

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
28 novembre 2024 (28.11.2024)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2024/242547 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A01N 65/03 (2009.01) A01P 7/04 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/MA2024/050018

(22) Date de dépôt international :
22 mai 2024 (22.05.2024)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
60456 22 mai 2023 (22.05.2023) MA

(71) Déposant : UNIVERSITÉ MOHAMMED VI POLYTECHNIQUE [MA/MA] ; Lot 660, Hay Moulay Rachid, Benguerir (MA).

(72) Inventeurs : MAZAR, Adil ; Université Mohammed VI Polytechnique, Foug el Oued, Laâyoune, Laâyoune (MA). KOUISNI, Lamfeddal ; Université Mohammed VI Polytechnique, Foug el Oued, Laâyoune, Laâyoune (MA). MERGHOUB, Nawal ; Université Mohammed VI Polytechnique, Lot 660, Ben Guerir 43150, Benguerir (MA). SOBEH, Mansour ; Université Mohammed VI Polytechnique, Lot 660, Ben Guerir 43150, Benguerir (MA). YASRI, Aziz ; Institut National de la Recherche Agronomique, Direction générale, Avenue de la Victoire, B.P. 415, Rabat R.P. (MA). HAFSA, Jawhar ; Sahloul, Rue Tanit, Maison N°2, Code postal : 4054 Sousse (TN). EL BOUHSSINI, Mustapha ; Université Mohammed VI Polytechnique, Lot 660, Ben Guerir 43150, Benguerir (MA). EL FAKHOURI, Karim ; Université Mohammed VI Polytechnique, Lot 660, Ben Guerir 43150, Benguerir (MA). TAARJI, Noamane ; Université Mohammed VI Polytechnique, Lot 660, Ben Guerir 43150, Benguerir (MA).

(74) Mandataire : GOURGUE, Hicham ; Lot Ennacer N° 284, Benguerir 43150 (MA).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,

HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2(h))

(54) Title: RED ALGAE-BASED BIO-INSECTICIDE FOR CONTROLLING COCHINEAL, AND PREPARATION AND USE THEREOF

(54) Titre : BIO-INSECTICIDE A BASE D'ALGUES ROUGES POUR LA LUTTE CONTRE LA COCHENILLE, SA PREPARATION ET SON UTILISATION

(57) Abstract: The invention relates to the use of a composition based on red macroalgae extracts as a bio-insecticide for the prevention and treatment of infestations caused by insect pests such as the cochineal *Dactylopius opuntiae* (D. opuntiae). The macroalgae species can be selected from the class Florideophyceae, in particular the species *G. sesquipedale*, for example of the genus *Gelidium* or *Pterocladia*, but are not limited thereto.

(57) Abrégé : L'invention concerne l'utilisation d'une composition à base d'extraits de macroalgues rouges comme bio-insecticide pour la prévention et le traitement d'infestations causées par des insectes ravageurs comme la cochenille *Dactylopius opuntiae* (D. opuntiae). Les espèces de macroalgues peuvent être sélectionnées parmi la classe des Florideophyceae, notamment l'espèce *G. sesquipedale*, par exemple du genre *Gelidium* ou *Pterocladia*, mais ne se limitent pas à celles-ci.



WO 2024/242547 A1

BIO-INSECTICIDE A BASE D'ALGUES ROUGES POUR LA LUTTE CONTRE LA COCHENILLE, SA PREPARATION ET SON UTILISATION

L'invention se rapporte au domaine la prévention et du traitement d'infestations causées par des insectes ravageurs comme la cochenille *Dactylopius opuntiae* (*D. opuntiae*) sur diverses espèces végétales, notamment *Opuntia fucus-indica*.

ART ANTERIEUR

[001] *Opuntia fucus-indica* est une plante populaire au Maroc. Elle a été introduite au Maroc vers la fin du 16^e siècle (2017, Silva Fennica, 51(1B), id 1618. 22). La superficie cultivée en figuier de barbarie (cactus) a été estimée à 50 000 ha en 1998. Grâce au plan ambitieux du Maroc vert, la superficie totale a atteint plus de 150 000 ha en 2017 dont 40% est concentrée dans le sud-ouest du Maroc (2017, Silva Fennica, 51(1B), id 1618. 22) grâce à sa parfaite adaptation dans les zones arides.

[002] En 2014, des champs entiers du figuier de barbarie dans différentes régions du Maroc ont été ravagés par la cochenille sauvage de cactus *Dactylopius opuntiae*, dont la propagation a causé une destruction totale de ces cultures, ce qui a provoqué une diminution de la production et des pertes économiques importantes.

[003] L'expansion rapide de la cochenille sauvage a suscité l'intérêt pour des recherches sur des méthodes de contrôle alternatives, puisque la plupart des agriculteurs utilisent des insecticides synthétiques. Au Maroc, des progrès significatifs ont été réalisés dans le développement d'options de lutte intégrée pour contrôler cet insecte dévastateur, dont le recours aux variétés résistantes, l'utilisation des ennemis naturels et le développement de nouveaux biopesticides, qui est devenu une priorité dans le domaine de la recherche, car cette dernière est économiquement faisable, fiable et respectueuse de l'environnement.

[004] Les insecticides chimiques sont connus pour leur grande efficacité dans la lutte contre les insectes et les maladies des plantes et, en même temps, pour le maintien d'un rendement élevé des cultures (2018, Journal of Basic and Applied Sciences, 7(1), 104-110). Cependant, cette solution n'est pas durable à cause de son impact sur la santé humaine et sur l'environnement (2018, Journal of Basic and Applied Sciences, 7(1), 104-110). En effet, après son application, une partie de l'insecticide serait absorbée par la plante et, si elle n'est pas totalement dégradée, celle-ci pourrait être consommée par les humains et/ou les animaux. Une autre partie pourrait persister dans le sol après irrigation et se retrouver dans les nappes phréatiques. Ainsi, la transition vers des produits insecticides biosourcés est actuellement très souhaitable et recherchée.

[005] Dans la littérature, plusieurs extraits d'espèces d'algues rouges ont montré une activité insecticide élevée contre certains insectes. Par exemple, il a été rapporté que les extraits méthanoliques de *Jania rubens* et de *Galaxaura allongées* (algues rouges) ont une activité élevée contre le 3^e stade larvaire de *Culex pipiens* L. (Diptera : Culicidae) (2022, Saudi Journal of Biological Sciences, 29(2), 933-940). Un extrait d'acétate d'éthyle de *Laurencia nidifica* s'est avéré contenir un sesquiterpène halogéné appelé laurinterol qui a une activité insecticide contre le termite *Reticulitermes speratus* (2017, Rec. Nat. Prod, 11(1), 63-68). Mori et al. (2016), Tetrahedron Letters, 57(32), 3612-3617) ont isolé la palytoxine de *Chondria armata*, qui a montré

une activité mille fois supérieure contre les blattes américaines par rapport à l'acide domoïque, connu pour ses propriétés insecticides. Dans une autre étude, l'enyne cyclique (12E)-cis-maneonene-E a été isolée de *Laurencia papillosa* (algue rouge, collectée sur la côte saoudienne de la mer Rouge) et a montré un potentiel élevé en tant qu'insecticide naturel contre deux ravageurs, *Tribolium confusum* et les larves de moustiques *Culex pipiens* (2011, CLEAN–Soil, Air, Water, 39(8), 787-794).

[006] Cependant, aucune étude n'a été réalisée à ce jour sur la production d'un insecticide à partir de l'espèce *Gelidium Sesquipedale* (G.S) pour la lutte contre la cochenille qui a ravagé des milliers d'hectares de cactus au Maroc au cours des dernières années.

[007] Pour cette espèce, seules deux publications (brevets : US 2019/0335761 A1, JP 2014091709) mettent en avant son utilisation pour produire un extrait agissant comme éliciteur de la défense des plantes en stimulant des gènes de défense et en produisant des molécules capables de déclencher les mécanismes de résistance des plantes contre les maladies (1999, Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 55(2), 167-182 ; 1994, International Review of Cytology. Academic Press, 148, 1-36).). Ce mécanisme est complètement différent de celui de l'effet insecticide lorsque le produit agit directement sur les insectes. Nulle part, dans les brevets cités en haut ou tout autre document dans la littérature, on ne rapporte ou divulgue l'utilisation d'extraits de l'algue rouge (GS) comme insecticide ou pesticide contre la cochenille *Dactylopius opuntiae*.

BREVE DESCRIPTION DE L'INVENTION

[008] La présente invention a premièrement pour objet un agent insecticide utilisé dans le contrôle biologique de l'infestation de cultures végétales par la cochenille *Dactylopius opuntiae*, comprenant un extrait ou une combinaison d'extraits d'algues rouges.

[009] La présente invention concerne également une méthode pour produire un agent insecticide biosourcé contre la cochenille à savoir : *D. opuntiae* (nymphes, et femelles adultes) à base d'extraits d'algues rouges notamment du genre *Gelidium* ou *Pterocladia* comme les deux espèces *Gelidium. Sesquipedale* et *Pterocladia capillacea*, pour la protection des plantes notamment, *Opuntia fucus-indica*.

MISE EN OEUVRE DE L'INVENTION

[010] Dans un premier mode de réalisation, la biomasse végétale utilisée pour la préparation des extraits a été choisie parmi une *Florideophyceae*.

[011] Selon un deuxième mode de réalisation, les espèces de macroalgues utilisées pour la préparation des extraits sont choisies parmi les genres *Gelidium* et *Pterocladia*.

[012] Dans d'autres modes de réalisation, les macroalgues utilisées pour la préparation des extraits selon ladite invention sont soit récoltées de leurs habitats naturels, soit cultivées sous des conditions optimales contrôlées.

[013] Dans un autre mode de réalisation, les macroalgues utilisées pour la préparation des extraits sont collectés et lavés avec de l'eau de mer ou l'eau de robinet, ou plus préférablement avec de l'eau distillée. [014] Dans un autre mode de réalisation, les macroalgues peuvent être séchées par toute méthode de séchage connue de l'homme du métier. Avantagusement, le séchage est réalisé dans l'étuve ou avec de l'air chaud. Selon un mode préféré de réalisation, les macroalgues sont séchées pendant 6h à 6 mois, de préférence entre 1 et 6 jours.

[015] Selon un autre mode de réalisation, le séchage peut être réalisé à une température qui peut être de 50 à 90 °C. Avantageusement, le séchage peut être réalisé à une température comprise entre 55 et 70 °C. La biomasse est soumise par la suite à une étape de broyage.

[016] De manière avantageuse, ces macroalgues séchées sont fragmentées et broyées. L'homme du métier saura déterminer le rapport (masse (g)/volume (ml)) entre la quantité de la biomasse et le volume des solvants à utiliser. Avantageusement, le rapport varie entre 1/2 et 1/1000, préférentiellement de 1/3 à 1/50, plus préférentiellement de 1/5 à 1/20.

[017] Dans un autre mode de réalisation, les macroalgues broyées sont soumises à une étape d'extraction chimique en utilisant un solvant qui peut être à des concentrations de 70% à 100%.

[018] Dans un autre mode de réalisation, les extraits algales obtenus sont filtrés en utilisant des filtres de porosité de 0,1 à 1 µm (filtres de nitrocellulose ou PVDF) afin d'éliminer toute trace de résidus de biomasse.

[019] Dans un autre mode de réalisation, les solvants utilisés pour faire l'extraction sont évaporés en utilisant une méthode qui peut être un rotavapeur ou un « speedvac » ou toutes autres méthodes connues pour le séchage d'extraits.

[020] Dans un autre mode de réalisation particulièrement avantageux, l'agent insecticide à base d'extraits de macroalgues est utilisé pour son activité insecticide contre la cochenille *D. opuntiae*, permettant l'élimination des stades de développement nymphes et adultes dudit insecte.

[021] Dans un autre mode de réalisation particulièrement avantageux, l'agent insecticide contre la cochenille *D. opuntiae*, obtenu à base d'extraits de macroalgues, est formulé en utilisant des concentrations d'au moins 10%, d'au moins 5%, d'au moins 4%, d'au moins 3%, d'au moins 0.5% dudit extrait objet de la présente invention.

[022] Dans certains modes de réalisation, la formule d'extrait éthanolique des macroalgues a montré un taux de mortalité d'au moins 20%, d'au moins 40%, d'au moins 60%, d'au moins 80% et d'au moins 100% contre les nymphes de *D. opuntiae*.

[023] Dans certains modes de réalisation, la formule d'extrait éthanolique a montré un taux de mortalité d'au moins 20%, d'au moins 40%, d'au moins 60%, d'au moins 80% et d'au moins 100% chez les femelles adultes de *D. opuntiae*.

[024] Dans certains modes de réalisation, selon les extraits des espèces de macroalgues objets de cette invention utilisées pour la préparation d'agents insecticide, peuvent être également utilisés contre d'autres insectes ravageurs de plantes (plantations, cultures maraichères, arbres fruitiers, plantes ornementales, etc.).

[025] Dans d'autres modes de réalisation, cet extrait de macroalgues peut être combiné avec un ou plusieurs autres extraits de macroalgues, microalgues, plantes, microorganismes ou d'autres type de biomasse.

[026] Un autre mode de réalisation consiste à combiner l'extrait de macroalgues à des concentrations de 1 à 15 g/L ou plus avec du savon noir.

[027] Dans certains modes de réalisation, la formule peut également contenir d'autres constituants qui sont couramment utilisés dans l'industrie des insecticides, à savoir les stabilisants, les agents conservateurs, les additifs, et les agents tensio-actifs.

[028] Dans certains modes de réalisation particulièrement avantageux, la composition d'agent insecticide à base d'extrait éthanolique d'algues rouges, objet de ladite invention, est sous une forme liquide applicable par pulvérisation contre la cochenille, ou sous forme sèche ou solide combinée sur support (argiles, silices, terre de diatomée, cires, résines, polymères, etc.).

[029] L'extrait d'algues rouges utilisé selon la présente invention peut être solubilisé dans l'eau de robinet, l'eau distillée, le tampon phosphate ou dans les solutions de Tween 80 ou dans tout

solvant de formulation connu de l'homme du métier, avec des concentrations de 0.1% à 1% (w/w), avec ou sans utilisation de moyens de dispersion mécanique comme l'agitation par vortex, l'homogénéisation à taux de cisaillement élevée ou par ultrasonication, indépendamment de la vitesse d'homogénéisation ou la puissance de sonication.

[030] Dans un mode particulier d'utilisation, une méthode de préparation de formulation à faible énergie peut être adoptée pour le présent extrait afin de réduire sa concentration efficace, améliorer son absorption par les surfaces biologiques d'insectes et de plantes et prolonger sa stabilité.

[031] Dans un mode d'application, l'extrait d'algues, préalablement concentré et séché, peut être complètement solubilisé dans l'éthanol absolu à une concentration de 10 à 50 mg/ml, à l'aide d'homogénéisation simple au vortex ou avec assistance mécanique de sonication. En augmentant la concentration au-delà de 50 mg/ml, de grandes particules commencent à apparaître, même en utilisant l'ultrasonication ou un autre mode d'homogénéisation, à cause de la saturation de la solution.

[032] Dans un autre mode d'application, particulièrement avantageux, la solution éthanolique d'extrait d'algues, obtenue directement après filtration et avant évaporation du solvant, peut être utilisée directement pour la préparation de ladite formulation. La solution d'extrait peut être aussi concentrée par un rotavapeur ou un « speedvac » ou autres méthodes connues, mais celle-ci doit être arrêtée avant solidification de l'extrait. Un contrôle rapide de la concentration en utilisant un aliquote d'extrait éthanolique ou en maîtrisant les paramètres d'extraction et de séchage (e.g., rapport solvant/solide, temps, pression et température de séchage) pour atteindre une concentration bien déterminée, est nécessaire pour contrôler les paramètres de formulation, ainsi que la concentration de l'extrait d'algues dans les formulations finales.

[033] L'extrait d'algues fraîchement solubilisé dans l'éthanol, ou obtenu directement avant évaporation du solvant, ou après concentration légère de la solution, est injecté à l'aide d'une aiguille à seringue, avec un débit de 1 à 10 ml/min, dans de l'eau du robinet, l'eau distillée, le tampon phosphate ou dans une solution de savon noir préparée dans lesdites solvants, sous agitation légère avec barreau aimanté ou par vortex (e.g., 500 rpm), à un rapport de 5/5 à 1/9 (extrait éthanolique d'algue/solution aqueuse).

[034] Dans certains modes d'application, la solution éthanolique de l'extrait d'algues peut être déposée goutte-à-goutte sur la surface de la phase aqueuse, ou ajoutée d'un seul coup, à l'intérieur ou sur la surface de la phase aqueuse, mais dans ces cas une agitation plus puissante (e.g. 2000 rpm) de l'eau ou de la solution du savon noir doit être utilisée pour assurer une homogénéisation rapide des deux phases organique et aqueuse.

[035] La concentration de la solution éthanolique d'algues ainsi que le rapport extrait éthanolique d'algue/solution aqueuse doivent être bien maîtrisés pour contrôler la concentration du principe actif dans la formulation finale. Ainsi, une augmentation de la concentration de la phase organique en extrait d'algues ou une augmentation du rapport extrait éthanolique d'algues/solution aqueuse, augmentera la concentration du principe actif dans ladite formulation.

[036] La mixture fraîchement préparée en mélangeant la solution éthanolique d'extrait d'algues avec de l'eau ou une solution du savon noir est agitée pendant 5 à 60 minutes avec la même vitesse sélectionnée durant l'addition de la phase organique, pour assurer une diffusion complète de cette dernière dans la phase aqueuse. En augmentant le rapport extrait éthanolique d'algue/solution aqueuse, une durée d'agitation plus élevée sera nécessaire pour éviter

l'effondrement du système et ainsi la formation de grandes particules suspendues dans la phase aqueuse.

[037] L'éthanol présent dans la mixture préparée est complètement éliminé à l'aide d'un rota vapeur ou un « speedvac » ou autres méthodes connues, jusqu'à atteindre 50 à 90% du volume initial de la phase aqueuse ajoutée. Une évaporation prolongée, au-delà de 50% du volume initial de la phase aqueuse, risque de voir s'effondrer le système, en favorisant l'agrégation des particules et leur sédimentation contre les parois de récipient d'évaporation.

[038] Dans un autre mode d'application, le volume d'eau perdu durant évaporation peut être restitué avec de l'eau ou une solution de savon noir. Sinon, un recalcul de la concentration de l'extrait d'algues dans le système, en tenant compte le volume restant après évaporation d'éthanol, sera nécessaire. Les conditions de séchage (e.g., température, temps, pression) nécessaires pour atteindre la concentration souhaitée peuvent être fixés par l'homme de métier pour éviter le recalcul de concentration après chaque préparation.

[039] Les formulations préparées peuvent être stockées jusqu'à 6 mois à 5°C ou à température ambiante, sans risques d'agrégation ou de sédimentation. Toutefois, l'ajout d'agent antimicrobiens permettra d'éviter la contamination microbienne.

[040] Lorsque la formulation est conservée au réfrigérateur, ou à température ambiante au-dessous du point de fusion du savon noir, des particules solides peuvent apparaître dans la formulation à cause de la solidification du savon noir, sans causer aucun risque d'agrégation ou de changement des propriétés physico-chimiques du système. Ainsi, un simple chauffage à l'eau tiède restaura l'aspect initial translucide ou transparent de la formulation en fonction de la concentration du système.

DESCRIPTIFS DES FIGURES

[041] **Figure 1** : Montre l'activité insecticide de l'extrait algale utilisé seul contre les nymphes de la cochenille (*D. opuntiae*). L'effet de l'extrait éthanolique d'algue est étudié à différentes concentration (3, 4 et 5%) après 5 jours de son application.

[042] **Figure 2** : Montre l'activité insecticide de l'extrait algale utilisé contre les femelles de la cochenille (*D. opuntiae*). L'effet de l'extrait éthanolique d'algue seul est évalué à différentes concentration (3, 4 et 5%) après 8 jours de son application.

[043] **Figure 3** : Montre l'activité insecticide de l'extrait algale utilisé contre les nymphes de la cochenille (*D. opuntiae*). L'effet de l'extrait éthanolique d'algue est évalué à différentes concentration (3, 4 et 5%) après le traitement avec le savon noir à 15 g/L après 3 et 24h de son application.

[044] **Figure 4** : Montre l'activité insecticide de l'extrait algale utilisé contre les femelles adultes de la cochenille (*D. opuntiae*). L'effet de l'extrait éthanolique d'algue est évalué à différentes concentrations (3, 4 et 5%) après le traitement avec le savon noir à 15 g/L en fonction du temps (96, 120, 144, 168 et 192h).

[045] **Figure 5** : Montre l'activité insecticide des formulations de l'extrait d'algues contre les femelles adultes de la cochenille (*D. opuntiae*). L'effet de la formulation avec une concentration de 1.75% en extrait d'algue préparée avec de l'eau ou avec du savon noir à 2% est évalué avec ou sans cire protectrice au niveau des cladodes, après chaque 24h pendant 8 jours de son application.

[046] **Figure 6** : Montre l'activité insecticide des formulations de l'extrait d'algues contre les nymphes de la cochenille (*D. opuntiae*). L'effet de la formulation avec une concentration de 1.75% en extrait d'algue préparée avec de l'eau ou avec du savon noir à 2% est évalué après 4 jours de son application.

DESCRIPTION DETAILEE DE L'INVENTION

La présente invention peut être implémentée selon plusieurs exemples.

L'extrait d'algues utilisé dans les exemples ci-après a été préparé de la manière suivante : la biomasse macroalgale de l'espèce *G. sesquipedale* est lavée à l'eau distillée, séchée à l'étuve à 60 °C pendant 5 jours, broyée puis stockée pour des utilisations ultérieures. L'extraction de l'insecticide, est réalisée avec de l'éthanol dans un extracteur accéléré par solvant ASE 150, sous les conditions suivantes : température de 40 °C, rapport solide/liquide de 1/5 (p/v), temps d'extraction de 15 min et 3 cycles d'extraction. A la fin de l'extraction, l'extrait est séparé de l'éthanol à l'aide de l'évaporateur rotatif sous vide. Les extraits à base de macroalgues de l'espèce *Pterocladia* ont été obtenus selon le même procédé.

Exemple 1 : Evaluation de l'activité insecticide de l'extrait algal sur les nymphes de la cochenille (*D. opuntiae*).

[048] L'activité insecticide de l'extrait éthanolique d'algues rouges a été déterminée par application par contact direct dans des conditions de laboratoire à une température de 26 ± 2 °C, une humidité relative de 75 % et une photopériode de 14/10 h de lumière/obscurité. Le bloc aléatoire complet a été adopté comme dispositif expérimental en cinq répétitions par concentration pour chaque traitement. Cinq concentrations de l'extrait à l'éthanol (3, 4 et 5 %) ont été appliquées à l'aide d'un pulvérisateur à main de 1 litre contre les nymphes de *D. opuntiae*. Dix nymphes du premier stade de *D. opuntiae* ont été déposées séparément sur des cladodes non pulvérisés et non infestés de la même taille placés dans des boîtes de Pétri (9 cm de diamètre), y compris un témoin traité avec de l'eau uniquement. L'infestation artificielle sur les surfaces des cladodes a été réalisée en fixant chaque stade de *D. opuntiae* à l'aide d'une brosse entomologique. Tous les stades de *D. opuntiae* ont été collectés auprès des cladodes de cactus utilisés pour l'élevage en cages entomologiques. La mortalité des nymphes a été enregistrée après 5 jours. La mortalité a été examinée à l'aide d'un microscope binoculaire (Motic). Les nymphes mortes n'ont montré aucun mouvement et avaient des modifications de couleur.

[049] La figure 1 montre l'effet de l'extrait éthanolique d'algue sur la mortalité des nymphes de *D. opuntiae*. Les résultats montrent que l'extrait de macroalgue a un effet considérable sur les nymphes. L'application de l'extrait algale à une concentration de 3% a permis de tuer 83% de ces nymphes, 5 jours après traitement. Quand la concentration utilisée était de 4% et 5% le taux de mortalité a grimpé jusqu'à 92% et 95%, respectivement, 5 jours après traitement.

Exemple 2 : Evaluation de l'activité insecticide de l'extrait algal sur les femelles adultes de la cochenille (*D. opuntiae*).

[050] L'activité insecticide de l'extrait éthanolique d'algue sur les femelles adultes a été déterminée suivant le même protocole décrit en [048]. La mortalité des adultes femelles sans cire protectrice a été comptée toutes les 24 h pendant 8 jours après l'application des traitements.

[051] La figure 2 montre l'effet insecticide considérable de l'extrait éthanolique d'algue appliqué seul sur la mortalité des adultes femelles de *D. opuntiae*. L'application de l'extrait algale à une concentration de 3% a montré une mortalité de 70% des femelles, 8 jours après traitement. Tandis que les concentrations 4% et 5% a engendré des taux de mortalité de 73% et 87%, respectivement, 8 jours après traitement.

Exemple 3 : Evaluation de l'activité insecticide de l'extrait algal appliqué après le savon noir sur les nymphes de la cochenille (*D. opuntiae*).

[052] L'activité insecticide de l'extrait éthanolique d'algue rouge de l'espèce *G. sesquipedale* a été déterminée par application par contact direct dans des conditions de laboratoire à une température de 26 ± 2 °C, une humidité relative de 75 % et une photopériode de 14/10 h de lumière/obscurité. Une conception entièrement randomisée a été adoptée en utilisant cinq répétitions par concentration pour chaque traitement. Cinq concentrations de l'extrait à l'éthanol (3, 4 et 5 %) ont été appliquées après l'application du savon noir à 15 g/L à l'aide d'un pulvérisateur à main de 1 litre contre les nymphes de *D. opuntiae*.

La mortalité des nymphes a été enregistrée à 3 heures et 24 heures après le traitement. Deux témoins ont été considérés, un témoin traité avec de l'eau uniquement, et le deuxième traité avec le savon noir à 15 g/L.

[053] La figure 3 montre un effet insecticide prononcé des extraits éthanoliques sur les nymphes de *D. opuntiae*. Une efficacité qui varie considérablement en fonction de la concentration ainsi que le temps après le traitement. Après seulement 3h de son application, la combinaison de 3% d'extrait éthanolique avec 15 g/L du savon noir a provoqué la mortalité de 98% des nymphes. Pour les concentrations des extraits éthanoliques 4 et 5%, une mortalité totale a été enregistré pour les nymphes. Alors que l'application de l'eau seul n'a montré qu'un effet très limité (14% de mortalité) après 24h, tandis que l'effet du savon noir a montré une mortalité d'environ (42%) après 3h de son application à 15 g/L. Le traitement par le savon noir suivie de l'extrait d'algue éthanolique a provoqué une mortalité totale des nymphes de *D. opuntiae*, 24h après application.

Exemple 4 : Evaluation de l'activité insecticide de l'extrait algale appliqué après le savon noir sur les femelles adultes de la cochenille (*D. opuntiae*).

[054] L'activité insecticide de l'extrait éthanolique d'algue rouge sur les femelles adultes a été déterminée suivant le même protocole décrit en [048].

La mortalité des femelles adultes a été comptée toutes les 24 h pendant 8 jours après l'application des traitements. La mortalité a été examinée à l'aide d'un microscope binoculaire (Motic). Les femelles mortes ont révélé une dessiccation de leur corps et une couleur brun foncé.

[055] La figure 4 montre l'effet insecticide de l'extrait éthanolique sur la mortalité des femelles adultes de *D. opuntiae*. Il ressort des résultats obtenus que la concentration de l'extrait éthanolique ainsi que la durée du traitement ont un effet significatif sur la mortalité des femelles. L'effet insecticide de l'extrait éthanolique d'algue commence à augmenter d'une manière significative au-delà du quatrième jour après traitement, lorsque son application est précédée par l'application du savon noir à 15 g/L. Cette efficacité a dépassé 50% de mortalité des femelles pour la concentration 5% d'extrait d'algue.

La mortalité des femelles a augmenté significativement pour atteindre 36, 47 et 88% après 192h de traitement en utilisant respectivement 3, 4 et 5% de l'extrait éthanolique, précédé par le savon noir à 15 g/L.

Exemple 5 : Evaluation de l'activité insecticide des formulations à base de l'extrait algale sur des nymphes et des femelles adultes de la cochenille (*D. opuntiae*).

[056] Des formulations à base de l'extrait éthanolique d'algues de l'espèce *G. sesquipedale* ont été préparées en utilisant la méthode décrite préalablement [De 030 à 041]. Des solutions éthanoliques de 50 mg/mL de l'extrait séché ont été injectées directement à l'aide d'aiguilles à seringue avec un rapport extrait éthanolique d'algue/solution aqueuse de 2/8, dans de l'eau distillée ou une solution aqueuse du savon noir de 2%. L'injection a été réalisée avec un débit de 5 mL/min, sous agitation continue à une vitesse de 500 rpm, et a été prolongée pendant 15 min après injection complète de la solution éthanolique. Le volume du mélange final obtenu a été réduit jusqu'à 75% du volume initial de la phase aqueuse en concentrant la solution à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les formulations ont été stockées à 4°C jusqu'à utilisation et ont été chauffées à l'eau tiède directement avant application.

[057] La figure 5 montre que la formulation d'extrait algale avec la concentration de 1.75% préparée avec de l'eau a un effet insecticide très prononcé, qui a atteint une toxicité élevée des femelles *D. opuntiae* sans couche protectrice, dépassant 88%, 8 jours après traitement. Cette nouvelle formulation avec de l'eau seulement a provoqué également une mortalité supérieure des femelles protégé par la cire avec un pourcentage de 84%, 8 jours après traitement.

[058] La deuxième formulation d'extrait d'algue à 1.75% préparée avec 2% du savon noir comme détergent a provoqué une mortalité importante avec un taux de 76% des femelles *D. opuntiae* sans cire, seulement 4 jours après traitement. Cette efficacité a augmenté d'une manière significative allant jusqu'à 96%, 7 jours après traitement. Cette nouvelle formulation avec le savon noir a causé un taux de mortalité très élevé d'ordre 74% des femelles protégées par la cire, seulement 5 jours après traitement. Alors, que le savon noir seul a causé des taux de mortalités qui varie entre 34 et 24% des femelles sans cire, et ceux avec cire, respectivement, 8 jours après traitement.

Les deux formulations d'extraits d'algues de l'espèce *G. sesquipedale* n'ont provoqué aucune phytotoxicité au niveau des cladodes traités.

[059] La figure 6 montre l'effet insecticide des deux types de formulations sur les nymphes de la cochenille *D. opuntiae*. La formulation d'extrait d'algue à 1.75% préparée avec 2% du savon noir a provoqué une mortalité totale des nymphes de la cochenille, 4 jours seulement après traitement, suivi par la formulation d'extrait d'algue avec de l'eau avec 86%, 4 jours seulement après application.

[056] Les formulations préparées à base d'extraits d'algues en utilisant la méthode décrite préalablement [de 030 à 041] a permis une réduction de la concentration efficace de (3, 4 et 5%) à 1.75%, principalement contre les femelles adultes de la cochenille sans ou avec cire, toute en prolongeant la stabilité du système sans aucune agrégation ou sédimentation prononcée.

APPLICATION INDUSTRIELLE

Biopesticide, Bioinsecticide, Bioherbicide et Biofongicide.

REVENDICATIONS

1. Agent insecticide pour le contrôle biologique de l'infestation de cultures végétales par la cochenille *Dactylopius opuntiae*, caractérisé en ce qu'il comprend un extrait ou une combinaison d'extraits d'algues rouges.
2. Agent insecticide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une composition à base d'extraits d'algue rouge, formulée pour la protection biologique de culture de cactus *Opuntia ficus-indica*.
3. Agent insecticide selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que les extraits d'algue rouge soient obtenus à partir de macroalgues de la classe des *Florideophyceae*, notamment du genre *Gelidium* et/ou *Pterocladia*, utilisés seuls ou en association, et plus particulièrement des espèces *G. sesquipedale* et *P. capillacea* du.
4. Agent insecticide selon l'une au moins des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la formule développée comprenne de 0.1% et 10% en poids d'extrait d'algue rouge par rapport au poids total de la formule développée.
5. Procédé pour la préparation d'un agent insecticide selon l'une au moins des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la température de séchage de la macroalgue utilisée pour obtenir l'extrait ou la combinaison d'extraits d'algues rouges soit comprise entre 50 et 65°C.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que les extraits soient obtenus par un prétraitement mécanique de la matière sèche, suivi d'une extraction avec des solvants choisis parmi l'eau, les alcools, notamment l'éthanol, ou d'autres solvants organiques.
7. Procédé selon les revendications 5 et 6 d'une formule améliorée de l'agent insecticide, au moyen d'une méthode à faible énergie, permettant l'amélioration de la stabilité de l'agent insecticide et la réduction de la concentration efficace contre les femelles et les nymphes de *Dactylopius opuntiae*.
8. Procédé selon les revendications 5 à 7, caractérisée en ce que les formules améliorées soient préparées directement avant évaporation du solvant ou après légère concentration de la solution par évaporation.
9. Procédé selon les revendications 5 à 8, caractérisé en ce que les formules améliorées soient concentrées jusqu'à atteindre 50 à 90% du volume initial de la phase aqueuse.
10. Procédé selon les revendications 5 à 9, caractérisé en ce que les formules améliorées soient préparées par injection, déposition goutte-à-goutte ou addition d'un seul coup de la solution éthanolique de l'extrait d'algue dans ou sur la surface de la phase aqueuse ou d'une solution de savon noir à 2%.
11. Procédé selon les revendications 5 à 10, caractérisé en ce que les formules améliorées soient préparée avec une solution de 10 à 50 mg/ml d'extrait éthanolique d'algue rouge, dans un rapport volumique de 5/5 à 1/9 d'extrait éthanolique d'algue/solution aqueuse.

12. Utilisation d'un agent insecticides selon l'une au moins des revendications 1 à 4, pour le contrôle biologique de l'infestation de cultures végétales par la cochenille *Dactylopius opuntiae*, sous forme sèche en combinaison avec un support choisi parmi billes d'argile, polymères, silices ou résines ou sous forme liquide, préférentiellement sous forme liquide applicable par pulvérisation.

13. Utilisation de l'agent insecticide selon la revendication 12, caractérisée en ce que la formule développée, dite améliorée, soit utilisée seule ou en association avec un autre extrait ou substance naturelle telle que extraits de plantes, macroalgues, ou microalgues, ou une substance chimique telle que adjuvants, émulsifiants, conservateurs, stabilisants.

14. Utilisation de l'agent insecticide selon la revendication 12 ou de sa formule améliorée selon la revendication 13, dans protection biologique de culture de cactus *Opuntia ficus-indica* contre les femelles et les nymphes de *Dactylopius opuntiae*.

Figure 1

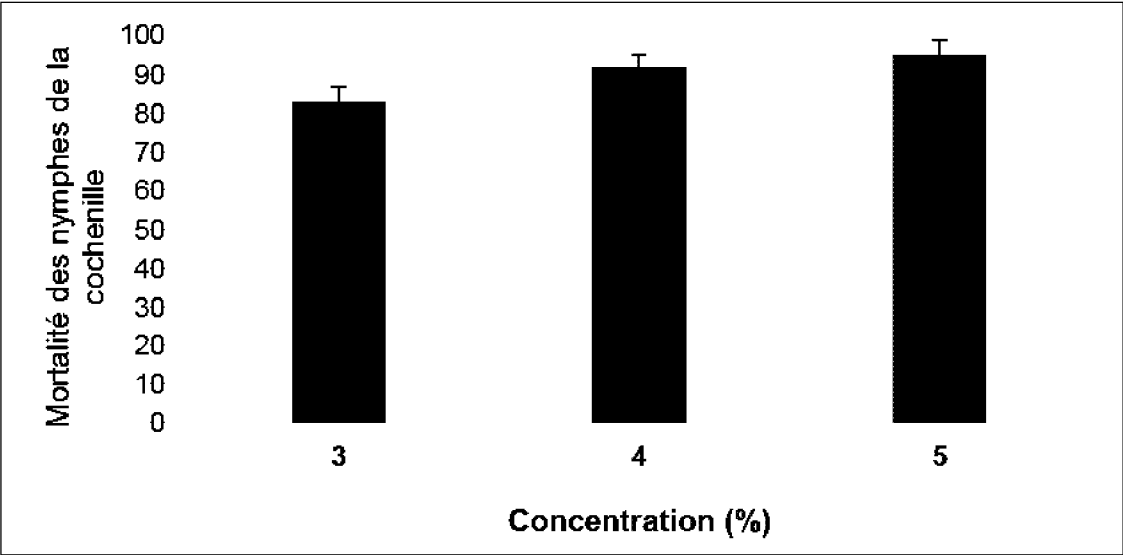


Figure 2

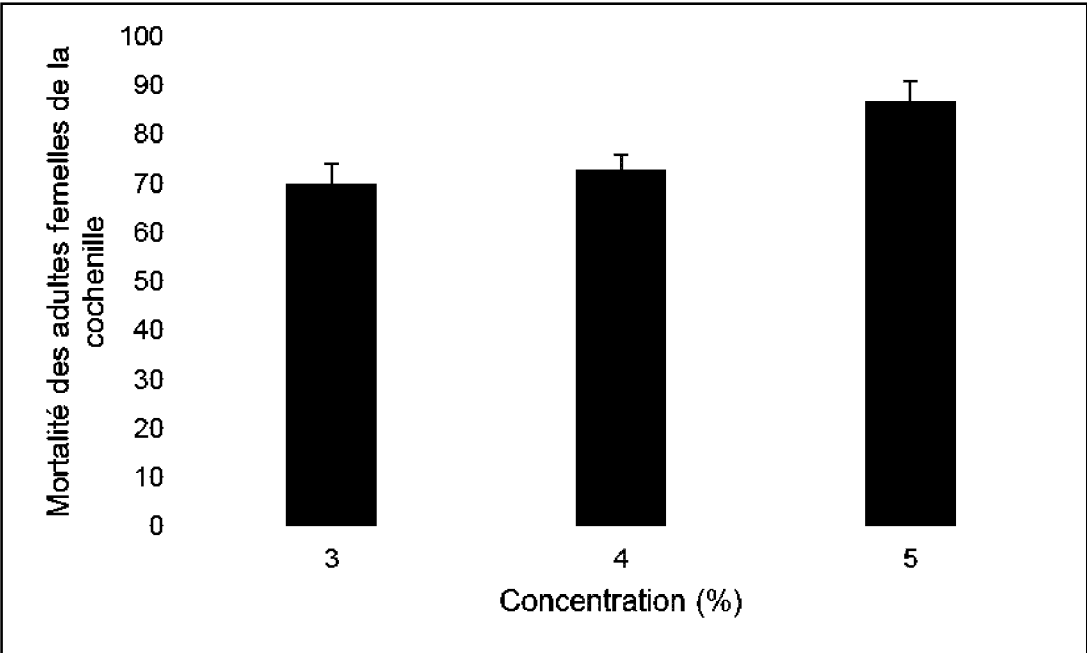


Figure 3

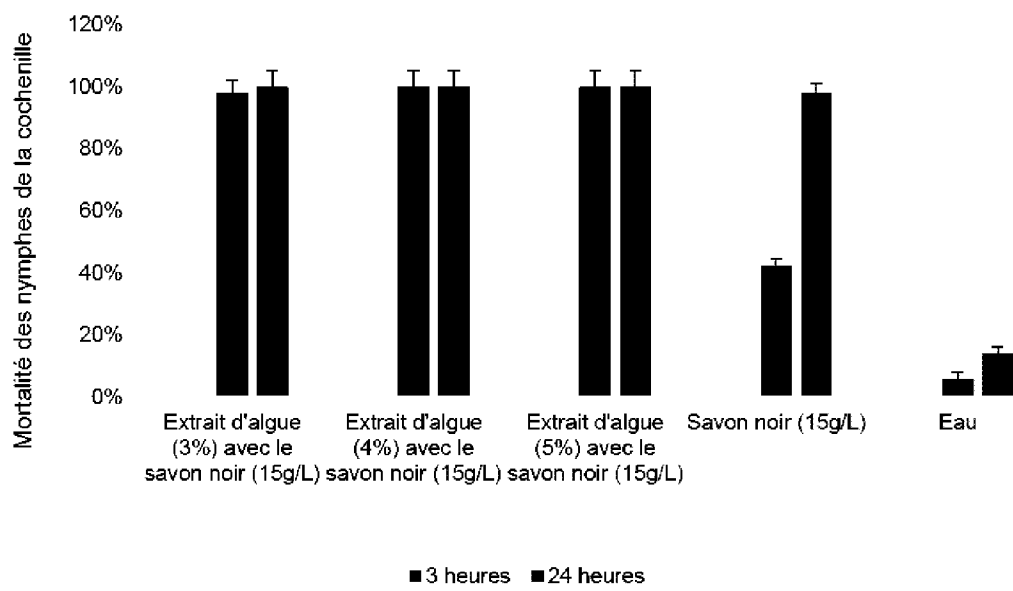


Figure 4

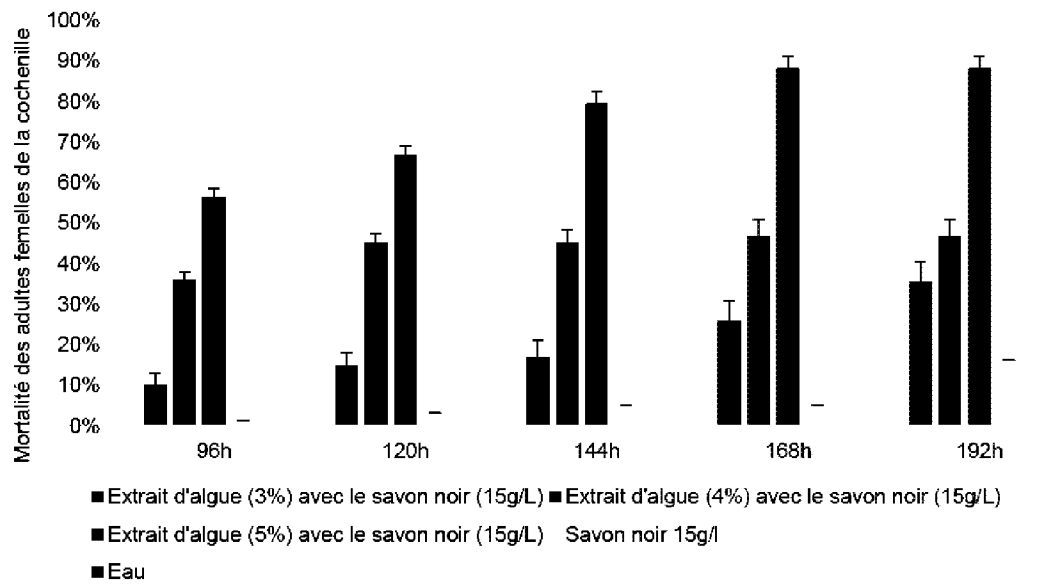


Figure 5

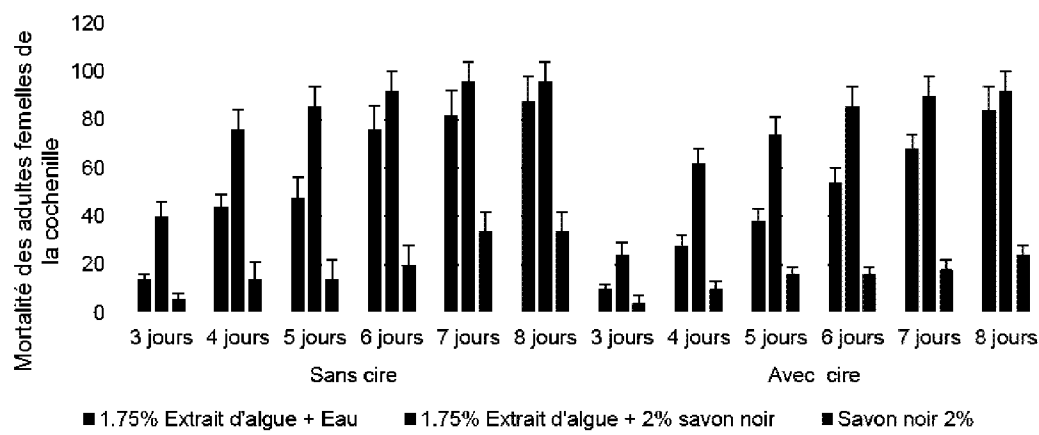
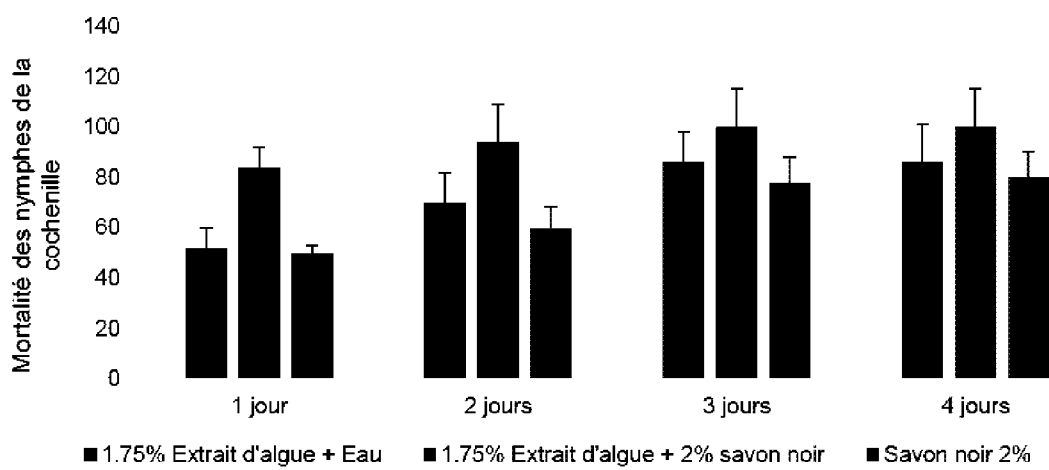


Figure 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/MA2024/050018

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*A01N 65/03*(2009.01)i; *A01P 7/04*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N; A01P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2019335761 A1 (FAUGERON-GIRARD CÉLINE [FR] ET AL) 07 November 2019 (2019-11-07) claim 11 examples 3-5	1-11
X	JP 2014091709 A (INA FOOD IND CO LTD) 19 May 2014 (2014-05-19) claims 1-4 examples 3, 6	1,2,4-10
X	CN 111134143 A (YANG LIANGYU) 12 May 2020 (2020-05-12) claim 1	1,2,4
X	FR 1394087 A (ROUDAUT CHARLES-JEAN) 02 April 1965 (1965-04-02) the whole document	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 September 2024

Date of mailing of the international search report

10 October 2024

Name and mailing address of the ISA/EP

European Patent Office
p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk
Netherlands (Kingdom of the)

Telephone No. (+31-70)340-2040

Facsimile No. (+31-70)340-3016

Authorized officer

Marie, Gérald

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/MA2024/050018

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GAETANA MAZZEO ET AL. "Dactylopius opuntiae, a new prickly pear cactus pest in the Mediterranean: an overview" <i>ENTOMOLOGIA EXPERIMENTALIS ET APPLICATA, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, NL</i> , Vol. 167, No. 1, 24 January 2019 (2019-01-24), pages 59-72 DOI: 10.1111/EEA.12756 ISSN: 0013-8703, XP071084640 the whole document	1-14
A	BOUHARROUD R ET AL. "Biological control of the prickly pear cochineal Dactylopius opuntiae Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae)" <i>PO BULLETIN: A JOURNAL OF REGULATORY PLANT PROTECTION, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB</i> , Vol. 48, No. 2, 29 June 2018 (2018-06-29), pages 300-306 DOI: 10.1111/EPP.12471 ISSN: 0250-8052, XP071520611 the whole document	1-14
A	ASIMAKIS ELIAS ET AL. "Algae and Their Metabolites as Potential Bio-Pesticides" <i>MICROORGANISMS</i> , Vol. 10, No. 2, 27 January 2022 (2022-01-27), page 307 DOI: 10.3390/microorganisms10020307 XP093088385 the whole document	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/MA2024/050018

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
US	2019335761	A1	07 November 2019	NONE		
JP	2014091709	A	19 May 2014	JP	6145858 B2	14 June 2017
				JP	2014091709 A	19 May 2014
CN	111134143	A	12 May 2020	NONE		
FR	1394087	A	02 April 1965	BE	657663 A	16 April 1965
				FR	1394087 A	02 April 1965

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. A01N65/03 A01P7/04

ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

A01N A01P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 2019/335761 A1 (FAUGERON-GIRARD CÉLINE [FR] ET AL) 7 novembre 2019 (2019-11-07) revendication 11 exemples 3-5 -----	1 - 11
X	JP 2014 091709 A (INA FOOD IND CO LTD) 19 mai 2014 (2014-05-19) revendications 1-4 exemples 3, 6 -----	1, 2, 4 - 10
X	CN 111 134 143 A (YANG LIANGYU) 12 mai 2020 (2020-05-12) revendication 1 -----	1, 2, 4
X	FR 1 394 087 A (ROUDAUT CHARLES-JEAN) 2 avril 1965 (1965-04-02) le document en entier ----- - / - -	1 - 14

☒

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒

 Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

 "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
 "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
 "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
 "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
 "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
 "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
 "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
 "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 septembre 2024

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/10/2024

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Marie, Gérald

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GAETANA MAZZEO ET AL: "Dactylopius opuntiae, a new prickly pear cactus pest in the Mediterranean: an overview", ENTOMOLOGIA EXPERIMENTALIS ET APPLICATA, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 167, no. 1, 24 janvier 2019 (2019-01-24), pages 59-72, XP071084640, ISSN: 0013-8703, DOI: 10.1111/EEA.12756 le document en entier -----	1 - 14
A	BOUHARROUD R ET AL: "Biological control of the prickly pear cochineal Dactylopius opuntiae Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae)", PO BULLETIN: A JOURNAL OF REGULATORY PLANT PROTECTION, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 48, no. 2, 29 juin 2018 (2018-06-29), pages 300-306, XP071520611, ISSN: 0250-8052, DOI: 10.1111/EPP.12471 le document en entier -----	1 - 14
A	ASIMAKIS ELIAS ET AL: "Algae and Their Metabolites as Potential Bio-Pesticides", MICROORGANISMS, vol. 10, no. 2, 27 janvier 2022 (2022-01-27), page 307, XP093088385, DOI: 10.3390/microorganisms10020307 le document en entier -----	1 - 14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/MA2024/050018

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2019335761 A1	07-11-2019	AUCUN	
JP 2014091709 A	19-05-2014	JP 6145858 B2	14-06-2017
		JP 2014091709 A	19-05-2014
CN 111134143 A	12-05-2020	AUCUN	
FR 1394087 A	02-04-1965	BE 657663 A	16-04-1965
		FR 1394087 A	02-04-1965