

(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
20 juillet 2017 (20.07.2017)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2017/121881 A1

(51) Classification internationale des brevets :

A01N 31/08 (2006.01) A01N 43/22 (2006.01)
A01N 31/16 (2006.01) A01N 59/02 (2006.01)
A01N 35/02 (2006.01) A01N 65/22 (2009.01)
A01N 37/38 (2006.01) A01N 65/24 (2009.01)
A01N 37/40 (2006.01) A01N 65/28 (2009.01)
A01N 37/44 (2006.01) A01P 7/04 (2006.01)
A01N 43/08 (2006.01) A01P 3/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/EP2017/050726

(22) Date de dépôt international :

13 janvier 2017 (13.01.2017)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1650318 15 janvier 2016 (15.01.2016) FR

(71) Déposant : UNIVERSITE PARIS EST CRETEIL VAL
DE MARNE [FR/FR]; 61, avenue du Général de Gaulle,
94000 Creteil (FR).

(72) Inventeurs : MORA, Philippe; 14 Villa des Corneilles,
94210 La Varenne Saint Hilaire (FR). CELINI, Léonide;
10 rue Alphonse Karr, 75019 Paris (FR).

(74) Mandataire : REGIMBEAU; 20, rue de Chazelles, 75847
Paris Cedex 17 (FR).

(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, CZ, DE, DJ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN,
KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY,
TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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 re-
çues (règle 48.2.h))

(54) Title : METHODS AND COMPOSITIONS FOR CONTROLLING FUNGUS-GROWING ANTS

(54) Titre : METHODES ET COMPOSITIONS POUR LE CONTROLE DES FOURMIS CHAMPIGNONNISTES

(57) Abstract : The invention relates to a method for fighting fungus-growing ants, and to a formicide composition capable of des-
troying specifically the colonies of fungus-growing ants. The invention also relates a kit for use with said method.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé de lutte contre les fourmis champignonnistes ainsi qu'une composition formicide ca-
pable de détruire spécifiquement les colonies de fourmis champignonnistes. La présente invention concerne également un kit pou-
vant être utilisé dans ledit procédé.



WO 2017/121881 A1

METHODES ET COMPOSITIONS POUR LE CONTROLE DES FOURMIS CHAMPIGNONNISTES

DOMAINE DE L'INVENTION

5 L'invention se rapporte au domaine du contrôle des nuisibles. Elle propose un nouveau procédé de lutte contre les fourmis champignonnistes ainsi qu'une nouvelle composition formicide capable de détruire spécifiquement les colonies de fourmis champignonnistes. La présente invention propose également une méthode de préparation d'une telle composition ou d'un kit pouvant être utilisé dans ledit procédé.

10

ETAT DE LA TECHNIQUE

Les fourmis champignonnistes de type fourmis « coupe feuille » appartenant par exemple aux genres *Atta* ou *Acromyrmex* sont essentiellement présentes en Amérique Centrale et en Amérique du Sud.

15 La particularité principale de la tribu Attini, regroupant notamment les genres *Atta* ou *Acromyrmex*, est le fait qu'elle cultive, au sein même de la fourmilière, un champignon basidiomycète saprophyte de l'espèce *Leucoagaricus gongylophorus*. Les fourmis assurent sa croissance tandis que le champignon assure l'apport de nutriments pour la colonie en dégradant des molécules complexes, non assimilables
20 par les fourmis (Richard et al, 2005). Le champignon, alimenté en matière première par les fourmis, peut également constituer une source nutritive puisque des auteurs ont observé que le champignon était consommé par certaines fourmis (Qinlan et al., 1978, Fisher et al., 1994) et le champignon est une source d'enzymes assurant la dégradation de la matière végétale.

25 Les fourmis champignonnistes « coupe feuilles » représentent un nuisible pour les cultures agricoles et forestières. En effet, elles se retrouvent sans prédateur lorsqu'elles envahissent des monocultures développées par l'homme (phénomène accentué avec la déforestation) ce qui entraine une forte présence non régulée. Elles y collectent feuilles, fleurs, fruits et graines et ravagent ainsi la plupart des cultures
30 agricoles : les cultures vivrières (manioc, patate douce, maïs, fruits à pain...), fruitières (citronniers, orangers, manguiers, avocatiers...), maraîchères (piments,

haricots, salades...) et ornementales (rosiers, hibiscus...). Les dégâts provoqués par les fourmis champignonnistes représentent 30% des coûts de gestion des cultures d'eucalyptus au Brésil. Une colonie mature peut provoquer la destruction de 3 tonnes de canne à sucre par an, soit une perte estimée à 60 millions de dollars. Aux Etats-Unis, et plus particulièrement au Texas, les dégâts annuels sont estimés à plusieurs millions de dollars alors qu'ils sont de plusieurs centaines de millions de dollars dans l'état de Sao Paulo (Brésil).

Les traitements utilisés pour contrôler leur expansion, principalement basés sur des produits chimiques pesticides, ont entraîné pollution et détérioration des sols. Ces composés sont aujourd'hui peu à peu retirés du marché car ils présentent un risque pour l'homme et l'environnement. Dans le cadre de la lutte contre *Acromyrmex octospinosus*, commencée dès la fin des années cinquante, de nombreux produits chimiques (produits organochlorés utilisés en tant qu'insecticides) ont été utilisés. Après l'aldrine (1,2,3,4,10,10-hexachloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-1,4-endo,exo-5,8- diméthano-naphthalène), qui aujourd'hui est considéré comme un polluant organique persistant, le Mirex® (1,1a,2,2,3,3a,4,5, 5,5a,5b,6-dodecachlorooctahydro-1H-1,3,4-methanetriyl)cyclobuta[cd] pentalene) a été utilisé avant d'être à son tour interdit à cause de son impact néfaste sur l'environnement. Un autre produit nommé Blitz (fipronil) a été employé, mais son champ d'action étant trop large, il a été retiré de la vente en Europe (2013) et n'est donc plus utilisé.

La plupart de ces insecticides avaient comme point commun de cibler le système nerveux des insectes en général et pas seulement celui des fourmis champignonnistes. Ainsi ces composés, non spécifiques, affectent d'autres espèces vulnérables (e.g. abeilles). Par ailleurs, l'action contre le système nerveux des insectes est généralement assez rapide et cible l'insecte en tant que tel. Or, contre les insectes sociaux, il est préférable de cibler la colonie dans sa globalité notamment via une action contre conjointement les fourmis et leur champignon symbiotique. De plus, ces composés insecticides classiques sont généralement difficilement biodégradables et entraînent une activité toxique persistante dans les sols et les eaux.

Il existe d'autre moyen de lutte contre les fourmis champignonnistes comme des composés chimiques fongicides ou encore des champignons pathogènes

(WO2012050857) ciblant les fourmis (entomopathogènes) ou le champignon poussant sur la meule (mycopathogène). Néanmoins, ces solutions ne se sont pas révélées suffisamment efficaces. D'une part la combinaison doit être appliquée directement sur le nid et d'autre part elle ne présente une efficacité que de 50% en 9-

5 10 jours.

Les moyens locaux incluent également l'utilisation de plantes répulsives afin d'éloigner les nids de fourmis champignonnistes. Une telle utilisation présente toutefois une efficacité réduite et n'ont pas de conséquence sur le nid ou la colonie.

Actuellement il n'existe aucun moyen de lutte efficace et le problème d'infestation par les fourmis champignonnistes reste capital.

Ainsi, les recherches actuelles ont eu pour objectif de trouver un moyen innovant de lutte contre les fourmis champignonnistes qui serait peu couteux, peu nocif pour l'environnement et spécifique de ces fourmis. Dans ce contexte, la présente invention propose une nouvelle méthode et composition associée visant à cibler la colonie et son environnement plutôt que la fourmi elle-même.

DESCRIPTION DETAILLEE :

Les inventeurs ont découvert que la laccase est une enzyme largement exprimée chez les fourmis champignonnistes ainsi que dans la meule et qu'une composition comprenant un inhibiteur de laccase ou présentant une activité inhibitrice de laccase entraîne, en quelques jours, l'abandon des nids situés autour de l'emplacement des appâts. De plus, conformément à la présente invention, une composition comprenant un inhibiteur de laccase additionné d'un composé antibactérien ayant une activité bactéricide ou bactériostatique contre les actinomycètes (ou comprenant un composé présentant une activité inhibitrice de laccase et une activité antibactérienne contre les actinomycètes) permet de détruire les colonies autour de l'emplacement des appâts et cela sans réapparition des colonies.

Ces nouvelles méthodes de lutte contre les fourmis et les compositions associées étant spécifiques des fourmis champignonnistes, elles présentent un

impact plus faible sur l'environnement que les compositions formicides classiques. De plus, dans certains modes de réalisation, ces compositions sont rapidement dégradées.

- 5 Sauf indication contraire, les termes scientifiques et techniques utilisés dans le cadre de la présente invention auront les significations qui sont communément admises par l'homme du métier.

10 Par « Fourmis champignonnistes », on entend désigner ici les fourmis appartenant à la tribu des Attini et en particulier aux genres *Atta* ou *Acromyrmex*. Ces fourmis ont la particularité de cultiver au sein même de la fourmilière, un champignon basidiomycète saprophyte de l'espèce *Leucophorus gongylophorus*. Les fourmis assurent sa croissance tandis que le champignon assure l'apport de nutriments pour la colonie en dégradant des molécules complexes. Au sein de cette famille, les
15 fourmis appartenant aux genres *Atta* ou *Acromyrmex* forment une sous-catégorie appelée fourmis « coupe feuille ». Les espèces les plus représentées sont *Acromyrmex heyeri*, *Acromyrmex echinator*, *Acromyrmex lobicornis*, *Acromyrmex crassispinus*, *Acromyrmex laticeps*, *Acromyrmex striatus*, *Acromyrmex lundii*, *Acromyrmex octospinosus*, *Acromyrmex rugosus*, *Acromyrmex subterraneus*
20 *brunneus*, *Acromyrmex subterraneus molestans*, *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *Acromyrmex volcanus*, *Acromyrmex Balzani*, *Atta capiguara*, *Atta cephalotes*, *Atta colombica*, *Atta sexdens*, *Atta sexdens srubropilosa*, *Atta laevigata*, *Atta bisphaerica*, *Atta texana* et *Atta vollenweideri*.

25 Au sens de l'invention, l'expression « lutte contre les fourmis champignonnistes » correspond ici à une action conduisant à l'abandon du nid ou à la destruction de la colonie.

Les termes « fourmilière » et « nid » peuvent être utilisés ici de manière interchangeable. Ils correspondent à la structure abritant la colonie de fourmis champignonnistes.

Par « Colonie », il faut comprendre ici un groupe de fourmis, autre qu'un couple unique et comprenant au moins une reine, construisant des nids pour y élever une progéniture de manière coopérative.

5 Par « Meule » également appelée « jardin à champignon » (*ie fungus garden*) dans la littérature, il faut comprendre ici la structure fongique cultivée par les fourmis champignonnistes et composée majoritairement du champignon basidiomycète saprophyte de l'espèce *Leucophorus gongylophorus* poussant sur la matière végétale récoltée par les fourmis.

10 Par « Composition formicide », il faut comprendre ici une composition formulée de façon à cibler spécifiquement les fourmis. Ainsi, contrairement à une composition insecticide, la composition formicide selon l'invention n'entraînera pas la mort des abeilles ou des autres arthropodes. La composition formicide selon l'invention peut entraîner un abandon du nid par la colonie de fourmis champignonnistes ou la destruction de ladite colonie.

15 Au sens de l'invention, l'expression « Composé antibactérien » correspond ici à un composé ayant une activité bactéricide ou bactériostatique. Le terme « Activité bactéricide » est utilisé dans le cas où le composé est capable de tuer la bactérie tandis que le terme « Activité bactériostatique » correspond à une inhibition de la croissance de la bactérie. Un même composé antibactérien peut avoir un effet
20 bactéricide ou bactériostatique sur une même souche bactérienne en fonction de sa concentration.

Par « Actinomycètes », il faut comprendre toute bactérie appartenant au groupe des actinomycètes. Les actinomycètes sont des bactéries Gram positives généralement aérobies. Les actinomycètes les plus fréquemment retrouvés en
25 relation avec des fourmis champignonnistes sont les *Pseudonocardia* et les *Streptomyces*. Les bactéries appartenant aux genres *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Amycolatopsis*, *Kribbella*, et *Nocardioides* peuvent également être retrouvées.

Par « Laccase », il faut comprendre des enzymes de type polyphénol oxydases. Elles permettent de dégrader la lignine et apportent une protection contre la toxicité

de certains polyphénols. Dans la nomenclature relative aux enzymes, les laccases sont regroupées sous le code EC 1.10.3.2.

Par « Inhibiteur de laccase » ou « composé présentant une activité inhibitrice de laccase », il faut comprendre un composé inhibant l'activité des laccases telle que mesurée par exemple par le substrat ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) selon la méthode publiée par Bourbonnais et. al (1990).

Par « Molécule antioxydante », il faut comprendre le sens commun donné à ce terme à savoir une molécule capable de diminuer ou d'empêcher l'oxydation d'autres substances chimiques. Le potentiel antioxydant d'une molécule peut être vérifié par exemple via l'utilisation des radicaux ABTS (Bourbonnais et. al 1990).

Par « Appétant » ou « appât », il faut comprendre un composé ayant un pouvoir attractif sur les fourmis champignonnistes et augmentant ainsi la quantité de composition selon l'invention récoltée par lesdites fourmis. Par appétant glucidique, il faut comprendre une molécule appartenant à la famille des glucides. Par appétant oligosaccharidique ou polysaccharidique, il faut comprendre une molécule de type oligosaccharidique ou polysaccharidique comme par exemple les fructanes, glucanes, galactanes, mannanes ou hémicelluloses.

Comme cela est montré dans les exemples, les inventeurs ont découvert que la laccase est une enzyme largement exprimée chez les fourmis champignonnistes ainsi que dans la meule et qu'une composition comprenant un inhibiteur de laccase entraîne, en quelques jours, l'abandon des nids situés autour de l'emplacement des compositions ou la destruction de ces nids

Une telle méthode permet de protéger les récoltes en empêchant le développement de nids aux abords des champs à protéger.

Ainsi, selon un premier aspect, l'invention porte sur une méthode de lutte contre les fourmis champignonnistes comprenant l'utilisation d'au moins un inhibiteur de laccase.

Il existe une grande variété d'inhibiteur de laccase. L'homme du métier peut sélectionner un inhibiteur de laccase grâce à des tests de routine tel que celui

présenté dans les exemples et basé sur la méthode publiée par Bourbonnais et al (1990).

En particulier, est considéré comme étant un inhibiteur de laccase toute molécule qui, dans le cadre de la méthode mentionnée ci-dessus, entraîne une diminution de l'activité de la laccase de plus de 50%, de préférence de plus de 75 %, de façon plus préférée de plus de 90%. De préférence, ces inhibitions de l'activité de la laccase sont obtenues à des concentrations inférieures à 5mM. De manière encore plus préférée, ces inhibitions de l'activité de la laccase sont obtenues à des concentrations inférieures à 1 mM.

Toutes les molécules anti-oxydantes ont la capacité d'inhiber l'activité d'une laccase. Néanmoins, il existe des inhibiteurs de laccases ne présentant pas une activité anti-oxydante. Parmi les molécules présentant une activité anti-laccase et n'étant pas des molécules anti-oxydantes, il est possible de citer les chélateurs, les détergents, les acides organiques non oxydants et les métaux cationiques.

Par exemple, les molécules suivantes sont également des molécules présentant une activité anti-laccase sans être des molécules antioxydantes : acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), chlorure de calcium (CaCl_2), acide rhodotorulique, entérobactine, acide thioglycolique, acide diéthylthiocarbamique, azoture de sodium, bromure de cétyltriméthylammonium, Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , Li^+ , Sn^+ , Hg^+ , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , laurylsulfate de sodium, cyanure de sodium (NaCN), thiosulphate de sodium, acide oxalique, beta-mercaptoéthanol.

Ainsi, typiquement, la méthode de lutte contre les fourmis champignonnistes comprend l'utilisation d'au moins un inhibiteur de laccase sélectionné parmi : une molécule anti-oxydante, un chélateur, un détergent, un acide organique non oxydant et un métal cationique.

Les molécules préférées pour leur utilisation en tant qu'inhibiteur de laccases sont :

pour les chélateurs : EDTA, acide rhodotorulique, entérobactine

pour les détergents : laurylsulfate de sodium,

pour les métaux cationiques : Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , Li^+ , Sn^+ , Hg^+ , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} ,

pour les acides organiques non oxydants : acide oxalique, acide thioglycolique, acide diéthylthiocarbamique.

De manière préférée, l'inhibiteur de laccase est une molécule anti-oxydante.

De telles molécules anti-oxydantes sont généralement connues de l'homme du métier (Lü et al. 2010). Il pourra par ailleurs, vérifier cette activité via des tests
5 classiques de mesure du potentiel antioxydant tel que celui décrit dans Bourbonnais et al. (1990).

Les molécules présentant une activité anti-laccase et une activité anti-oxydante peuvent par exemple être sélectionnées parmi : acide ascorbique (E300), acide
10 citrique (E330), acide coumarique, acide férulique, acide gallique, acide palmityl 6-1-ascorbique (E304), acide syringique, ascorbates de sodium/calcium/potassium (E301)/(E302)/(E303), butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluol, cystéine, gallates d'octyle (E311) ou de dodécyle (E312), glutathion, lactates de sodium (E325), de potassium (E326) ou de calcium (E327), lécithines (E322), lipoate, des
15 caroténoïdes (E160) comme la lutéine, lutéoline, des carotènes comme la lycopène, tartrates de sodium (E335)/potassium (E336) ou de sodium et de potassium (E337), thiosulfate de sodium, vitamine E (tocophérols naturels (E306)), α -tocophérol de synthèse (E307), γ -tocophérol de synthèse (E308) et δ -tocophérol de synthèse (E309), sélénium et chlorure d'hydroxylammonium.

En particulier, l'inhibiteur de laccases est sélectionné parmi l'un des composés
20 suivants : acide ascorbique, acide citrique (E330), acide coumarique, acide palmityl 6-1-ascorbique (E304), ascorbates de sodium/calcium/potassium (E301)/(E302)/(E303), cystéine, gallates d'octyle (E311) ou de dodécyle (E312), glutathion, lactates de sodium (E325), de potassium (E326) ou de calcium (E327),
25 lécithines (E322), des caroténoïdes (E160) comme la lutéine, lutéoline, des carotènes comme la lycopène, tartrates de sodium (E335)/potassium (E336) ou de sodium et de potassium (E337), thiosulfate de sodium, vitamine E (tocophérols naturels (E306)), α -tocophérol de synthèse (E307), γ -tocophérol de synthèse (E308) et δ -tocophérol de synthèse (E309), sélénium et chlorure d'hydroxylammonium.

L'inhibiteur de laccase a de préférence peu d'impact sur l'environnement et y est
30 rapidement dégradé. Ainsi, de façon préférée l'inhibiteur de laccases est sélectionné parmi l'un des composés suivants : acide ascorbique, ascorbates de sodium/calcium (E301)/ (E302), lactates de sodium (E325), de potassium (E326) ou de calcium

(E327), lutéine, lycopène, tartrates de sodium (E335)/potassium (E336) ou de sodium et de potassium (E337), thiosulfate de sodium, vitamine E (tocophérols naturels (E306)), α -tocophérol de synthèse (E307), γ -tocophérol de synthèse (E308) et δ -tocophérol de synthèse (E309), cystéine et glutathion.

- 5 De préférence, l'inhibiteur de laccases est sélectionné parmi l'un des composés suivants : L-cystéine, acide coumarique, glutathion, thiosulfate de sodium, acide férulique, acide syringique, acide ascorbique, acide gallique.

En outre, les molécules préférées sont des molécules naturelles ou facilement dégradables et respectent donc l'environnement contrairement aux insecticides les plus répandus. Ainsi, de manière encore plus préférée, l'inhibiteur de laccases est
10 sélectionné parmi l'un des composés suivants : L-cystéine, glutathion, thiosulfate de sodium, acide férulique, acide syringique, acide ascorbique, acide gallique.

De manière particulièrement préférée, l'inhibiteur de laccases est sélectionné parmi la L-cystéine, l'acide ascorbique, le thiosulfate de sodium ou le glutathion.

- 15 Cet inhibiteur de laccase est utilisé à une concentration suffisante pour entraîner une inhibition de l'activité des laccases présentes dans la meule et chez les fourmis.

Cette concentration peut être déterminée par l'homme du métier grâce à des tests conventionnels d'évaluation de la concentration minimale inhibitrice tels que ceux mis en œuvre dans les exemples.

- 20 Ainsi, typiquement, la méthode de lutte contre les fourmis champignonnistes selon l'invention comprend au moins l'utilisation d'un inhibiteur de laccases sélectionné parmi le glutathion, L-cystéine, le thiosulfate de sodium et l'acide ascorbique.

Comme le montre la partie expérimentale, l'utilisation d'une composition comprenant un inhibiteur de laccases suffit à détruire le nid de fourmis en
25 engendrant la disparition de la meule et de la colonie. Dans certains cas, l'utilisation d'une composition comprenant au moins un inhibiteur de laccase entraîne l'abandon du nid mais un nouveau nid peut être reconstruit à proximité du nid abandonné. Les inventeurs ont également isolé de nombreux actinomycètes de la cuticule des fourmis champignonnistes. Suite à ces observations, ils ont montré qu'une
30 composition comprenant au moins un inhibiteur de laccase additionné d'au moins un composé antibactérien ayant une activité bactéricide ou bactériostatique contre les

actinomycètes permet de détruire les colonies autour de l'emplacement des appâts et cela sans réapparition des colonies. Ainsi l'ajout d'au moins un composé antibactérien permet d'augmenter l'effet de l'inhibiteur de laccase et affecte la meule puis aboutit à la destruction de la colonie.

5 Ainsi, la combinaison d'un inhibiteur de laccase avec une molécule antibactérienne ayant une activité bactéricide et/ou bactériostatique contre les actinomycètes permet d'une part d'optimiser la disparition de la colonie et d'autre part d'éviter l'apparition de nouvelles colonies. Cela est d'autant plus vrai lorsque le traitement est appliqué avant l'essaimage. En effet la destruction du nid ne permettra
10 pas l'envol (essaimage) des fourmis ailées à l'origine de la fondation de nouvelles colonies limitant ainsi leur propagation.

Alors que l'inhibiteur de laccase pris individuellement permet un contrôle des fourmis champignonnistes (e.g. abandon du nid) sans destruction de la colonie, la combinaison de ces deux composés entraîne une destruction de la colonie. Cette
15 action est en outre spécifique des fourmis champignonnistes et n'aura pas ou peu d'impact sur l'environnement.

Ainsi, de manière préférée, l'invention porte sur une méthode de lutte contre les fourmis champignonnistes comprenant l'utilisation d'au moins un inhibiteur de laccase et d'au moins un composé antibactérien ou comprenant une activité
20 inhibitrice de laccase et une activité antibactérienne.

De manière surprenante les inventeurs ont observé que l'utilisation d'une molécule antibactérienne, ayant une activité bactéricide et/ou bactériostatique contre les actinomycètes, peut permettre la destruction du nid des fourmis champignonnistes.

Ainsi, dans un mode de réalisation particulier, l'invention porte sur une méthode
25 de lutte contre les fourmis champignonnistes comprenant l'utilisation d'au moins une molécule antibactérienne ayant une activité bactéricide et/ou bactériostatique contre les actinomycètes.

Il existe une très grande diversité de composés antibactériens actifs contre les actinomycètes. Il existe des tests de routine permettant de détecter et de quantifier
30 cette activité tels que ceux présentés dans les exemples (antibiogramme en boîte de Pétri, à savoir : disques imprégnés sur gélose) qui peuvent être mis en œuvre sur

des souches d'actinomycètes de collection (par exemple : ATCC23345, ATCC19727) ou sur des souches directement isolées de fourmis champignonnistes (cf. exemples).

En particulier, l'invention est caractérisée en ce que le composé antibactérien est un antibiotique.

Plus particulièrement l'antibiotique peut être sélectionné parmi les classes d'antibiotiques suivantes : β -lactamines, Aminosides, Macrolides et apparentés, glycopeptides, tétracyclines et quinolones. Par exemple, cet antibiotique peut être sélectionné parmi la liste suivante : chloramphenicol, erythromycine, josamycine, tétracycline, gentamycine, streptomycine, et penicilline.

Par ailleurs, les inventeurs ont identifié des composés naturels provenant de végétaux ayant une activité bactériostatique ou bactéricide contre les actinomycètes isolés à partir de la cuticule des fourmis.

Ces composés naturels issus de végétaux ont l'avantage d'être dégradé rapidement et présentent pour la plupart une activité bactéricide ou bactériostatique contre les actinomycètes visés aussi forte que celle d'un antibiotique. En outre, les molécules préférées sont des molécules naturelles ou facilement dégradables et respectent donc l'environnement contrairement aux insecticides ou antibactériens les plus répandus.

De préférence, le composé antibactérien utilisé n'est pas un antibiotique utilisé en thérapeutique (humaine ou animale). L'exclusion d'un tel antibiotique a pour but de limiter l'émergence potentielle de résistance ayant une conséquence sur les stratégies thérapeutiques.

De préférence le composé antibactérien utilisé est une molécule naturelle extraite de plante. Ce composé antibactérien est utilisé pur ou peut être présent au sein d'un mélange de composés dans une huile essentielle.

Ainsi, plus particulièrement, l'invention est caractérisée en ce que le composé antibactérien est sélectionné parmi la liste suivante : carvacrol, thymol, eugénol, cinnamaldéhyde, α -terpineol, terpinène-4-ol.

De préférence, le composé antibactérien est sélectionné parmi la liste suivante : carvacrol, thymol, eugénol et cinnamaldéhyde.

Le composé antibactérien selon l'invention peut également être caractérisé en ce qu'il consiste en une huile essentielle sélectionnée parmi les huiles essentielles
5 provenant des végétaux suivants : Origan, Marjolaine, Thym, Clou de girofle, Cannelle, Arbre à thé (*Malaleuca alternifolia*), Pin, Géranium, citron, citronnelle et Ail.

De préférence, le composé antibactérien est sélectionné parmi la liste suivante d'huile essentielle suivante : Origan, Thym, Clou de girofle et Cannelle.

10 Ce composé antibactérien est utilisé à une concentration suffisante pour entraîner une activité bactéricide et/ou bactériostatique contre les actinomycètes présents dans la meule et sur les fourmis. Cette concentration peut être déterminée par l'homme du métier grâce à des tests conventionnels d'évaluation de la concentration
15 minimale inhibitrice ou de la concentration minimale bactéricide tels que ceux mis en œuvre dans les exemples.

De manière tout à fait surprenante, une activité anti-laccase a été observée pour les composés antibactériens eugénol et thymol. Ces deux composés présentent donc un
20 intérêt particulier pour les compositions selon l'invention car, ayant à la fois une activité inhibitrice de laccase et une activité antibactérienne, ils permettent d'agir sur les deux cibles identifiées par les inventeurs pour la lutte contre les fourmis champignonnistes.

25 Préférentiellement, les composés selon l'invention présentant une activité inhibitrice des laccases et une activité antibactérienne sont sélectionnés parmi le thymol et l'eugénol.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention porte sur une méthode
30 de lutte contre les fourmis champignonnistes découpeuses de feuille appartenant aux genres *Atta* ou *Acromyrmex* comprenant l'utilisation d'au moins un inhibiteur de laccase.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention porte sur une méthode de lutte contre les fourmis champignonnistes découpeuses de feuille appartenant aux genres *Atta* ou *Acromyrmex* comprenant l'utilisation d'au moins une molécule antibactérienne ayant une activité bactéricide et/ou bactériostatique contre les actinomycètes.

En outre, l'homme du métier sait comment préparer de telles compositions formicide et les compositions ou méthodes selon l'invention peuvent fonctionner avec un ou plusieurs inhibiteurs de laccase de préférence en combinaison avec un ou plusieurs composés antibactériens.

De manière particulièrement préférée, l'invention a pour objet une méthode de lutte contre les fourmis champignonnistes comprenant l'utilisation d'une composition formicide comprenant au moins un composé ou une combinaison de composés sélectionné(e) parmi :

- thymol et L-cystéine,
- eugénol et L-cystéine,
- cinnamaldéhyde et L-cystéine,
- thymol et thiosulfate de sodium,
- eugénol et thiosulfate de sodium,
- cinnamaldéhyde et thiosulfate de sodium,
- thymol et glutathion,
- eugénol et glutathion,
- cinnamaldéhyde et glutathion,
- thymol,
- eugénol,
- cinnamaldéhyde,
- thiosulfate de sodium,
- L-cystéine, et
- glutathion.

Les inventeurs ont également montré que l'ajout d'un appétant oligosaccharidique ou polysaccharidique à une composition formicide telle que décrite précédemment permet d'attirer plus efficacement les fourmis champignonnistes.

Ainsi, selon un autre aspect, l'invention porte sur une méthode de lutte contre les fourmis champignonnistes comprenant l'utilisation d'au moins un appétant oligosaccharidique ou polysaccharidique.

Avantageusement, l'invention porte sur une méthode de lutte contre les fourmis champignonnistes comprenant l'utilisation d'au moins un appétant oligosaccharidique ou polysaccharidique en combinaison avec au moins un inhibiteur de laccase seul ou en combinaison avec au moins un composé antibactérien.

Les concentrations respectives de chacun des composés de la composition de l'invention sont indiquées ci-après et, en fonction de la composition finale de la composition de l'invention, peuvent se cumuler.

Selon un aspect particulier, l'invention a pour objet une méthode de lutte contre les fourmis champignonnistes découpeuses de feuille appartenant aux genres *Atta* ou *Acromyrmex* comprenant l'utilisation d'au moins un appétant oligosaccharidique ou polysaccharidique en combinaison avec au moins un inhibiteur de laccase seul ou en combinaison avec au moins un composé antibactérien.

En particulier, l'appétant oligosaccharidique ou polysaccharidique peut être choisi parmi : amidon, amylose, amylopectine, cellobiose, glycogène, glucose, saccharose, laminarine ((1-3)-beta-D-glucane), maltodextrine, polymères de cyclodextrine, polymères d'isomaltose, icodextrines, dextrane, maltoheptose, maltohexose, maltopentose, maltotetrose, maltotriose, maltobiose et leurs dérivés.

De manière préférée, l'appétant oligosaccharidique ou polysaccharidique est choisi parmi : amidon, amylose, cellobiose, laminarine, maltodextrine, maltobiose, glucose, saccharose et glycogène.

De manière particulièrement préférée, l'appétant oligosaccharidique ou polysaccharidique est choisi parmi : amidon, amylose, laminarine, maltodextrine et glycogène.

De manière encore plus préférée l'appétant est de l'amidon.

Dans un mode de réalisation particulier, l'appétant est lui-même sous la forme d'une composition et en constitue l'élément majoritaire. Par exemple, l'amidon est le composé majoritaire de la farine de blé. L'homme de l'art saura aisément choisir la forme la plus adéquate des appétants.

Typiquement, la concentration en appétant est notamment fonction de la présence et de la quantité de d'inhibiteur de laccase et/ou d'agent antibactérien. Ainsi, la quantité d'appétant est comprise entre 600g/kg et 999g/kg ; de préférence entre 800g/kg et 999g/kg, de préférence entre 850g/kg et 990g/kg, voire entre 870g/kg et 950g/kg de la composition formicide de l'invention.

Les inventeurs ont montré qu'une composition formicide comprenant au moins un inhibiteur de laccase ou au moins un composé antibactérien ou une combinaison d'au moins un inhibiteur de laccase et d'au moins un composé antibactérien permet de détruire les colonies de fourmis champignonnistes.

Ainsi, selon un autre aspect, l'invention porte sur une composition formicide comprenant au moins un inhibiteur de laccase ou au moins un composé antibactérien ou une combinaison d'au moins un inhibiteur de laccase et d'au moins un composé antibactérien comme composés actifs contre les fourmis champignonnistes. De préférence, ces deux composés sont les seuls composés actifs contre les fourmis champignonnistes.

Pour la composition de l'invention, les composés antibactériens et les inhibiteurs de laccases sont les mêmes (y compris les composés préférés) que ceux décrits plus haut relativement à la méthode de l'invention.

Typiquement, la concentration en composé antibactérien est comprise entre 1 et 200 g/kg de la composition formicide de l'invention. De préférence elle est comprise entre 10 g/kg et 150 g/kg et de manière plus préférée entre 50 g/kg et 120 g/kg de composition formicide de l'invention.

Typiquement, la concentration en inhibiteur de laccases est comprise entre 1 et 200 g/kg de la composition formicide de l'invention. De préférence elle est comprise entre 10 g/kg et 150 g/kg et de manière plus préférée entre 50 g/kg et 120 g/kg de composition formicide de l'invention.

Bien évidemment, ces concentrations pourront être déterminées par l'homme du métier grâce à des tests conventionnels d'évaluation de la concentration minimale tels que ceux mis en œuvre dans les exemples.

La composition selon l'invention peut être un produit de combinaison d'au moins un inhibiteur de laccase et au moins un composé antibactérien pour une utilisation simultanée, étalée ou séparée dans le temps.

Avantageusement, la composition selon l'invention peut comprendre au moins un composé ayant à la fois une activité inhibitrice des laccases des fourmis et de la meule et une activité bactéricide et/ou bactériostatique contre les actinomycètes présents dans la meule et sur les fourmis. L'homme du métier saura aisément, sur la base de la méthode publiée par Bourbonnais et. al (1990) mentionnée précédemment et utilisée dans la partie expérimentale, identifier les composés bactéricides et/ou bactériostatiques pouvant être utilisés contre les actinomycètes présents dans la meule et sur les fourmis ayant une activité inhibitrice des laccases des fourmis et de la meule.

La composition selon l'invention peut également comprendre au moins un appétant. De préférence, l'appétant est un appétant glucidique.

L'appétant est de façon plus préférée sélectionné parmi les appétants oligosaccharidiques ou polysaccharidiques décrits plus haut relativement à la méthode de l'invention (y compris les composés préférés).

Ainsi de manière préférée, l'invention porte sur une composition formicide telle que décrite précédemment comprenant de l'amidon comme appétant polysaccharidique.

De manière particulièrement préférée, l'invention porte sur une composition formicide comprenant de l'amidon comme appétant polysaccharidique et au moins un composé ou une combinaison de composés sélectionné(e) parmi :

- thymol et L-cystéine,
- eugénol et L-cystéine,
- cinnamaldéhyde et L-cystéine,
- thymol et thiosulfate de sodium,
- eugénol et thiosulfate de sodium,
- cinnamaldéhyde et thiosulfate de sodium,
- thymol et glutathion,
- eugénol et glutathion,
- cinnamaldéhyde et glutathion,

- thymol,
- eugénol,
- cinnamaldéhyde,
- thiosulfate de sodium,
- 5 - L-cystéine, et
- glutathion.

Il n'est pas nécessaire d'ajouter à la composition formicide des composés toxiques pour les fourmis champignonnistes.

10 Ainsi, typiquement, la composition formicide selon l'invention ne comprend pas de composés ciblant le système nerveux des insectes (par exemple le fipronil).

Contrairement à des insecticides ou des formicides classiques, la composition selon l'invention est spécifique des fourmis champignonnistes.

15 Ainsi, son utilisation est prévue dans un procédé de lutte contre les fourmis champignonnistes et plus particulièrement pour la destruction des colonies de fourmis champignonnistes.

Contrairement à d'autres insecticides ou formicides, cette composition n'a pas un effet immédiat. En outre, de manière particulièrement avantageuse, les compositions selon l'invention sont dépourvues d'effet répulsif. Du fait de cet effet « *retard* » et de l'absence d'effet répulsif, la composition n'est donc pas obligatoirement dispersée
20 sur la colonie. Il est possible de la placer dans les champs à protéger ou bien au niveau des colonnes de récolte. Les fourmis champignonnistes vont amener la composition au nid où elle sera en contact avec l'ensemble de la colonie et du champignon. Dans ce mode de réalisation, l'utilisation d'un appétant est particulièrement avantageux.

25

La composition selon l'invention peut être dispersée directement sur ou autour du nid lorsque ce dernier est localisé (par exemple à moins de 5 mètres) ou de préférence à proximité des colonnes de récoltes (par exemple à moins de 2 mètres).

30 La composition selon l'invention peut être dispersée en une seule fois sur ou autour du nid ou à proximité des colonnes de récolte. Dans un mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention est dispersée régulièrement, en plusieurs, fois sur ou autour du nid ou à proximité des colonnes de récolte. Typiquement les

dispersions peuvent être journalières, ou espacées de 2, 3, 4, 5, ou 6 jours, ou d'une, deux ou trois semaines.

La méthode selon l'invention peut comprendre la dispersion de 20 g à 500 g de composition formicide selon l'invention par jour.

La méthode selon l'invention peut comprendre la dispersion de 10 g à 100 g de composition formicide selon l'invention par jour, sur 5 à 30 jours consécutifs.

La méthode selon l'invention peut également comprendre la dispersion de 100 g à 500 g, préférentiellement de 200 g à 500 g de composition formicide selon l'invention en une seule fois.

FIGURES

Figure 1 présente une mesure de l'activité anti-laccase de la L-cystéine sur un échantillon de meule (A) et de fourmi (B).

EXEMPLES

1. Matériels et Méthodes

1.1. Mesure de l'activité enzymatique

1.1.1. Echantillonnage et conditionnement

Sur un total de 18 nids, des échantillons de meules et des échantillons de fourmis ont été prélevés puis conservés à -20°C.

1.1.2. Obtention des extraits enzymatiques

Les broyages ont été faits dans des mortiers placés sur de la glace, à l'aide de pilons. Les fourmis (2g) et la meule (2g) ont été broyées dans 10ml d'eau distillée réfrigérée à 4°C. Après avoir obtenu un broyat de texture homogène, le tout a été centrifugé. La centrifugation a été effectuée à 4°C, 15 000 tours/min pendant 20min.

Pour la précipitation des protéines, le surnageant a été saturé à 80% en sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄). Après dissolution totale du sulfate d'ammonium, la solution obtenue est placée à 4°C durant 12 heures. La solution a été ensuite centrifugée à une température de 4°C, à 15 000 tours/min, pendant 20min. Le culot
5 obtenu est re-dissout dans un minimum d'eau distillée froide puis dialysé contre 5 litres d'eau distillé à 4°C pendant 12 heures. L'extrait ainsi obtenu constitue l'extrait enzymatique brut. Ces extraits ont été aliquotés puis conservés à -20°C.

1.1.3. Substrats enzymatiques analysés

L'activité enzymatique a été évaluée par rapport à la capacité de dégradation de 16
10 substrats :

- cinq oligosaccharides naturels (cellobiose, gentiobiose, lactose, maltose, saccharose) ;
- six hétérosides synthétiques (PNP α - et β -glucopyranosydes, PNP- α - et β -galactopyranoside, PNP- β -xyloside et PNP-N-acétyl-glucosamine) ;
- 15 • quatre polysaccharides (amidon, carboxyméthylcellulose (CMC), pullulane et xylane).

1.1.4. Analyses enzymatiques

Les solutions enzymatiques ont été incubées avec les substrats à 37°C, pendant 30min dans une solution tampon Mac Ilvain de pH=5,2. Tous les essais
20 enzymatiques et de témoins ont été réalisés en 3 réplicats, pour s'assurer d'avoir une répétabilité des résultats. Pour exprimer les résultats, la moyenne des trois répétitions a été prise en compte.

L'activité oligosaccharidase a été déterminée par la méthode de dosage par la glucose oxydase (GOD), selon Werner et al. (1970).

25 L'activité hétérosidase a été évaluée indirectement, par mesure de la quantité de para-nitrophénol (PNP) libéré, d'après la méthode décrite par Nunan et al., (2015).

Les sucres réduits produits par l'hydrolyse des polysaccharides sont appréciés par la méthode de microdosage Somogyi-Nelson au réactif cupro-alcalin (Williams et al., 1978)

30 L'activité laccase a été évaluée en utilisant le 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) en tant que substrat, témoin d'oxydation. De façon succincte,

l'ABTS est diluée à 27,4 mg/L dans une solution de tampon MacIlvain à pH=5,2. 150 μ L de la solution d'ABTS est incubée avec 100 μ L d'une solution à tester puis incubée pendant 30 min à 37°C. La mesure de la DO à 405 nm permet de déterminer la quantité d'ABTS oxydée en utilisant la loi de Beer-Lambert (epsilon = 36000mM).

Les protéines sont dosées par la méthode utilisant le réactif BioRad®. Pour réaliser la gamme étalon l'albumine de sérum bovin a été utilisée.

1.1.5. Inhibition des laccases

Le dosage de l'activité laccase est basé sur une méthode colorimétrique où le substrat ABTS (2,2'-AZINO-bis (3-ETHYLBENZ-THIAZOLINE-6-SULFONIC ACID) sous forme réduite (incolore) est oxydé (coloration verte) en présence de l'enzyme. La méthode a été publiée par Bourbonnais et al. en 1990. Pour tester l'inhibition de l'activité laccase, la molécule testée est ajoutée au mélange réactionnel avec des quantités pouvant varier de 0,1 mM à 100 mM. Les inhibiteurs choisis pour faire les analyses sont des composés ayant un pouvoir antioxydant.

1.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

1.2.1. Prélèvement

Les souches bactériennes adhérant à la cuticule des fourmis ont été prélevées grâce à l'utilisation d'une solution dispersante correspondant à une solution de NaCl 0.9% contenant 10% de Tween 80.

1.2.2. Isolement

Les souches d'actinomycètes ont été isolées par repiquages successifs sur des milieux gélosé NA (composition : 2,5 g de K_2HPO_4 ; 0,5g de Nitrate de sodium ; 7,5 g d'agar ; 2 g de N-acetyl-glucosamine ; Qsp 500 ml ; pH : 6.5) ou PCA (composition : Peptone de caséine 5,0 g ; Extrait de levure 2,5 g ; D(+)-glucose 1,0 g ; Agar 14,0 g ; Qsp1000 ml pH 7) et vérification de la morphologie par microscopie optique.

1.2.3. Vérification de l'identité des souches

1.2.3.1. Extraction d'ADN

Les souches isolées de la surface extérieure des corps de fourmis et sélectionnées ont été réactivées dans 9 ml de milieu de culture (5 g peptone ; 2,5 g d'extrait de levure et 1 g de glucose).

La culture a été incubée sous agitation à 27°C pendant une nuit. Après croissance bactérienne, des prélèvements de 2 mL de culture ont été effectués sur chaque échantillon et placés respectivement dans des tubes eppendorf puis centrifugés à 10000 g pendant 10 min. La lyse des bactéries a été effectuée en utilisant le FastPrep®-24 (MP Biomedicals) et les tubes « Powerbead » inclus dans le kit. Les conditions étaient les suivantes : Fréquence 4.0 ms⁻¹, temps 45 s. Le kit PowerSoil DNA isolation (Mobio Laboratories) a été utilisé pour extraire l'ADN total à partir des culots obtenus après centrifugation. Le protocole appliqué est celui recommandé par le fournisseur. L'ADN a été élué dans 70 µL de tampon Tris-HCl fourni avec le kit. La concentration de l'ADN total extrait a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant le Nanodrop et conservé à -20°C avant analyses ultérieures.

1.2.3.2. Amplification d'une région du gène 16S ARNr spécifique aux bactéries

Une région spécifique au gène 16S ARNr spécifique aux bactéries a été amplifiée par PCR dans les conditions suivantes :

Les amorces utilisées étaient : 27F et 1390R (Mao et al. 2012). La vérification des amplicons avait été faite par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (poids/volume de tampon TAE 0,5X) contenant 0,5X de Sybersafe. La présence des bandes a été visualisée en exposant le gel à la lumière ultraviolette (UV).

1.2.3.3. Séquençage et affiliation phylogénétique des souches

Le séquençage de type Sanger des amplicons était effectué par la société Beckman Coulter Genomics. Le logiciel BioEdit a été utilisé pour aligner les séquences obtenues. La comparaison entre ces séquences et celles disponibles dans les banques de données a été réalisée en utilisant le logiciel BLAST sur NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/blink.cgi?mode=query>).

1.2.4. Mesure de l'activité antibactérienne en boîte de pétri sur disque

Le principe général est de tester en milieu solide la culture de la souche en présence de disque de papier imprégné de la molécule à tester. Pour chaque molécule testée au moins trois dilutions ont été réalisées. En présence d'une molécule, une auréole dont le diamètre est en relation avec l'intensité de l'effet inhibiteur apparaît autour du disque de papier. Cette approche permet de manière simple de sélectionner les molécules antibactériennes et de déterminer la concentration minimale d'inhibition (CMI) de la croissance bactérienne.

La mesure de l'activité antibactérienne peut être réalisée en milieu liquide (dans une culture bactérienne liquide) ou en milieu solide (sur une boîte de pétri gélosée) en ajoutant une concentration connue d'antibiotique. En milieu liquide l'inhibition est mesurée par une Densité Optique (DO), en milieu solide l'inhibition de la croissance est estimée par le diamètre de l'auréole correspondant à la zone où aucune croissance n'est observée.

A partir des isolats, un prélèvement est réalisé. Celui-ci est mis en suspension dans 1 ml de sérum physiologique sans mesure de la DO.

L'ensemencement est réalisé avec 100 µl de suspension à l'aide d'un râteau. Pour les tests d'huile essentielle sans dilution, un disque trempé dans l'huile essentielle est placé au centre de la boîte. Pour les dilutions (1/2 ; 1/5) les deux disques sont placés dans une même boîte. Les dilutions ont été réalisées en diluant les huiles essentielles dans de l'huile de tournesol. Une boîte témoin a été réalisée et consiste en un inoculât en l'absence d'huile essentielle. Un deuxième témoin cette fois ci avec un disque imprégné avec de l'huile de tournesol a également été effectué afin de vérifier l'absence d'un effet. Tous les produits ont été stérilisés et les expérimentations réalisées sous hotte en conditions stériles.

Après 4 jours de croissance, les diamètres d'inhibition ont été mesurés.

Pour cette étude et celle concernant l'utilisation de molécules, l'érythromycine a été utilisée. L'érythromycine est un antibiotique macrolide qui a un spectre antimicrobien similaire ou légèrement plus large que celui des pénicillines. Cette molécule sert de référent.

1.3. Evaluation de l'efficacité contre les fourmis champignonnistes sur 14 jours.

1.3.1. Préparation de la composition

La préparation des boulettes (ou appât) a été réalisée en incorporant à une pâte de farine de blé 10% de thiosulphate de sodium ou d'acide ascorbique. La pâte ainsi obtenue a été transformée en boulette ayant la forme d'un grain de riz. Ces boulettes ont ensuite été séchées à une température maximum de 28°C dans une étuve.

5

1.3.2. Essais contre les fourmis champignonnistes

1.3.2.1. Anti-laccase

Des premiers essais ont été réalisés afin d'acquérir de premières données concernant l'utilisation de boulettes imprégnées de différents inhibiteurs de laccase.

10

Deux jours après avoir déposé les boulettes, les nids sont visités pour la première fois puis à 4, 6, 8, 9, 10, 12 et 14 jours. On observe la présence ou non de boulettes (10 g) qui placées dans un petit sac plastique ont été déposées à proximité d'un dôme. A chaque visite le sachet est remplacé que les boulettes ou non aient été récoltées par les fourmis. Les boulettes imprégnées d'acide ascorbique ou de thiosulfate de sodium sont alternées lors de chaque visite.

15

Un test d'activité de la colonie est réalisé à l'aide d'une tige en bois. Celle-ci est enfoncée dans le sol à différents endroits autour du cône et lorsque l'on ne ressent aucune résistance cela signifie que la tige est enfoncée au niveau de la cavité contenant la meule. En quelques secondes plusieurs dizaines de fourmis dérangées par l'introduction de la tige dans la cavité de la meule remontent le long de la tige attestant ainsi de la vitalité de la colonie.

20

25

1.3.2.2. Anti-laccase + antibactérien

Les boulettes peuvent également contenir un mélange de molécule anti-laccase et antibactérienne.

1.4. Evaluation de l'efficacité contre les fourmis champignonnistes sur plusieurs mois.

30

1.4.1. Sites d'expérimentation.

Une expérimentation a été menée *in situ* aux Antilles françaises, sur 44 nids.

1.4.2. Compositions testées.

Plusieurs compositions selon l'invention ont été testées :

- thymol et L-cystéine,
- eugénol et L-cystéine,
- cinnamaldéhyde et L-cystéine,
- 5 - thymol et thiosulfate de sodium,
- eugénol et thiosulfate de sodium,
- cinnamaldéhyde et thiosulfate de sodium,
- thymol et glutathion,
- eugénol et glutathion,
- 10 - cinnamaldéhyde et glutathion,
- thymol,
- eugénol,
- cinnamaldéhyde,
- thiosulfate de sodium,
- 15 - L-cystéine, et
- glutathion.

La préparation des compositions s'est déroulée comme mentionné au point 1.3.1. Chaque composé actif était présent à hauteur de 10% de la composition (en poids de la composition), le reste étant constitué d'une pâte de farine de blé.

- 20 Chacune des compositions mentionnées ci-dessus a été testée sur deux ou trois nids. Au niveau de chaque nid ont été déposés en une seule fois 5 sachets contenant chacun 25 g de l'une des compositions mentionnées ci-dessus.

25 2. Résultats

2.1. Mesure de l'activité enzymatique

Les résultats des mesures d'activité enzymatique sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 Activités enzymatiques mesurées chez la fourmi champignoniste
Acromyrmex octospinosus* et le champignon *Leucophorus gongulophorus

30

Oligosaccharidases (μg de glucose mn^{-1} mg^{-1} protéines)	Fourmi	Champignon

Cellobiase	41,3	4,5
Gentiobiase	62,4	8,8
Lactase	12,0	5,0
Maltase	988,7	5,2
Saccharase	790,7	0,9
Hétérosidases (μg phénol mn^{-1} mg^{-1} protéines)	Fourmi	Champignon
α -galactosidase	48,5	14,2
β -galactosidase	12,0	10,3
α -glucosidase	2706,5	9,3
β -glucosidase	46,9	12,9
β -Xylosidase	22,1	14,0
N-acétyl-glucosaminidase	23,5	3,2
Polysaccharidase (μg équivalent glucose mn^{-1} mg^{-1} protéines)	Fourmi	Champignon
Amylase	385,6	26,5
Cellulase	75,9	1,7
Pullulanase	14,1	0,8
Xylanase	96,6	13,1
Phénol oxydase (μg fluoresceine mn^{-1} mg^{-1} protéines)	Fourmi	Champignon
Laccase	38830,5	8538,1

Le résultat majeur de ce criblage enzymatique est la mise en évidence d'une très forte activité laccase à la fois dans la meule et chez les fourmis. En effet, cette enzyme représente plus de 90% de l'ensemble des activités mesurées. Les laccases ou polyphénol oxydases catalysent l'oxydation des substances phénoliques (Thurston, 1994). Chez les champignons, les laccases outre leur action oxydative sur les composés polyphénoliques (implication dans la dégradation de la lignine) auraient également un rôle de détoxification vis-à-vis des substances défensives des plantes.

Les résultats de l'étude du spectre osidasique montrent que celui des fourmis est caractérisé par une activité amylolytique. Ainsi, l'activité maltase (dimère de l'amidon) des fourmis est non seulement très largement supérieure à celle détectée dans la meule mais elle est également l'une des enzymes majoritaires. Il en va de

même pour les activités mesurées sur l' α -glucoside. Ces fortes activités liées à la dégradation de l'amidon sont confirmées par de fortes activités amylases. L'amidon apparaît donc comme une source carbonée importante pour *Acromyrmex octospinosus* contrairement à ce que l'on peut observer au niveau de la meule.

5

2.2. Mesure de l'activité anti-laccase

Les résultats de mesure de l'activité anti-laccase sur des échantillons de fourmi ou de meule sont présentés dans le tableau 2.

10 **Tableau 2**

	IC50 <i>Acromyrmex octospinosus</i>	IC50 <i>Leucophorus gongylophorus</i>
L-cystéine	< 0,25 mM	< 0,25 mM
acide coumarique	< 0,25 mM	< 0,25 mM
thiosulfate de sodium	< 0,25 mM	< 0,25 mM
acide férulique	< 0,1 mM	< 0,05 mM
acide syringique	< 0,25 mM	< 0,1 mM
acide ascorbique	< 0,25 mM	< 0,25 mM
acide gallique	< 0,05 mM	< 0,05 mM

Les résultats d'inhibition de l'activité laccase présente chez les fourmis montrent que les composés listés permettent une inhibition d'au moins 50 % de l'activité laccase d'*Acromyrmex octospinosus* et de *Leucophorus gongylophorus* à des concentrations inférieures à 0.25 mM.

15

De plus, la L-cystéine entraîne, à des concentrations supérieures à 0,5mM, une inhibition de plus de 80 % de l'activité (Figure 1). L'acide ascorbique et l'acide gallique, entraînent quant à eux une inhibition de plus de 90 % de l'activité pour des concentrations de 0,25mM. Avec l'acide férulique et l'acide syringique ce pourcentage d'inhibition est obtenu avec une concentration de 0,5 mM (résultats non montrés).

20

Les résultats obtenus lors des inhibitions sont très homogènes pour les échantillons de meules et de fourmis. Toutes les molécules appliquées pour tester la capacité

inhibitrice, sont des molécules connues pour leur capacité de réagir en tant qu'antioxydants. Ces composés ont un très fort pouvoir inhibiteur.

2.3. Isolement de souches d'actinomycètes

- 5 Cette étape a permis d'isoler, à partir de fourmis appartenant à l'espèce *Acromyrmex octospinosus*, 15 souches d'actinomycètes dont 12 appartenant au genre *Tsukumurella*, deux au genre *Streptomyces* et une au genre *Gordonia*.
Au total 5 souches appartenant aux genres *Streptomyces*, *Tsukumurella* et *Gordonia* ont été sélectionnées pour l'analyse des substances antibactérienne.

10

2.4. Mesure de l'activité antibactérienne

- Les résultats obtenus sur la souche *Streptomyces* NA2B3 (Tableau 3) montrent que les huiles essentielles de thym, de cannelle et d'origan et de clou de girofle ont un effet inhibiteur sur la croissance. Considérant qu'une inhibition entraînant un
15 diamètre supérieur ou égal à 1,5 cm est un critère de sélection, les inventeurs ont identifié comme solutions préférées les huiles essentielles d'origan et de clou de girofle provoquant une inhibition avec des dilutions allant jusqu'au 1/5. Le thym et la cannelle agissent jusqu'à la dilution au 1/2.

- En moyenne sur les souches isolées à partir des fourmis champignonnistes (Tableau
20 4), les huiles essentielles de thym, origan, cannelle et clou de girofle permettent l'inhibition de la croissance. A l'exception de l'huile essentielle de thym, ces huiles ont une action délétère pour des dilutions au 1/5.

- Il est intéressant de noter que l'érythromycine donne des résultats similaires en ce qui concerne ces deux souches à savoir que cet antibiotique donne des résultats qui
25 globalement sont comparables à ceux obtenus avec les huiles essentielles de thym, cannelle, origan et clou de girofle.

Tableau 3. *Streptomyces* (NA 2B3) : diamètre d'inhibition en cm

Thym 1/2	4,5	±	0,6
Erythromycine 20%	3,6	±	0,4
Origan 1/2	3,2	±	0,4
Cannelle 1/2	2,9	±	0,6

Clou de girofle 1/2	2,4 ± 0,3
Erythromycine 10%	2,2 ± 0,3

Tableau 4. Diamètres moyens d'inhibition (cm) observés sur les 5 souches d'actinomycètes isolées à partir de fourmis champignonnistes

Thym pur	6,1 ± 1,2
Origan pur	5,8 ± 1,1
Cannelle pur	5,4 ± 0,6
Cannelle 1/2	4,9 ± 0,4
Origan 1/2	4,0 ± 0,3
Erythromycine 20%	3,6 ± 0,4
Thym 1/2	3,6 ± 0,3
Erythromycine 10%	3,2 ± 0,4
Clou de girofle 1/2	2,9 ± 0,2

5

Les résultats obtenus à partir des huiles essentielles testées montrent que 3 d'entre elles (thym, origan et cannelle) lorsqu'elles sont utilisées sans dilution présentent des diamètres d'inhibition compris entre 5,4 et 6,1 cm. Diluée au ½ l'huile essentielle de cannelle et d'origan entraînent une inhibition de croissance supérieure à celle
10 obtenue avec l'érythromycine 20% attestant par la même l'efficacité de ces huiles.

Tableau 5. Streptomyces (NA 2B3) : diamètre d'inhibition en cm

Erythromycine 20%	4,3 ± 0,3
Erythromycine 10%	3,5 ± 0,5
Cinnamaldéhyde 20 %	3,0 ± 1,5
Carvacrol 20%	2,2 ± 0,3
Thymol 20%	1,7 ± 0,8

Tableau 6. Diamètres moyens d'inhibition observés sur 5 souches d'actinomycètes isolées à partir de fourmis champignonnistes

15

Cinnamaldéhyde 20 %	4,5 ± 0,6
Erythromycine 20 %	3,6 ± 0,4
Erythromycine 10%	3,2 ± 0,4
Cinnamaldéhyde 10 %	2,9 ± 0,6
Eugénol 20%	2,9 ± 0,7
Carvacrol 20%	2,4 ± 0,3
Thymol 20%	2,2 ± 0,3

Les tests réalisés avec les molécules actives des huiles essentielles montrent clairement que le cinnamaldéhyde se différencie nettement des autres molécules testées. De plus, les résultats obtenus avec cette molécule sont comparables à ceux
5 obtenus avec l'antibiotique de référence (érythromycine). Cependant, les autres molécules testées à savoir l'eugénol, la carvacrol et le thymol présentent également de forts taux d'inhibition.

De manière tout à fait surprenante, une activité anti-laccase a été observée pour
10 l'eugénol et le thymol, ces composés étant de ce fait d'un intérêt particulier pour les compositions selon l'invention, car permettant d'agir sur les deux cibles identifiées par les inventeurs pour la lutte contre les fourmis champignonnistes (données non présentées).

2.5. Essais *in situ* sur les fourmis champignonnistes :

2.5.1. Tests des compositions selon l'invention sur 14 jours :

2.5.1.1. Composition comprenant une molécule anti-laccase :

Cette expérimentation a montré que les compositions formicides (sous forme de
20 boulettes formées avec de l'amidon) quel que soit le type d'inhibiteur sont prélevées par les fourmis et qu'elles peuvent induire un effet de dépérissement de la meule (zones blanchâtres, jaunâtres et ou rosâtres).

Ces expériences ont également permis d'observer un comportement d'abandon du nid par la colonie pouvant s'accompagner d'un déménagement de la meule. Cela est confirmé par la constatation d'une absence de meule ou de résidus de meule dans la cavité souterraine de certains nids.

- 5 Dans ces cas, la meule peut être reconstruite dans un second nid à distance du premier nid.

2.5.1.2. Composition comprenant une molécule anti-laccase et une molécule antibactérienne :

- 10 Le traitement de nid avec des compositions contenant de l'acide ascorbique (100 g/kg) et du chloramphénicol (10 g/kg) permet la disparition de toute activité. De plus, il n'a pas été observé de disparition de la meule et réapparition de la colonie avec cette combinaison.

15 2.5.1.3. Effet de l'appétant glucidique :

- Les tests avec les fourmis ont montré que les boulettes de farine étaient prélevées rapidement par les fourmis et confirment que la farine (essentiellement constitué d'amidon) présente un caractère attractif et que les compositions ne comprennent pas d'effet répulsif. Du fait de ce prélèvement et de l'importation des appâts par les fourmis dans les nids, il n'est donc pas besoin d'appliquer les compositions sur la colonie.

2.5.1.4. Tests des compositions selon l'invention (cf. partie 1.4.2.) sur plusieurs mois :

- 25 Les nids ont été surveillés durant la première quinzaine de jours (tableau 7) suivant le dépôt des combinaisons formicides, puis examinés à 41 jours (tableau 8) et 4 mois (tableau 9) suivant le dépôt des compositions.

Tableau 7. Observation des nids dans les 15 jours suivant le traitement

30

	Résultats à 15 jours
Période d'observation des nids	10-14

(nombre de jours après le dépôt)	
Nombre de nid observés	44
Nombre de nids avec déplacement de la meule (%)	29 (66%)

Normalement une couleur poivre et sel sur le haut de la meule, blanche dans la partie moyenne et marron dans la partie basse atteste d'une bonne vitalité de la meule. Au bout d'une période de 14 jours, un déplacement de la meule (déménagement) est observé dans 66% des nids sur l'ensemble des sites d'expérimentations. De plus un changement de la coloration de la meule déplacée a été observé : l'apparition de zones de couleurs jaunâtre, rosâtre ou bien une meule totalement blanche sans gradient de couleur ont été observées.

10 **Tableau 8. Observation des nids 41 jours suivant le traitement**

Résultats à 41 jours	
Nombre de nid observés	38
Nombre de nids morts	10 (26%)

Quarante et un jours suivant le dépôt des compositions, les nids morts ont été dénombrés sur les sites d'expérimentations (Tableau 8). 10 nids morts ont été observés sur les sites d'expérimentations (26%).

20 **Tableau 9. Observation des nids 4 mois suivant le traitement**

Résultats à 4 mois		
Nombre de nids morts	Nombre de nids vivants	Nombre de nids qui n'ont pas pu être observés
34	7	3

Quatre mois après le traitement 77% de nids morts ont été observés sur les sites d'expérimentations. Sur l'ensemble des sites il apparait donc que 77% des nids ont été détruits par le traitement avec les compositions de l'invention.

- 5 Ainsi, les compositions formicides comprenant un inhibiteur de laccase, un agent antibactérien ou bactériostatique des actinomycètes commensales des fourmis champignonnistes ou de leur combinaison sont efficaces dans la lutte contre les fourmis champignonnistes en provoquant l'abandon et/ou la destruction des nids.

Références

- Jian-Ming Lü, Peter H. Lin, Qizhi Yao, Changyi Chen. 2010 Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems *J. Cell. Mol. Med.* Vol 14. 840-860
- Richard FJ, Mora P, Errard C and Rouland C, Digestive capacities of leaf-cutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material. *J Comp Physiol B* (2005) 175: 297–303
- Qinlan RJ and Cherrett JM, Aspects of the symbiosis of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. *Ecological Entomology* (1978) 3, 221 -230
- Fisher PJ, Stradling DJ and Pegler DN. Leaf cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*. *Mycologist* (1994) 8, 3, 128-131
- North RD, Kackson CW and Howse PE. Evolutionary aspects of ants-fungus interactions in leaf-cutting ants. *Tree* (1997) 12, 386-389
- Bourbonnais R., Paice M.G., 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS*, 267, 99-102)
- Williams Janice, Henri Villarroya and Fahrettin Petek. α -Galactosidases II, III and IV from Seeds of *Trifolium repens*. (1978) *Biochem. J.* 175, 1069-1077.
- Nunan N, Lerch TZ, Pouteau V, Mora P, Changey F, Katterer T, Giusti-Miller S, Herrmann AM. Metabolising old soil carbon: Simply a matter of simple organic matter? *Soil Biology & Biochemistry* 88 (2015) 128-136.
- Werner W., Rey HG and Wielinger H. *Z Anal. Chem.* (1970) 252, 224–228.

Thurston, CF. "The structure and function of fungal laccases," *Microbiology* (1994) 140, 19-26.

Mao DP, Zhou Q, Chen CY and Quan ZX. *BMC Microbiology* (2012) 12:66.

Revendications

1. Méthode de lutte contre les fourmis champignonnistes comprenant l'utilisation d'au moins un inhibiteur de laccase.
- 5 2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend l'utilisation d'au moins un composé antibactérien et d'au moins un inhibiteur de laccase.
- 10 3. Méthode selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que l'inhibiteur de laccase est une molécule anti-oxydante, un chélateur, un détergeant, un acide organique non oxydant ou un métal cationique, de préférence une molécule anti-oxydante.
- 15 4. Méthode selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisée en ce que le composé antibactérien est sélectionné parmi les molécules appartenant à l'un des familles suivantes : β -lactamines, tétracyclines, quinolones, macrolides, glycopeptides, aminosides et molécules actives d'huiles essentielles.
- 20 5. Méthode selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'inhibiteur de laccase est sélectionné parmi les molécules suivantes : acide ascorbique, acide citrique, acide coumarique, acide férulique, acide syringique, acide gallique, acide lactique, acide tartrique, cystéine, glutathion, lécithines (E322), lipoate, Lutéine, lutéoline, lycopène, thiosulphate de sodium, vitamine E, α -tocophérol, γ -tocophérol et δ -tocophérol, sélénium et hydroxylammonium chloride.
- 25 6. Méthode selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisée en ce que le composé antibactérien est sélectionné parmi les molécules suivantes : cinnamaldéhyde, thymol, l'eugénol et le carvacrol.
- 30 7. Méthode selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le composé présentant l'activité inhibitrice de laccase exerce également une

activité bactéricide et/ou bactériostatique contre les actinomycètes présents dans la meule et sur les fourmis, lequel est sélectionné préférentiellement parmi le thymol et l'eugénol.

- 5 8. Méthode selon l'une des revendications 2 à 7, caractérisée en ce qu'elle comprend l'utilisation d'une composition formicide comprenant au moins un composé ou une combinaison de composés sélectionné(e) parmi :
- thymol et L-cystéine,
 - eugénol et L-cystéine,
 - 10 - cinnamaldéhyde et L-cystéine,
 - thymol et thiosulfate de sodium,
 - eugénol et thiosulfate de sodium,
 - cinnamaldéhyde et thiosulfate de sodium,
 - thymol et glutathion,
 - 15 - eugénol et glutathion,
 - cinnamaldéhyde et glutathion,
 - acide ascorbique,
 - thymol,
 - eugénol,
 - 20 - thiosulfate de sodium,
 - L-cystéine, et
 - glutathion.
- 25 9. Méthode selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre l'utilisation d'au moins un appétant oligosaccharidique ou polysaccharidique.
- 30 10. Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'appétant oligosaccharidique ou polysaccharidique est sélectionné parmi l'amidon, l'amylose, la laminarine, la maltodextrine et le glycogène.
11. Composition formicide susceptible d'être mise en œuvre dans la méthode selon l'une des revendications 2 à 10 caractérisée en ce qu'elle comprend au

moins un composé antibactérien et au moins un inhibiteur de laccase et au moins un appétant oligosaccharidique ou polysaccharidique.

12. Composition formicide selon la revendication 11 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé ou une combinaison de composés sélectionné(e) parmi :

- thymol et L-cystéine,
- eugénol et L-cystéine,
- cinnamaldéhyde et L-cystéine,
- thymol et thiosulfate de sodium,
- eugénol et thiosulfate de sodium,
- cinnamaldéhyde et thiosulfate de sodium,
- thymol et glutathion,
- eugénol et glutathion,
- cinnamaldéhyde et glutathion.

13. Composition formicide susceptible d'être mise en œuvre dans la méthode selon la revendication 9 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un inhibiteur de laccase et au moins un appétant oligosaccharidique ou polysaccharidique.

14. Composition formicide selon la revendication 13 caractérisée en ce que ledit inhibiteur de laccase est sélectionné parmi la L-cystéine, glutathion, thiosulfate de sodium ou l'acide ascorbique

15. Composition formicide selon l'une des revendications 11 à 14, caractérisée en ce que ledit au moins un appétant oligosaccharidique ou polysaccharidique est sélectionné parmi l'amidon, l'amylose, la laminarine, la maltodextrine et le glycogène.

16. Composition formicide selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisée en ce qu'elle comprend un composé exerçant à la fois une activité inhibitrice des laccases présentes dans la meule et chez les fourmis, et une activité

bactéricide et/ou bactériostatique contre les actinomycètes présents dans la meule et sur les fourmis.

5 17. Composition formicide selon l'une des revendications 11 à 16 comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, étalée ou séparée dans le temps.

10 18. Composition formicide selon la revendication 11 ou 12 caractérisée en ce que la concentration en composé antibactérien est comprise entre 1 et 200 g/kg et la concentration en inhibiteur de laccase est comprise entre 1 et 200 g/kg.

15 19. Composition formicide selon la revendication 11 ou 12 caractérisée en ce que la concentration en un appétant oligosaccharidique ou polysaccharidique est comprise entre 600 g/kg et 999 g/kg

20 20. Composition formicide selon la revendication 13 caractérisée en ce que la concentration en un appétant oligosaccharidique ou polysaccharidique est comprise entre 800 g/kg et 999 g/kg et la concentration en inhibiteur de laccase est comprise entre 1 et 200 g/kg.

1/1

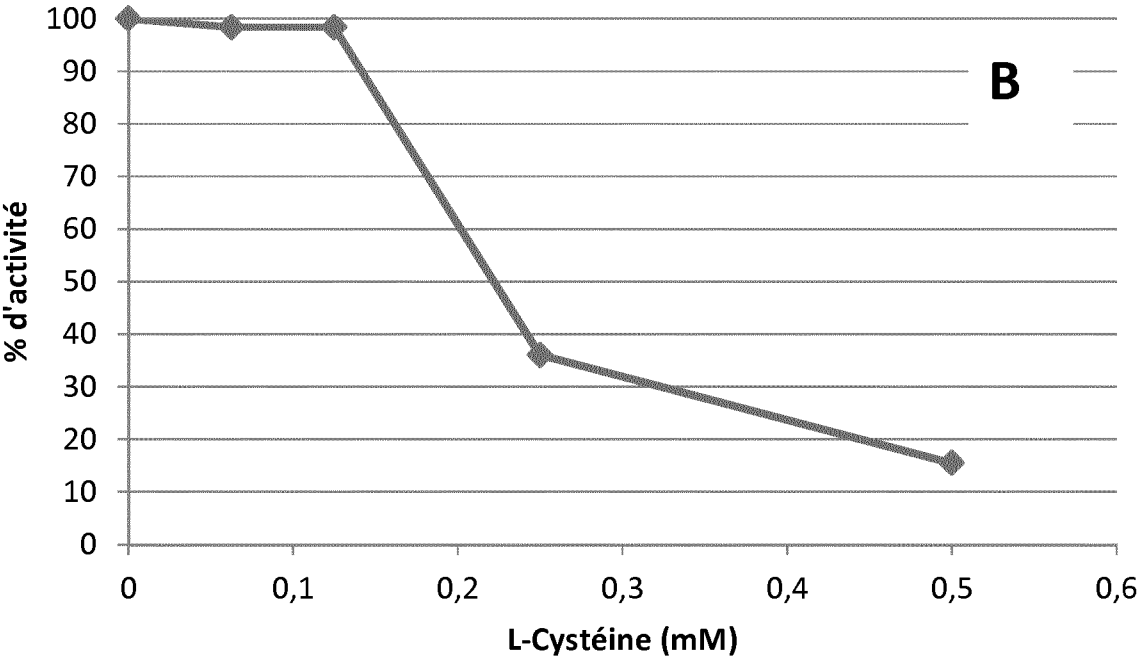
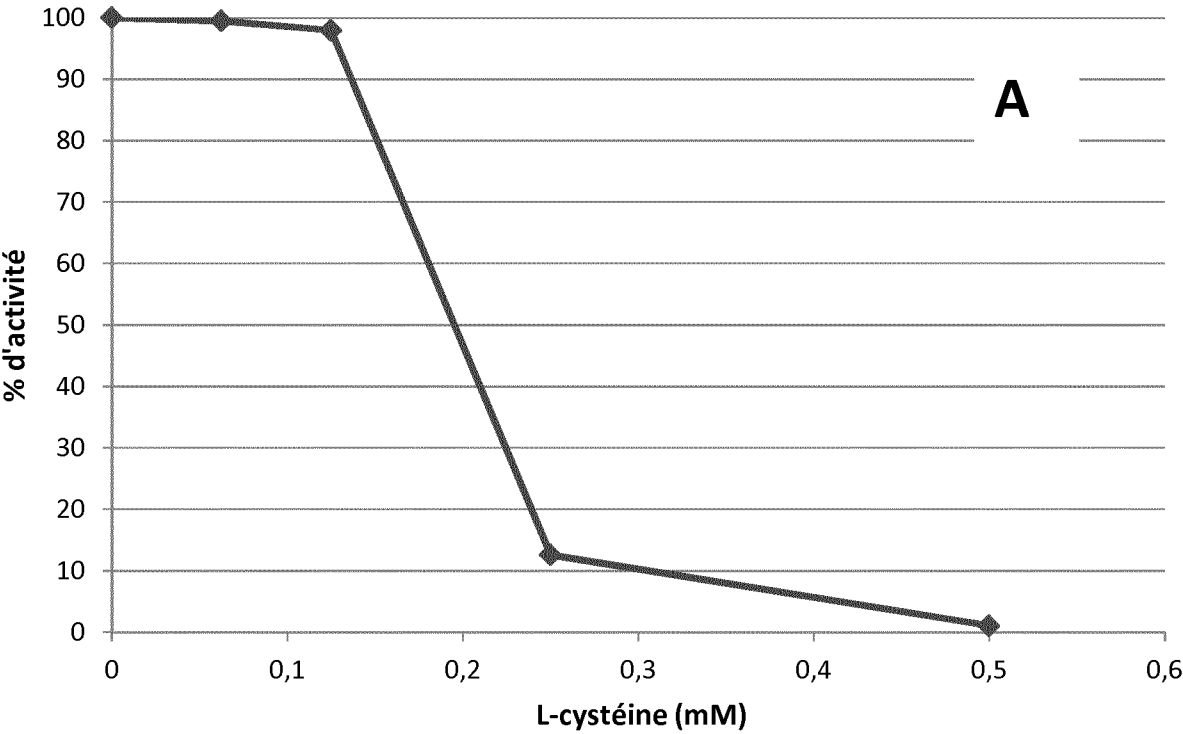


Figure 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/050726

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
INV.	A01N31/08	A01N31/16	A01N35/02	A01N37/38
	A01N37/44	A01N43/08	A01N43/22	A01N59/02
	A01N65/24	A01N65/28	A01P7/04	A01P3/00
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				
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, 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.
A	RO 107 544 B1 (MANZATU IOAN [RO]; JURAVLE GHEORGHE [RO]; DOBRESCU DUMITRU [RO]; JURAV) 29 March 1996 (1996-03-29) example 2			11
Y	----- H. H. DE FINE LICHT ET AL: "Laccase detoxification mediates the nutritional alliance between leaf-cutting ants and fungus-garden symbionts", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 110, no. 2, 24 December 2012 (2012-12-24), pages 583-587, XP055285160, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1212709110 the whole document ----- -/--			1-20
☒ 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 25 April 2017			Date of mailing of the international search report 08/05/2017	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer Bertrand, Franck	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/050726

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	C. R. CURRIE ET AL: "Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites", OIKOS, vol. 101, no. 1, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 91-102, XP055285420, DK ISSN: 0030-1299, DOI: 10.1034/j.1600-0706.2003.12036.x the whole document	1-20
Y	----- US 2015/368649 A1 (GROSSI DE SÁ MARIA FÁTIMA [BR] ET AL) 24 December 2015 (2015-12-24) paragraph [0010] - paragraph [0011] -----	1-20
Y	FR 2 655 240 A1 (ERPAC [FR]) 7 June 1991 (1991-06-07) page 1, paragraph 1 page 3, paragraph 1 -----	1-20
Y	WO 2012/050857 A1 (SMITHSONIAN INSTITUTION [US]; HERZ HUBERT [PA]; WCISLO WILLIAM THOMAS) 19 April 2012 (2012-04-19) cited in the application claims -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/050726

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
RO 107544	B1	29-03-1996	-----
US 2015368649	A1	24-12-2015	AR 094339 A1 29-07-2015
			BR 102012033506 A2 26-08-2014
			US 2015368649 A1 24-12-2015
			WO 2014100878 A2 03-07-2014
FR 2655240	A1	07-06-1991	FR 2655240 A1 07-06-1991
			OA 9472 A 15-11-1992
WO 2012050857	A1	19-04-2012	NONE

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2017/050726

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE				
INV.	A01N31/08	A01N31/16	A01N35/02	A01N37/38
	A01N37/44	A01N43/08	A01N43/22	A01N59/02
	A01N65/24	A01N65/28	A01P7/04	A01P3/00
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				
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, 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
A	RO 107 544 B1 (MANZATU IOAN [RO]; JURAVLE GHEORGHE [RO]; DOBRESCU DUMITRU [RO]; JURAV) 29 mars 1996 (1996-03-29) exemple 2			11
Y	----- H. H. DE FINE LICHT ET AL: "Laccase detoxification mediates the nutritional alliance between leaf-cutting ants and fungus-garden symbionts", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 110, no. 2, 24 décembre 2012 (2012-12-24), pages 583-587, XP055285160, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1212709110 le document en entier ----- -/-			1-20
☒ 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			Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
25 avril 2017			08/05/2017	
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 Bertrand, Franck	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	C. R. CURRIE ET AL: "Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites", OIKOS, vol. 101, no. 1, 1 avril 2003 (2003-04-01), pages 91-102, XP055285420, DK ISSN: 0030-1299, DOI: 10.1034/j.1600-0706.2003.12036.x le document en entier -----	1-20
Y	US 2015/368649 A1 (GROSSI DE SÁ MARIA FÁTIMA [BR] ET AL) 24 décembre 2015 (2015-12-24) alinéa [0010] - alinéa [0011] -----	1-20
Y	FR 2 655 240 A1 (ERPAC [FR]) 7 juin 1991 (1991-06-07) page 1, alinéa 1 page 3, alinéa 1 -----	1-20
Y	WO 2012/050857 A1 (SMITHSONIAN INSTITUTION [US]; HERZ HUBERT [PA]; WCISLO WILLIAM THOMAS) 19 avril 2012 (2012-04-19) cité dans la demande revendications -----	1-20

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2017/050726

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
RO 107544	B1	29-03-1996	-----	
US 2015368649	A1	24-12-2015	AR 094339 A1	29-07-2015
			BR 102012033506 A2	26-08-2014
			US 2015368649 A1	24-12-2015
			WO 2014100878 A2	03-07-2014

FR 2655240	A1	07-06-1991	FR 2655240 A1	07-06-1991
			OA 9472 A	15-11-1992

WO 2012050857	A1	19-04-2012	AUCUN	
