

Résumé :

L'objectif de cette étude est de limiter l'utilisation des antifongiques dans le traitement de quelques pathologies et de trouver d'autres solutions alternatives. L'activité antifongique de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* est étudiée dans le présent travail contre trois souches de *Botrytis cinerea*. L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydro distillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. L'activité antifongique a été évaluée par la méthode de dilution en milieu solide pour déterminer les taux d'inhibition. L'huile essentielle et le complexe d'inclusion ont révélé une activité antifongique puissante. Les variations de l'activité antifongique évaluées sont liées à plusieurs paramètres dont la nature et la concentration de l'huile essentielle et celle du complexe d'inclusion, la méthode d'application ainsi que la souche fongique utilisée. Ces résultats suggèrent que l'huile essentielle étudiée et le complexe d'inclusion peuvent constituer à priori des véritables alternatives dans le contrôle des champignons phytopathogènes.

Mots clés : Huile essentielle - Cyclodextrine - *Syzygium aromaticum* - *Botrytis cinerea* - Activité antifongique .

Abstract :

The objective of this study is to limit the use of antifungal agents in the treatment of some pathologies and to find alternative solutions. The antifungal activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* is studied in the present work against three strains of *Botrytis cinerea*. The extraction of the essential oils was performed by hydro distillation using a Clevenger type apparatus. The antifungal activity was evaluated by the solid-state dilution method to determine the inhibition rates. The essential oil and the inclusion complex showed potent antifungal activity. The variations in antifungal activity evaluated are related to several parameters including the nature and concentration of the essential oil and the inclusion complex, the method of application and the fungal strain used. These results suggest that the studied essential oil and the inclusion complex, can constitute real alternatives in the control of the phytopathogenic fungus.

Key words : Essential oil - Cyclodextrin - *Syzygium aromaticum* - *Botrytis cinerea* - Antifungal activity .