



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Ecole Nationale Supérieure Agronomique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة

Département : Productions végétales

القسم: الإنتاج النباتي

Spécialité : Ressources génétiques et
amélioration des productions végétales

التخصص: الموارد الوراثية وتحسين
الإنتاج النباتي

Mémoire De Fin D'études

Pour L'obtention Du Diplôme De Master

THEME

**Développement et formulation de produits phytosanitaires
(fongicide et insecticide) à base du microbiome des plantes**

Présenté par : **ZAUCHE Rania**

Soutenu Publiquement le 13/11/2024

Devant le jury composé de :

Président : **M. KADRI Adel** (MCA- ENSA)

Promoteur : **M. RAHMOUNE Bilal** (MCA- ENSA)

Examineur : **M. MEFTI Mohamed** (Prof- ENSA)

Promotion : 2019-2024

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|------|
| Liste des tableaux..... | vii |
| Liste des figures..... | viii |
| Liste des abréviations..... | ix |
| Liste des Annexes..... | x |
| INTRODUCTION GENERALE..... | 1 |
| SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 4 |
| CHAPITRE 1 : MICROBIOTE BENEFIQUE..... | 4 |
| 1. Définition et généralités sur le microbiome des plantes..... | 4 |
| 2. Bactéries phyllosphériques..... | 4 |
| 2.1. Modes d'action des bactéries phyllosphériques..... | 5 |
| 2.1.1. Modes directs..... | 6 |
| 2.1.1.1. Antibiose..... | 6 |
| 2.1.1.2. Quorum sensing et quenching..... | 6 |
| 2.1.1.3. Compétition nutritive et spatiale..... | 7 |
| 2.1.1.4. Métabolites secondaires et activités enzymatiques..... | 7 |
| 2.1.1.5. Composés organiques volatils (VOC's)..... | 8 |
| 2.1.1.6. Sidérophores..... | 8 |
| 2.1.2. Induction de la résistance systémique..... | 9 |
| 2.2. Bactéries rhizosphériques..... | 9 |
| CHAPITRE II : FORMULATION A BASE DE CONSORTIA..... | 11 |
| 1. Définition d'un biopesticide..... | 11 |
| 2. Types de biopesticides..... | 11 |
| 3. Avantages des biopesticides..... | 12 |
| 4. Limites des biopesticides..... | 12 |
| 5. Biopesticides à base microorganismes et bactéries bénéfiques..... | 12 |
| 6. Consortia de bactéries..... | 13 |
| 7. Avantages de l'utilisation des consortia..... | 14 |
| 8. Formulations..... | 15 |

| | |
|--|----|
| 8.1. Définition..... | 15 |
| 8.2. Principes et fonctions de la formulation..... | 15 |
| 8.2.1. Principes..... | 15 |
| 8.2.2. Fonctions..... | 15 |
| 8.3. Types de formulations..... | 15 |
| 8.3.1. Formulations liquides | 15 |
| 8.3.1.1. Emulsions..... | 15 |
| 8.3.1.2. Suspensions concentrées..... | 15 |
| 8.3.1.3. Dispersion huileuse..... | 16 |
| 8.3.1.4 Encapsulation..... | 16 |
| 8.3.2. Formulations sèches/solides..... | 16 |
| 8.3.2.1. Poudres..... | 16 |
| 8.3.2.2. Poudres destinées au traitement des semences..... | 16 |
| 8.3.2.3. Granules..... | 16 |
| 8.3.2.4. Granules dispersibles dans l'eau..... | 16 |
| CHAPITRE III : INTRODUCTION AU BIOCONTRÔLE..... | 17 |
| 1. Historique du contrôle des maladies des plantes..... | 17 |
| 2. Historique du biocontrôle..... | 19 |
| 3. Utilisation de la lutte biologique..... | 20 |
| 3.1. Généralités sur la lutte biologique..... | 20 |
| 3.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> comme biopesticide..... | 20 |
| 3.3. Huiles essentielles en lutte biologique..... | 21 |
| 4. Utilisation de l'ingénierie du microbiome dans le biocontrôle des pathogènes..... | 21 |
| MATÉRIEL ET MÉTHODES..... | 23 |
| 1. Objectif du travail | 23 |
| 2. Lieu d'expérimentation..... | 23 |
| 3. Matériel utilisé..... | 23 |
| 3.1. Matériel végétal..... | 23 |
| 3.2. Matériel bactérien..... | 23 |
| 3.3. Matériel fongique..... | 23 |

| | |
|--|----|
| 4. Méthodes de travail..... | 24 |
| Partie 1 : Isolement et caractérisation des souches PGPP..... | 24 |
| 4.1. Prélèvement des échantillons, isolement et purification des souches PGPP..... | 24 |
| 4.1.2. Isolement des souches PGPR..... | 24 |
| 4.1.2.1. Pectinase..... | 24 |
| a. Préparation de la solution mère..... | 25 |
| b. Série de dilutions..... | 25 |
| c. Isolement..... | 25 |
| 4.1.2.2. Cellulase..... | 25 |
| 4.1.2.3. Lipase..... | 25 |
| 4.1.2.4. Protéase..... | 26 |
| 4.2. Sélection et purification des souches PGPP..... | 26 |
| 5. Identification et caractérisation des PGPR..... | 27 |
| 5.1. Caractéristiques culturelles..... | 27 |
| 5.2. Caractéristiques morphologiques..... | 27 |
| 5.3. Caractérisation biochimique..... | 27 |
| Production d'ammoniac..... | 27 |
| Production de cyanure d'hydrogène..... | 28 |
| 5.4. Activités enzymatiques..... | 28 |
| Test catalase..... | 28 |
| Test oxydase..... | 28 |
| 5.5. Potentiel enzymes lytiques..... | 28 |
| a. Test amylase.. .. | 28 |
| B. Test protéase..... | 29 |
| C. Activité estérasique et lipasique..... | 29 |
| D. Activité pectinase..... | 29 |
| E. Activité cellulase..... | 29 |
| Partie 2 : Evaluation de l'activité antifongique..... | 29 |
| 6. Confrontation <i>in vitro</i> | 29 |
| 7. Développement et élaboration des formules de biopesticides..... | 30 |

| | |
|---|----|
| 7.1. Compatibilité de souches isolées..... | 30 |
| Partie 3 : Extraction de l'ADN..... | 30 |
| 8. Analyse de la qualité et la quantité de l'ADN par Nano Drop..... | 31 |
| 9. Analyses statistiques des données..... | 32 |
| RÉSULTATS ET DISCUSSION..... | 33 |
| 1. Isolement des bactéries phyllosphériques..... | 33 |
| 2. Sélection des souches..... | 34 |
| 3. Identification et caractérisation des PGPP..... | 36 |
| 3.1. Caractéristiques culturelles..... | 36 |
| 3.2. Caractéristiques microscopiques..... | 36 |
| 3.3. Caractéristiques biochimiques..... | 38 |
| 3.3.1. Production d'ammoniac..... | 38 |
| 3.3.2. Cyanure d'hydrogène..... | 39 |
| 4. Activités enzymatiques..... | 40 |
| 4.1. Test oxydase..... | 40 |
| 4.2. Test catalase..... | 41 |
| 5. Potentiel enzymes lytiques..... | 42 |
| 5.1. Test amylase..... | 42 |
| 5.2. Production de lipase..... | 43 |
| 5.3. Production d'estérase..... | 45 |
| 5.4. Production de protéase..... | 46 |
| 5.5. Activité cellulase..... | 48 |
| 5.6. Activité pectinase..... | 49 |
| 6. Activité antifongique..... | 50 |
| 7.1. Effet des PGPP sur <i>Alternaria sp.</i> | 50 |
| 7.2. Effet des PGPP sur <i>Colletotrichum sp.</i> | 52 |
| 7. Compatibilité des souches isolées..... | 54 |
| 8. Extraction d'ADN..... | 55 |
| Discussion..... | 56 |
| CONCLUSION GENERALE..... | 62 |

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....64
Annexes.....81

Abstract :

Chemical pesticides have terrible consequences on environment and human health. Biological agriculture arouses populations' attention worldwide. In this context, microbes based pesticides constitute a sustainable alternative to chemical pesticides and are to develop for a serious and efficient application on a large scale. This study aims to isolate and characterize morphologically and biochemically nine Plant Growth Promoting Phyllobacteria "PGPP" strains from the phyllosphere of medicinal plants, for their future exploitation in bacterial consortia based biopesticides. The strains' isolation was done on lytic enzymes specific media then the selection was made to characterize the selected PGPP strains and evaluate their antifungal activity against two fungal pathogens as well as their compatibility. These ones are Gram positive or negative bacillus, with a strong smell, mostly smooth regular aspect and a whitish color. These PGPP strains produce oxidase, catalase and secondary metabolites like hydrogen cyanide and ammonia. The majority of the isolates revealed their noteworthy capacity to produce lytic enzymes like amylase, cellulase, esterase, lipase, pectinase and protease, especially the strains S1 and S6. The antifungal activity evaluation reveals that the strains S1, S4 and S9 have the most interesting biocontrol potential against the pathogen *Alternaria sp.* whereas the strains S1, S8 and S9 have the best potential against the pathogen *Colletotrichum sp.* . The compatibility evaluation was positive for all the strains, which widens the biopesticide formulation spectrum. This work results in isolation and characterization of PGPP strains of which S1, S8 and S4 stood out thanks to their high antifungal activity whereas the other strains resulted in diverse interesting enzymatic activities.

Key Words : PGPP, Biocontrol, Lytic enzymes, Antifungal activity, Biopesticide.

Résumé :

Les pesticides chimiques ont de graves conséquences sur l'environnement et la santé humaine. L'agriculture biologique suscite l'attention des populations à l'échelle mondiale. Dans ce contexte, les pesticides microbiens forment une alternative durable aux pesticides chimiques et sont à développer pour une adoption sérieuse et efficace à grande échelle. L'objectif de cette étude consiste à isoler et caractériser morphologiquement et biochimiquement neuf souches Plant Growth Promoting Phyllobacteria « PGPP » issues de la phyllosphère de plantes médicinales, pour leur exploitation ultérieure dans la formulation de biopesticides composés de consortia bactériens. L'isolement des souches s'est déroulé sur des milieux spécifiques aux enzymes lytiques puis la sélection a donné suite à la caractérisation des souches PGPP sélectionnées, ainsi que l'évaluation de leur activité antifongique contre deux champignons phytopathogènes et les tests de compatibilité. Celles-ci sont des bacilles à Gram positif ou négatif, dégageant de fortes odeurs, ayant un aspect majoritairement régulier, lisse et une couleur blanchâtre. Ces souches Plant Growth Promoting Phyllobacteria « PGPP » produisent l'oxydase et la catalase ainsi que les métabolites secondaires comme le cyanure d'hydrogène et l'ammoniac. La majorité des isolats ont montré une capacité remarquable à sécréter des enzymes lytiques telles que l'amylase, la cellulase, l'estérase, la lipase, la pectinase et la protéase, en particulier les souches S1 et S6. L'évaluation de l'activité antifongique révèle que les souches S1, S4 et S9 ont le potentiel de biocontrôle le plus intéressant contre le champignon *Alternaria sp.* et les souches S1, S8 et S9 contre le champignon *Colletotrichum sp.* . Les tests de compatibilité sont positifs pour toutes les souches entre elles, ce qui agrandit le spectre de formulation du biopesticide. Ce travail a abouti à l'isolement et caractérisation de souches PGPP dont S1, S4, S8 et S9 se sont démarquées pour leur plus forte activité antifongique tandis que les autres souches présentent différentes activités enzymatiques intéressantes.

Mots clés : PGPP, Biocontrôle, Enzymes lytiques, Activités antifongiques, Biopesticide.

ملخص :

المبيدات الكيميائية لها اثار خطيرة على البيئة وصحة الإنسان. إنّ الزراعة العضوية هي موضوع الساعة من شأنه أن يثير الاهتمام على مستوى العالم. وعليه، فإنّ المبيدات الميكروبية قد تشكل بديلا مستداما للمبيدات الكيميائية و لذا يجب تطويرها لاستعمالها بشكل جاد وفعال على نطاق واسع. تهدف هذه الدراسة لعزل وتوصيف تشكلي وكيميائي حيوي لتسع سلالات PGPP أصلها الجزء الهوائي لنباتات طبية، لاستغلالها لاحقا في تطوير مبيدات حيوية مكوّنة من اتحاد بكتيري. تمّ عزل السلالات في أوساط خاصة بالأنزيمات المحلّلة، يليه اختيار بتوصيف السلالات PGPP المنتقاة وكذا تقييم نشاطها ضد فطريين مسببين لأمراض نباتية وتقييم تطابقها. تعتبر هذه السلالات عصية بغرام ايجابي او غير ايجابي تصدر روائح قويّة، ذات جانب في الغالب معتاد، ناعم ولون ضارب الى الأبيض. تنتج هذه السلالات الاكسيداز، الكتلاز والمستقلبات الثانوية مثل سيانيد الهيدروجين و الامونيا الثلاثية الهيدروج. أظهرت اغلبية السلالات القدرة الهائلة لإفراز الانزيمات المحللة مثل الاميلاز، السيلولاز، الاستيراز، الليباز، البكتيناز والبروتياز خصوصا السلالات S1 و S6. كشف تقييم النشاط المضاد للفطريات المسببة للأمراض النباتية أنّ السلالات S1, S4, S9 لديها قدرات التحكم البيولوجي المفيد ضد الفطر *Alternaria sp.* بينما السلالات S1, S8 و S9 لديها قدرات التحكم ضد الفطر *Colletotrichum sp.* واخيرا، أظهرت التحاليل تطابقا بين كلّ السلالات، مما قد يسمح بتوسيع نطاق صياغة المبيدات الحيوية. هذه الدراسة سمحت الى عزل وتوصيف السلالات PGPP حيث ان السلالات S4, S8, S9 و S1. تميزت بنشاطها الكثيف ضد الفطر المسبب للأمراض النباتية بينما تقدم السلالات الأخرى أنشطه انزيميه مثيره للاهتمام.

كلمات مفاتيح: PGPP، تحكم بيولوجي، انزيمات محللة، نشاطات مضادة للفطريات، مبيد حيوي.