

(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
30 avril 2020 (30.04.2020)



(10) Numéro de publication internationale
WO 2020/083871 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07H 1/08 (2006.01) C07H 7/033 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2019/078652

(22) Date de dépôt international :
22 octobre 2019 (22.10.2019)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1859753 22 octobre 2018 (22.10.2018) FR

(71) Déposants : UNIVERSITE DE BOURGOGNE [FR/FR]
; Esplanade Erasme, 21000 DIJON (FR). INSTITUT
NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
- INRA - [FR/FR] ; 147 rue de l'Université, 75007 PARIS
(FR). UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE
[FR/FR] ; 1 chemin du Thil, 80000 AMIENS (FR).

INSTITUT NATIONAL SUPERIEUR DES SCIENCES
AGRONOMIQUES DE L'ALIMENTATION ET DE
L'ENVIRONNEMENT (AGROSUP DIJON) [FR/FR] ;
26 boulevard du Docteur Petitjean, 21000 DIJON (FR).

(72) Inventeurs : WENDEHENNE, David ; 25 rue La Fon-
taine, 21000 DIJON (FR). COMBIER, Maud ; 10 place
de l'Ecole, 68000 COLMAR (FR). POINSSOT, Benoit ;
21 rue Pierre de Saint-Jacob, 21000 DIJON (FR). PEL-
LOUX, Jérôme ; 21 rue de Doullens, 80080 AMIENS
(FR). BONNIN, Estelle ; 8 rue Aimé Pénel, 44700 OR-
VAULT (FR). CREPEAU, Marie-Jeanne ; 6 avenue Abel
Gance, 44300 NANTES (FR). JEANDROZ, Sylvain ; 42
Grande Rue, 21700 QUINCEY (FR).

(74) Mandataire : NOVAGRAAF TECHNOLOGIES ; Bâti-
ment O2, 2 rue Sarah Bernhardt, CS90017, 92665 ASNIÈ-
RES-SUR-SEINE CEDEX (FR).

(54) Title: POLYSACCHARIDE COMPOUNDS AND USE OF SAME FOR STIMULATING DEFENCE RESPONSES OF PLANTS AGAINST PATHOGENIC MICROORGANISMS

(54) Titre : COMPOSES POLYSACCHARIDIQUES, ET LEUR UTILISATION POUR STIMULER DES REPONSES DE DEFENSE DES PLANTES CONTRE LES MICROORGANISMES PATHOGENES

B

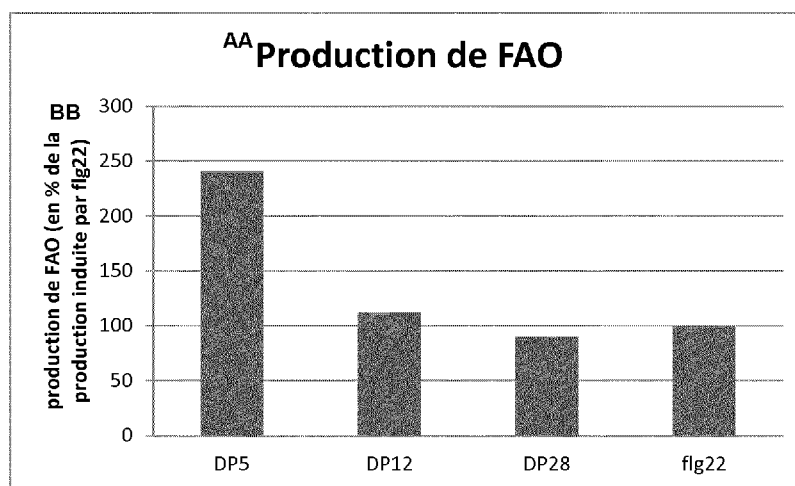


FIGURE 1

AA... Production of ROS

BB... Production of ROS (in % of the production induced by flg22)

(57) Abstract: The present invention relates to novel oligogalacturonans having a degree of methylation of 0 and a degree of polymerisation of 1 to 10, and to the use thereof for stimulating defence responses of plants against pathogenic microorganisms.

(57) Abrégé : La présente invention concerne de nouveaux oligogalacturonanes possédant un degré de méthylation de 0 et un degré de polymérisation de 1 à 10, et leur utilisation pour stimuler des réponses de défense des plantes contre des microorganismes pathogènes.

[Suite sur la page suivante]



WO 2020/083871 A1

(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, JO, 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), eurasién (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))

COMPOSES POLYSACCHARIDIQUES, ET LEUR UTILISATION POUR STIMULER DES REPONSES DE DEFENSE DES PLANTES CONTRE LES MICROORGANISMES PATHOGENES

5

DESCRIPTION

Domaine technique de l'invention

La présente invention concerne de nouveaux oligogalacturonanes complètement déméthylés et possédant un degré de polymérisation de 1 à 10, et leur
10 utilisation pour stimuler des réponses de défense des plantes contre des microorganismes pathogènes.

La présente invention trouve par exemple des applications dans le domaine de la protection des végétaux, du biocontrôle.

Dans la description ci-dessous, les références entre crochets ([]) renvoient à la
15 liste des références présentée à la fin du texte.

Etat de la technique

Dans leur environnement, les plantes sont confrontées à des microorganismes pathogènes incluant des bactéries, des champignons, des oomycètes ainsi que des
20 virus. Elles résistent à la plupart de ces agresseurs via l'activation de processus de défense (concept d'immunité des plantes). Toutefois lorsque cette résistance est inefficace, le développement du microorganisme altère la croissance de la plante, voire tue la plante engendrant ainsi des pertes annuelles de récolte avoisinant les 30% à l'échelle mondiale. Comprendre les mécanismes associés aux processus infectieux et
25 à la résistance des plantes aux maladies représente ainsi un enjeu majeur en agriculture.

L'utilisation des produits phytosanitaires utilisés classiquement en protection des cultures contre les maladies est problématique en termes de respect de

l'environnement et de santé des utilisateurs et des consommateurs [voir par exemple le rapport d'information fait au nom de la mission commune d'information sur les pesticides et leur impact sur la santé et l'environnement présenté par Madame la Sénatrice N. Bonnefoy (Sénat, Session ordinaire de 2012-2013, Vol. 12). Des dispositions ont déjà été prises, dans le cadre du plan Ecophyto, afin de réduire l'utilisation de ces produits. Le développement de méthodes de protection des cultures plus respectueuses de l'environnement et à moindre risque pour l'utilisateur et les populations est un enjeu majeur. Dans ce contexte, la stimulation des défenses naturelles des plantes par des stimulateurs de défense de plantes (SDP) ou éliciteurs a déjà montré un réel potentiel d'application.

L'activation des mécanismes de défense des plantes nécessite la reconnaissance de l'agent pathogène. Les cellules végétales possèdent effectivement des protéines capables de reconnaître des motifs moléculaires portés par les pathogènes (PAMP, Pathogen-Associated Molecular Patterns) mais également des facteurs de virulence produits par ces derniers. Ce second cas de figure implique des protéines végétales appelées protéines de résistance. Les réactions de défense de la plante peuvent donc être induites et mimées par l'application de molécules produites par le pathogène (notamment par des PAMP) voire issues de la plante elle-même (molécules résultant de la dégradation de la plante par le pathogène ou DAMP, Damage-Associated Molecular Patterns, communément appelées SDP ou éliciteurs). De manière plus générale, des molécules mimant les signaux végétaux ou fongiques peuvent être utilisés.

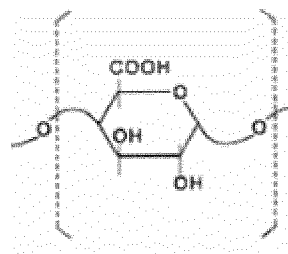
Les éliciteurs présentent un intérêt biotechnologique important, Il a été ainsi démontré que l'application de SDP était capable de diminuer la sensibilité aux pathogènes virulents et ainsi assurer une forme de protection (résistance induite). De plus, ces molécules conduisent à une induction de résistance contre une large gamme de pathogènes (Trouvelot et al., 2014) [1]. Certaines de ces molécules ont montré une réelle efficacité en parcelle cultivée et permettent de réduire la quantité de produits phytosanitaires de synthèse classiquement utilisés dans la lutte des cultures contre les maladies.

Description de l'invention

Les Inventeurs ont identifié de nouvelles molécules élicitrices d'intérêt. Ces molécules naturelles, issues de polysaccharides provenant de la paroi des végétaux, présentent des caractéristiques chimiques et des propriétés originales. Elles
5 présentent une forte activité phyto-protectrice en conditions contrôlées. Elles sont notamment capables d'induire chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et chez la vigne (*Vitis vinifera*) des réponses de défense et un phénomène de résistance très efficace à plusieurs microorganismes pathogènes. L'utilisation de ces molécules va donc permettre de conférer une protection de cultures en serres ou en plein champ
10 (horticulture, plantes maraichères, grandes cultures) contre des maladies cryptogamiques et ainsi réduire l'utilisation de produits phytosanitaires. Ces nouvelles molécules élicitrices des réponses de défenses des plantes sont des oligogalacturonanes possédant un degré de polymérisation inférieur à ceux décrits dans la littérature (Van Cutsem et Messiaen, 1994 ; Ferrari et al., 2007) [2, 3] et/ou
15 entrant dans la composition des produits actuellement développés (e.g. COS-OGA développé par Fytofend) qui privilégient des molécules plus longues de DP compris entre 9 et 20. Plus précisément ils possèdent un degré de polymérisation de 1 à 10, de préférence de 4 à 10, préférentiellement de 4 à 6, et tout préférentiellement centré sur 5. Une autre caractéristique de ces nouveaux oligogalacturonanes est qu'ils sont
20 complètement déméthylés (DM0).

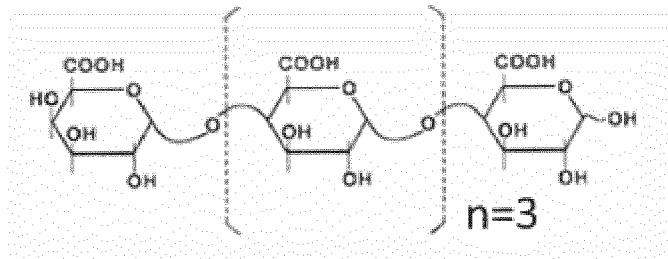
Bien que le procédé de déméthylation des oligogalacturonanes soit connu, la présente invention est la première utilisation de ce type de modification chimique des oligogalacturonanes pour la stimulation des défenses des plantes.

La présente invention a donc pour objet un oligogalacturonane de formule (I)
25 suivante :



formule (I)

possédant un degré de méthylation de 0 et un degré de polymérisation de 1 à 10, de préférence de 4 à 10, préférentiellement de 4 à 6, et tout préférentiellement centré sur 5 et de formule majoritaire suivante :



5 La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention des oligogalacturonanes de l'invention comprenant les étapes de :

- a) déméthylation des pectines par désestérification ;
- b) extraction en condition acide d'un homogalacturonane à partir des pectines désestérifiées obtenues à l'étape a) ;
- 10 c) préparation d'une fraction d'oligogalacturonanes par autolyse acide de l'homogalacturonane obtenu à l'étape b), suivie d'une précipitation en éthanol.

Les pectines sont présentes en grande quantité dans les parois primaires des Dicotylédones, en particulier dans les parois végétales de nombreux fruits [agrumes
15 ou citrus (orange, citron, pamplemousse, etc...), pomme, etc...] et légumes. Selon un mode de réalisation particulier du procédé de l'invention, les pectines sont de préférence issues du citrus.

Il est à noter que la variation de la concentration en éthanol à l'étape c) permet d'obtenir des oligogalacturonanes de DP différents. Par exemple : précipitation en
20 éthanol 85% pour l'obtention d'oligogalacturonanes majoritairement de DP2, précipitation en éthanol 64% pour l'obtention d'oligogalacturonanes majoritairement de DP5, précipitation en éthanol 30% pour l'obtention d'oligogalacturonanes majoritairement de DP12, précipitation en éthanol 15% pour l'obtention d'oligogalacturonanes majoritairement de DP28. Les autres conditions ne varient pas.

25 Le procédé de la présente invention peut comprendre en outre une étape de fractionnement d) de la fraction d'oligogalacturonanes obtenue à l'étape c), par une

méthode bien connue de l'Homme du métier, par exemple, par dialyse, par chromatographie en phase liquide à haute performance, ou par chromatographie d'exclusion, etc... afin d'isoler/purifier les oligogalacturonanes selon leur degré de polymérisation (DP).

5 La présente invention a également pour objet l'utilisation des oligogalacturonanes de l'invention en phyto-protection. Ils permettent en effet de stimuler les réponses de défense des plantes contre des microorganismes pathogènes.

10 Brève description des figures

La figure 1 représente la production de formes actives de l'oxygène (FAO) induite chez *Arabidopsis thaliana* par des oligogalacturonanes (OG) majoritairement de degré de polymérisation 5 (DP5) avec différents degrés de méthylation (DM0, DM30 et DM 60) (A), et de différents degrés de polymérisation (DP5, DP12 et DP28) avec un degré de méthylation 0 (DM0) (B).

La figure 2 représente l'estimation du niveau d'accumulation des transcrits des gènes PER4 (A), WRKY75 (B), RLP7 (C) et PAD3 (D) chez *Arabidopsis thaliana* par des oligogalacturonanes (OG) majoritairement de degré de polymérisation 5 (DP5) avec différents degrés de méthylation (DM0, DM30 et DM 60).

20 La figure 3 représente l'estimation du niveau d'accumulation des transcrits des gènes PER4 (A), WRKY75 (B), RLP7 (C) et PAD3 (D) chez *Arabidopsis thaliana* par des oligogalacturonanes (OG) de différents degrés de polymérisation (majoritairement de DP5, DP12 ou DP28) avec un degré de méthylation 0 (DM0).

25 La figure 4 représente les niveaux de protection induits chez *Arabidopsis thaliana* par des oligogalacturonanes (OG) majoritairement de degré de polymérisation 5 (DP5) avec différents degrés de méthylation (DM0, DM30 et DM 60) vis-à-vis de *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Hpa).

30 La figure 5 représente les niveaux de protection induits chez *Arabidopsis thaliana* par des oligogalacturonanes (OG) de différents degrés de polymérisation (majoritairement de DP5, DP12 ou DP28) avec un degré de méthylation 0 (DM0) vis-à-vis de *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Hpa) (A) et de *Botrytis cinerea* (B).

La figure 6 compare les niveaux de protection induits chez *Arabidopsis thaliana* par des oligogalacturonanes majoritairement de degré de polymérisation 5 (DP5) et de degré de méthylation 0, avec deux oligogalacturonanes de pureté supérieure et de degré de polymérisation 4 (DP4) et 6 (DP6), respectivement, et un degré de
5 méthylation 0 (DM0), et avec un produit OG commercialisé (CosA) vis-à-vis de *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Hpa) (A) et de *Botrytis cinerea* (B).

La figure 7 représente les niveaux de protection induits chez la vigne (*Vitis vinifera*) par des oligogalacturonanes (OG) (A) majoritairement de degré de polymérisation (DP5) avec différents degrés de méthylation (DM0, DM30 ou DM60)
10 vis-à-vis du pathogène *Plasmopara viticola* (agent du mildiou), et (B) majoritairement de degré de polymérisation 5, 12 ou 28 (DP5, DP12 ou DP28) avec un degré de méthylation 0 (DM0) vis-à-vis du pathogène *Plasmopara viticola* (agent du mildiou). L'efficacité des produits DP5, DP12 et DP28 est également comparée avec celle de la laminarine sulfatée (lam. sulf.).

La figure 8 représente les niveaux de protection induits chez la vigne (*Vitis vinifera*) par l'oligogalacturonane (OG) de degré de polymérisation 5 (DP5) avec un degré de méthylation 0 (DM0), et par la substance d'origine synthétique BION® 50 WG, en comparaison d'un témoin non traité, vis-à-vis du pathogène *Plasmopara viticola* (agent du mildiou).
15

EXEMPLES

(à vérifier / compléter)

EXEMPLE 1 : SYNTHÈSE – PRODUCTION – IDENTIFICATION DES MOLECULES 25 ELICITRICES DE L'INVENTION

Les oligogalacturonanes (OG) de degré de polymérisation majoritairement centrés sur 5 (DP5) avec un degré de méthylation 0 (DM0) ont été obtenus comme suit :

a) Déméthylation des pectines

Les molécules d'intérêt ont été obtenues à partir de pectines de citrus. Les pectines ont été traitées à froid (+4°C) après solubilisation dans l'eau une nuit à 7,5
30

g/L et désestérification par la soude à pH 12 pendant 24 h. Le pH a ensuite été abaissé à pH 4,5 par ajout d'acide chlorhydrique 1 N. La solution a été concentrée 2 fois puis précipitée par l'éthanol (concentration finale 72%) à 4°C. Le précipité a été lavé à l'éthanol 72% et séché par échange de solvants. Le rendement en pectines désestérifiées a été de l'ordre de 94%.

b) Extraction d'un homogalacturonane

Les pectines désestérifiées ont été solubilisées dans l'eau à 10 g/L pendant une nuit. La solution a été acidifiée par ajout d'acide chlorhydrique jusqu'à une concentration finale de 0,1 N et maintenue à 80°C pendant 72 h. L'homogalacturonane ainsi isolé a précipité. Le précipité a été lavé par l'acide chlorhydrique 0,1 N puis par de l'eau, puis séché par échange de solvants. Le rendement attendu a été de l'ordre de 55% sur la pectine initiale.

c) Préparation d'une fraction d'oligogalacturonanes centrée sur DP 5.

L'homogalacturonane obtenu a été solubilisé dans l'eau à 10 g/L et soumis à autolyse en le maintenant à une température de 100°C pendant 24 h. La fraction soluble a été concentrée et précipitée en éthanol (EtOH) 64% à 4°C. Après reprise en eau du précipité et dialyse, le rendement attendu a été de l'ordre de 25% sur l'homogalacturonane, soit environ 14% sur la pectine initiale.

Les conditions de précipitation à l'éthanol, telles que décrites ci-dessus à l'étape c) ont été ajustées pour faire varier le DP majoritaire de la fraction d'oligogalacturonanes obtenue à l'issue du procédé de production décrit ci-dessus. Ainsi :

- EtOH 85% pour fraction d'oligogalacturonanes de DP centré sur 2.
- **EtOH 64% pour fraction d'oligogalacturonanes de DP centré sur 5.**
- EtOH 30% pour fraction d'oligogalacturonanes de DP centré sur 12
- EtOH 15% pour fraction d'oligogalacturonanes de DP centré sur 28.

Suite à l'étape de précipitation en éthanol, il a été possible d'isoler des oligogalacturonanes d'une pureté supérieure, d'un DP particulier, (par exemple de DP4 ou DP6) à partir de la fraction d'oligogalacturonanes obtenue selon le procédé décrit ci-dessus qui comprend majoritairement des oligogalacturonanes de DP5, par

purification sur colonne semi-préparative Carbowac et détection par HPAEC-PAD après élution dans un tampon KOAc (pH8).

EXEMPLE 2 : TEST DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES MOLECULES ELICITRICES DE L'INVENTION CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA* : MESURE D'EVENEMENTS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES MOBILISES LORS DE LA REPONSE IMMUNITAIRE DES PLANTES.

Les plantes ont élaboré des stratégies de défense efficace pour lutter contre les agents pathogènes. Suite à la reconnaissance directe ou indirecte de l'agresseur, des mécanismes moléculaires de défense, caractérisés notamment par la production de formes actives de l'oxygène (FAO) ou l'expression de gènes codant pour des protéines de défenses, sont activés.

2.1. Production de formes actives de l'oxygène (FAO)

La production de FAO, et plus particulièrement de H_2O_2 , a été mesurée par la technique de chimioluminescence du luminol selon le protocole décrit par Rasul et al. (2012) [4] à partir de disques foliaires d'*Arabidopsis thaliana* traitée par différents oligogalacturonanes à une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$.

Les résultats présentés dans la figure 1A ont permis de comparer les effets de trois degrés de méthylation (DM) 0, 30 et 60 pour un oligogalacturonane (OG) de degré de polymérisation 5 (DP5), et ceci en comparaison avec un traitement par flg22, protéine connue pour déclencher la production d' H_2O_2 . Le DM0 a induit une production supérieure aux deux autres molécules (DM30 et 60).

Les résultats présentés dans la figure 1B ont permis de comparer les effets de trois degrés de polymérisation (DP) 5, 12 et 28 avec un DM0 et ceci en comparaison avec un traitement par flg22, protéine connue pour déclencher la production d' H_2O_2 .

Il est ressorti que DP5 induit une production de FAO au moins deux fois supérieure aux autres molécules testées.

2.2. Expression de gènes marqueurs de l'immunité végétale

L'accumulation des transcrits de quatre gènes marqueurs de défense (WRKY75, PER4, PAD3 et RLP7) a également été mesurée selon le protocole décrit par Rasul et al. (2012) [4] à partir de disques foliaires d'*Arabidopsis thaliana* traitée par différents oligogalacturonanes (OG) à une concentration de 50 µg/ml.

Les résultats présentés dans la figure 2 ont permis de mettre en évidence que trois oligogalacturonanes (OG) de degré de polymérisation 5 (DP5) avec différents degrés de méthylation (DM0, 30 et 60) ont permis d'induire l'expression des quatre gènes marqueurs. Il est à noter que l'oligogalacturonane de DM0 a induit la plus forte expression des quatre gènes de défense étudiés.

Les résultats présentés dans la figure 3 ont permis de mettre en évidence que trois oligogalacturonanes (OG) de différents degrés de polymérisation (DP5, 12 et 28) avec un degré de méthylation 0 (DM0) ont permis d'induire l'expression des quatre gènes marqueurs. Il est à noter que l'oligogalacturonane DP5 a induit en moyenne la plus forte expression des quatre gènes de défense étudiés.

EXEMPLE 3 : TEST DE PROTECTION : CAPACITE DES MOLECULES ELICITRICES DE L'INVENTION A INDUIRE LA RESISTANCE FACE AUX PATHOGENES

3.1 Protection chez *Arabidopsis thaliana*

Les niveaux de protection induit par les oligogalacturonanes (OG) ont été estimés contre deux pathogènes *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Hpa) et *Botrytis cinerea*. Ces deux pathogènes sont taxonomiquement différents ; ils appartiennent respectivement au groupe des oomycètes et au groupe des champignons. De plus, ils possèdent chacun un mode de vie différent (respectivement biotrophe et nécrotrophe) ce qui se traduit, en autres, par l'induction chez la plantes de mécanismes immunitaires différents (Pieterse et al., 2009) [5].

Les tests de protection ont premièrement été réalisés sur plante entière après traitement par pulvérisation jusqu'à ruissellement avec des oligogalacturonanes (OG) de degré de polymérisation 5 (DP5) avec différents degré de méthylation (DM0, 30 et 60) à une concentration de 200 µg/ml. Les traitements ont été réalisés 24h avant l'inoculation avec Hpa de plantes de 3 semaines par pulvérisation d'une suspension

de spores ($2,5 \times 10^5$ conidies.mL⁻¹) jusqu'à formation de fines gouttelettes sur la face supérieure des feuilles. Les plantes ont ensuite été placées en chambre de croissance, et l'effet des OG a été évalué après 7 jours post-inoculation avec Hpa par comptage du nombre de spores par gramme de poids frais de plante.

La figure 4 présente les résultats concernant l'effet du degré de méthylation pour le DP5. L'oligogalacturonane de DM0 a réduit de 60% les symptômes (par rapport au témoin non traité).

Deuxièmement, les tests de protection ont été réalisés sur plante entière après traitement par pulvérisation jusqu'à ruissellement avec des oligogalacturonanes (OG) de différents degrés de polymérisation (DP5, 12 et 28) avec un degré de méthylation 0 (DM0) utilisés à une concentration de 200 µg/ml. Les traitements ont été réalisés 24h (i) avant l'inoculation avec Hpa (A) de plantes de 3 semaines par pulvérisation d'une suspension de spores ($2,5 \times 10^5$ conidies.mL⁻¹) jusqu'à formation de fines gouttelettes sur la face supérieure des feuilles, ou (ii) avant l'inoculation avec *B. cinerea* (B) de plantes de 4 semaines en déposant quatre gouttelettes de 5 µl de suspension de spores (5×10^4 conidies.mL⁻¹) sur quatre feuilles de chaque plante. Les plantes ont ensuite été placées en chambre de croissance, et l'effet des OG a été évalué (i) après 7 jours post-inoculation avec Hpa par comptage du nombre de spores par gramme de poids frais de plante, ou (ii) après 3 jours post-inoculation avec *B. cinerea* par mesure du diamètre moyen (en mm) des lésions et en comptant le pourcentage de lésions se développant en dehors de la gouttelette d'inoculation.

Les résultats présentés dans la figure 5 ont permis de montrer que globalement le produit DP5 est plus efficace que les DP12 et DP28.

Concernant la protection contre Hpa (Figure 5A), DP12 et DP28 n'induisent aucune protection, voire une augmentation des symptômes (valeurs supérieures ou égales à 100%). Les résultats présentés dans la figure 5B ont permis de montrer que les trois molécules ont réduit le diamètre des nécroses induites par *B. cinerea* en comparaison au témoin non traité ; le produit DP5 réduisant de 33% le diamètre des nécroses induites par *B. cinerea*.

Par la suite, des essais ont permis de comparer le produit DP5 à deux produits de pureté supérieure de DP4 et DP6 et au produit OG commercialisé (*i.e.* COS-OGA ou CosA) dans la capacité à induire la résistance chez *Arabidopsis thaliana* contre Hpa et *B. cinerea* (Figure 6A et 6B, respectivement).

Les résultats présentés dans la figure 6 ont montré que la fraction d'oligogalacturonanes de DP centré majoritairement sur 5 (DP5) est la plus efficace contre Hpa (A) et *B. cinerea* (B) en permettant de retarder la progression de l'infection par rapport aux plantes témoin, mais que les fractions d'oligogalacturonanes de DP4 ou DP6 purifiées qui en dérivent ont montré également une efficacité significative selon le pathosystème étudié. En revanche, COS-OGA (CosA) s'est montré inefficace dans les deux cas.

Cela a renforcé l'intérêt d'utiliser des fractions d'oligogalacturonanes obtenues après l'étape de précipitation en éthanol, par exemple de fractions d'oligogalacturonanes de DP centré majoritairement sur 5 (contenant un peu de DP4 et DP6), car présentent au moins la même efficacité sinon meilleure que des sous-fractions plus purifiées qui en dérivent et sont plus simples et moins coûteuses à obtenir.

3.2. Test de protection de la vigne (*Vitis vinifera*) contre le pathogène *Plasmopara viticola* (agent du mildiou).

La capacité des oligogalacturonanes à induire une résistance a été estimée chez la vigne contre *P. viticola*. Cet oomycète biotrophe est responsable de pertes importantes du rendement et de la qualité des récoltes.

Pour ce faire, une estimation de la colonisation par le pathogène *P. viticola* de la surface de feuilles de *V. vinifera* préalablement traitées par différents oligogalacturonanes a été réalisée. Le traitement par les oligogalacturonanes (concentration de 2mg/ml) a été réalisé 48h avant inoculation par l'agent pathogène selon le protocole décrit par Khiook et al. (2013) [6].

La figure 7A présente les résultats concernant l'effet du degré de méthylation pour le DP5. DM0 a réduit de près de 80% les symptômes (par rapport au témoin non traité) et a été significativement plus efficace que les autres DM.

Les résultats présentés dans la figure 7B concernent l'effet du degré de polymérisation pour des OG déméthylés (DM0). Ces résultats ont permis de montrer que, par rapport au témoin non traité, les produits DP5 et DP28 ont réduit de manière significative la colonisation de *P. viticola* et la sévérité de la maladie ; le produit DP5 montrant la meilleure efficacité.

Les résultats présentés dans la Figure 7B montrent également que le produit DP5 possède une efficacité supérieure à la laminarine sulfatée (traitement à une concentration de 1 mg/ml), autre SDP d'origine polysaccharidique dont la protection sur la vigne vis-à-vis de *P. viticola* a été décrite dans la littérature par Trouvelot et al. (2008) [7].

Une estimation de la colonisation par le pathogène *P. viticola* de la surface de feuilles de *V. vinifera* préalablement traitées par (i) l'oligogalacturonane DP5 ou (ii) une substance d'origine synthétique (BION® 50 WG ; 50 % acibenzolar-S-méthyl), homologuée sur certaines cultures dont elle stimule les défenses naturelles et décrite comme efficace sur la vigne dans la littérature (Perazzolli et al., 2008) [8], a également été réalisée. Le traitement s'est déroulé comme décrit ci-dessus, et la sévérité de la maladie a été estimée d'après la méthode décrite par Khiook et al. (2013) [6].

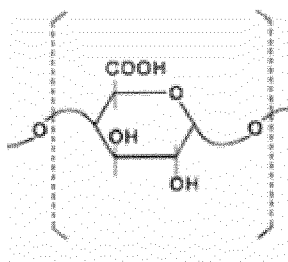
Les résultats présentés dans la Figure 8 confirment l'efficacité de l'oligogalacturonane DP5 en comparaison du témoin non traité, et montrent que l'oligogalacturonane DP5 possède une efficacité équivalente au fongicide BION® 50 WG utilisé à 1 mg/ml.

Liste des références

1. Trouvelot et al., *Front. Plant. Sci.*, 5 : 592, 2014
2. Van Cutsem et Messiaen, *Acta Bot. Neerl.*, 43 : 231–245, 1994
- 5 3. Ferrari et al., *Plant Physiol.*, 144 : 367-379, 2007
4. Rasul et al., *Plant Cell Environ.*, 35 : 1483-1499, 2012
5. Pieterse et al., *Nat. Chem. Biol.*, 5 : 308-316, 2009
6. Khiook et al., *J. Microbiol. Methods* 95 : 235-244, 2013
7. Trouvelot et al., *Mol. Plant-Microb. Interact.* , 21: 232-243, 2008
- 10 8. Perazzolli et al., *Biological control*, 47(2) : 228-234, 2008

REVENDICATIONS

- 1) Oligogalacturonane de formule (I) suivante :

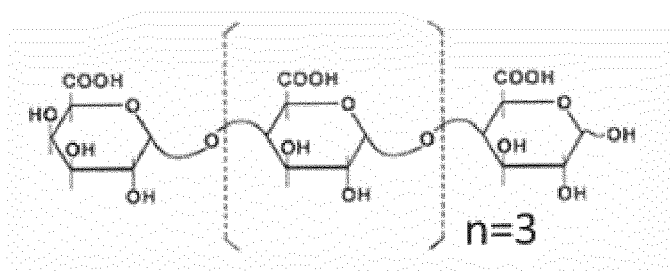


formule (I)

- 5 possédant un degré de méthylation de 0 et un degré de polymérisation de 1 à 10.

- 2) Oligogalacturonane selon la revendication 1, possédant un degré de polymérisation de 4 à 6.

- 3) Oligogalacturonane selon la revendication 2, possédant un degré de polymérisation centré sur 5 et de formule suivante :



10

- 4) Procédé de préparation d'un oligogalacturonane selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, comprenant les étapes suivantes :

- a) déméthylation des pectines par désestérification ;
- b) extraction en condition acide d'un homogalacturonane à partir des pectines désestérifiées obtenues à l'étape a) ;
- c) préparation d'une fraction d'oligogalacturonanes par autolyse acide de l'homogalacturonane obtenu à l'étape b), suivie d'une précipitation en éthanol.

15

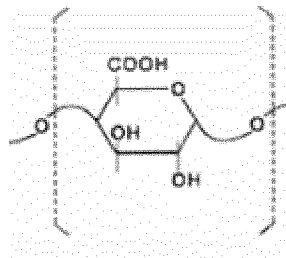
- 5) Procédé selon la revendication 4, comprenant en outre une étape de fractionnement d) afin d'isoler ou purifier les oligogalacturonanes de même degré de polymérisation.

20

6) Procédé selon la revendication 5, où l'étape de fractionnement d) est réalisée par dialyse, par chromatographie en phase liquide à haute performance, ou par chromatographie d'exclusion.

7) Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, où la concentration en éthanol de l'étape c) est de 64%.

8) Oligogalacturonane obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, de formule (I) suivante :



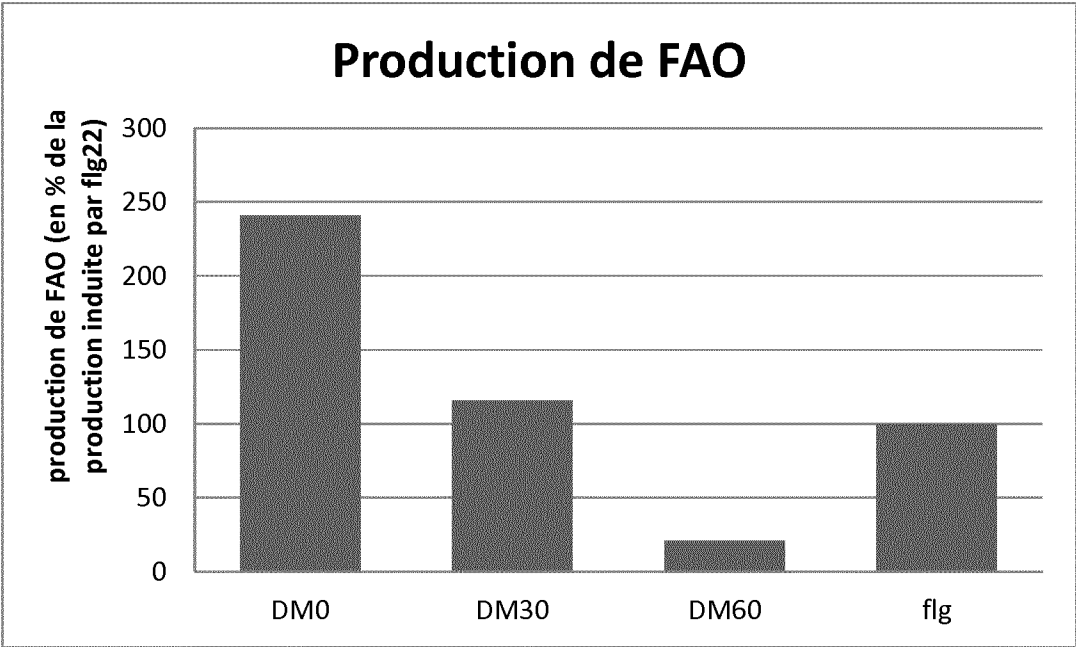
formule (I)

possédant un degré de méthylation de 0 et un degré de polymérisation de 1 à 10.

9) Utilisation d'un oligogalacturonane selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 et 8, en phyto-protection.

10) Utilisation selon la revendication 9, pour stimuler des réponses de défense des plantes contre des microorganismes pathogènes.

A



B

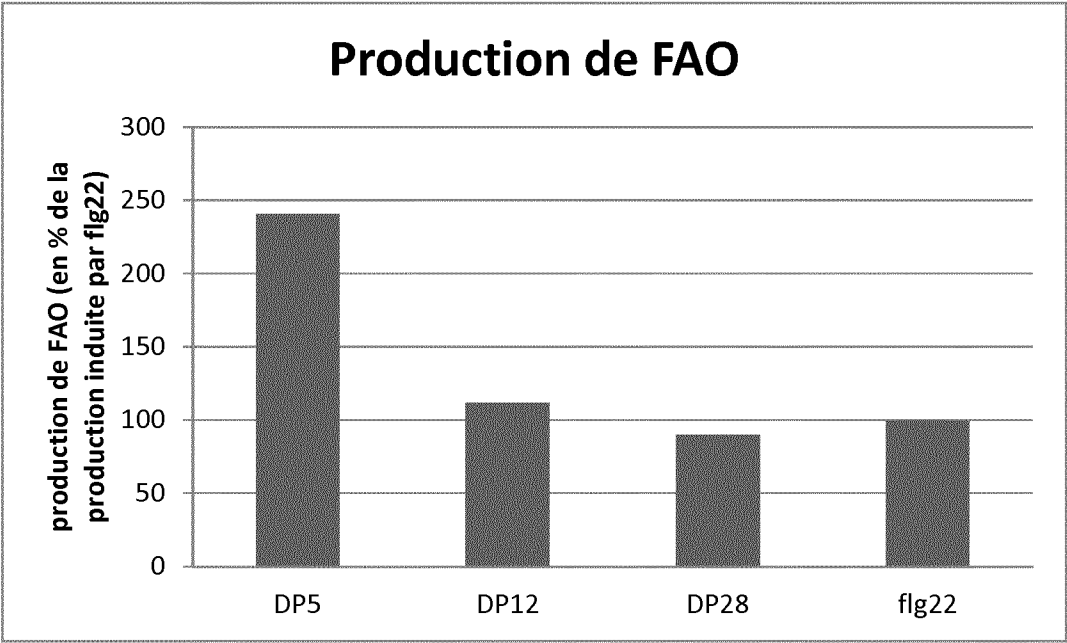


FIGURE 1

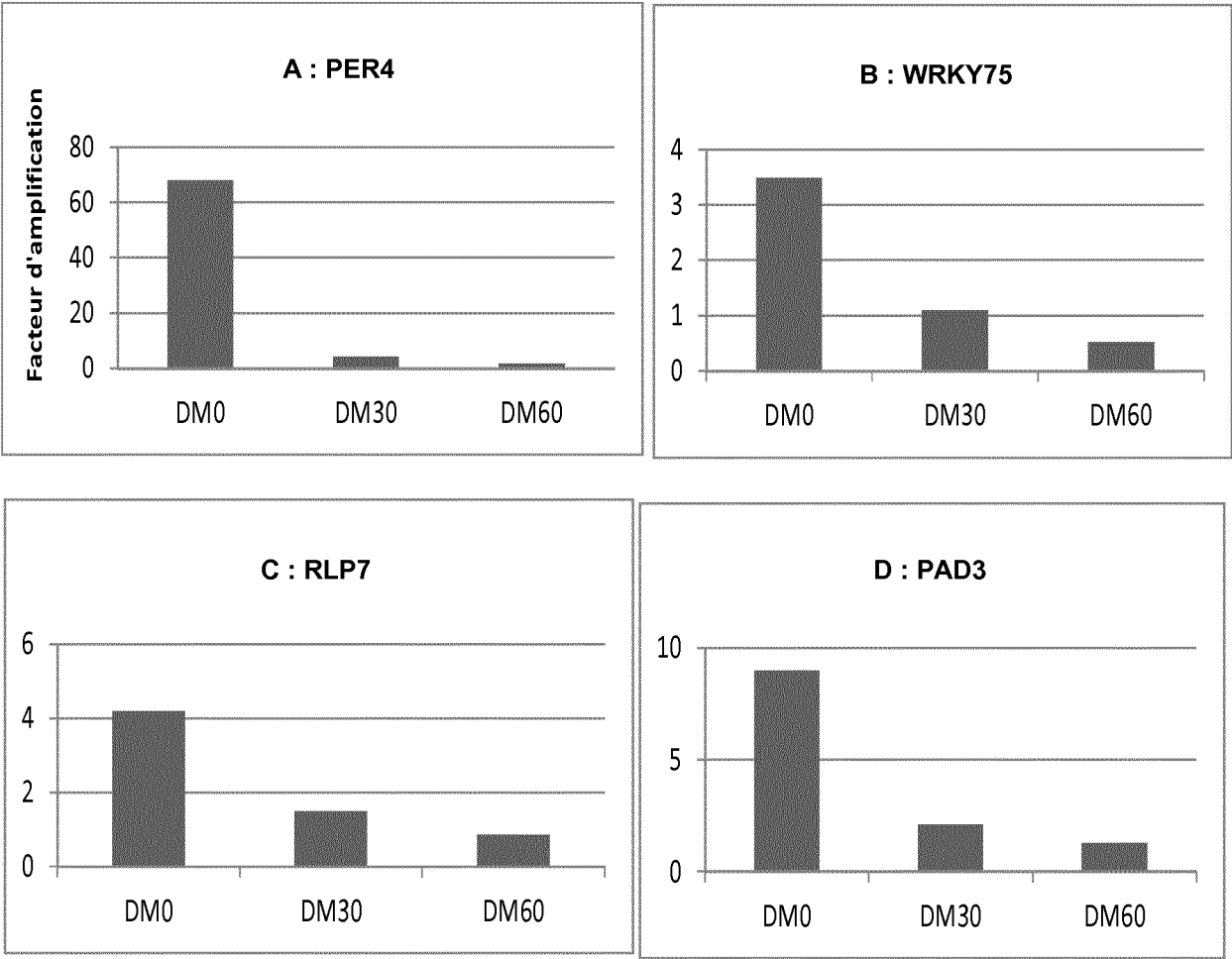


FIGURE 2

3/7

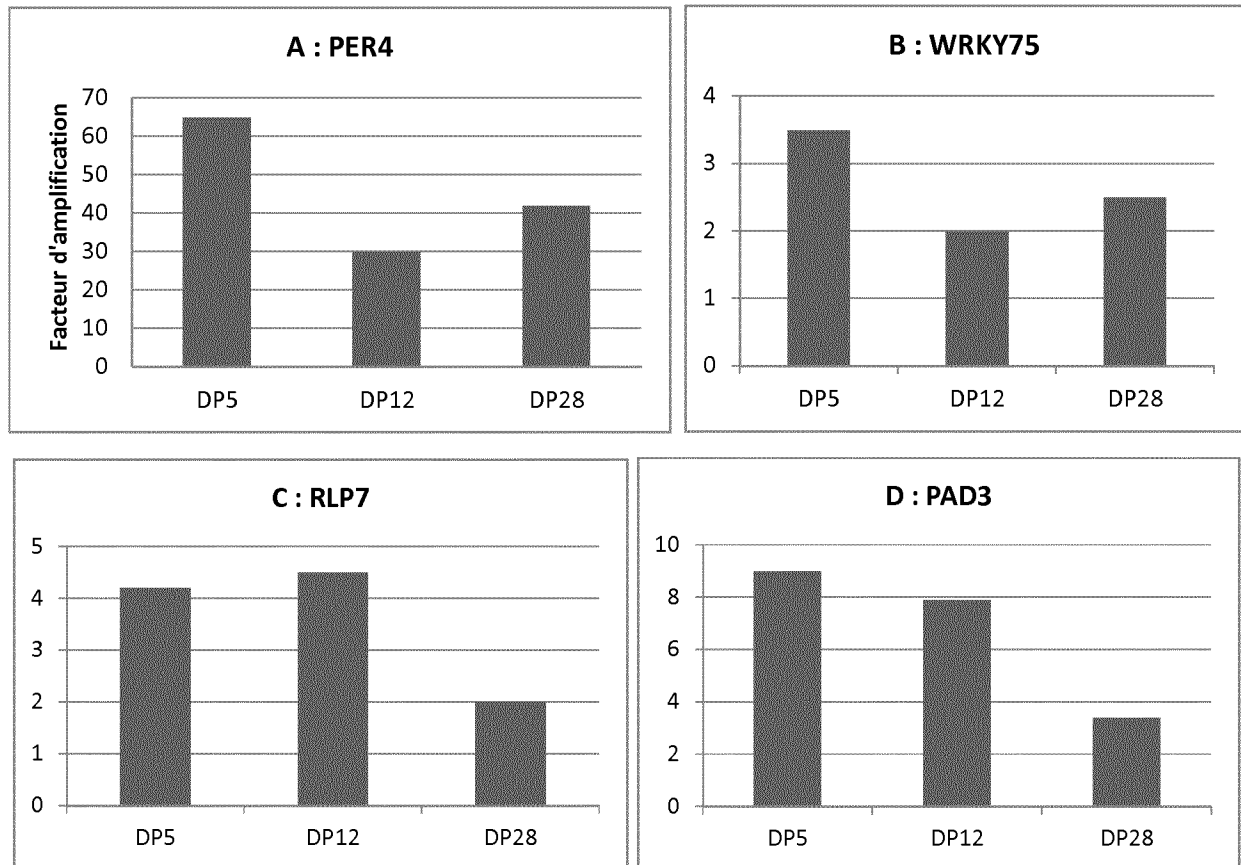


FIGURE 3

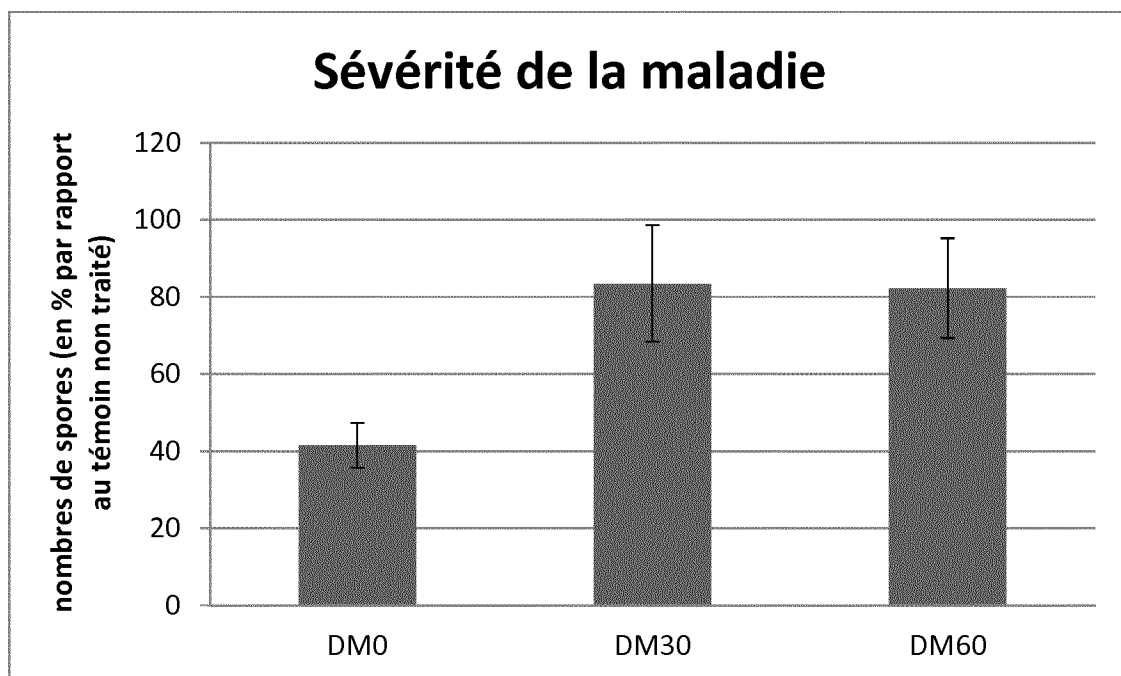
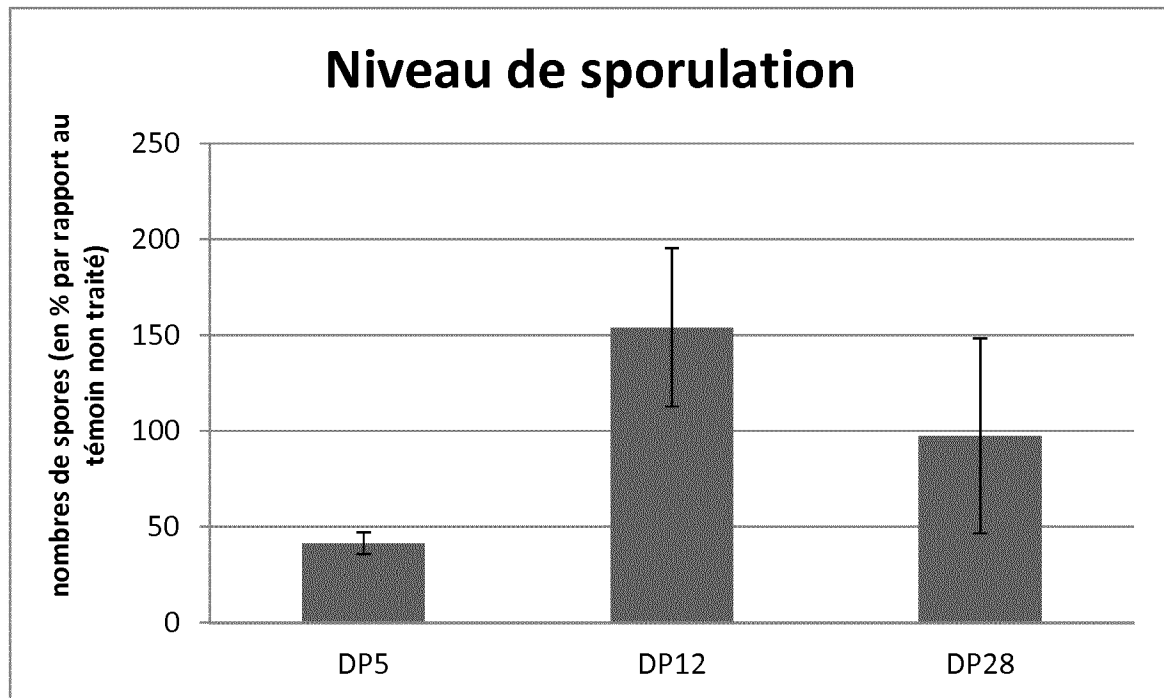


FIGURE 4

A



B

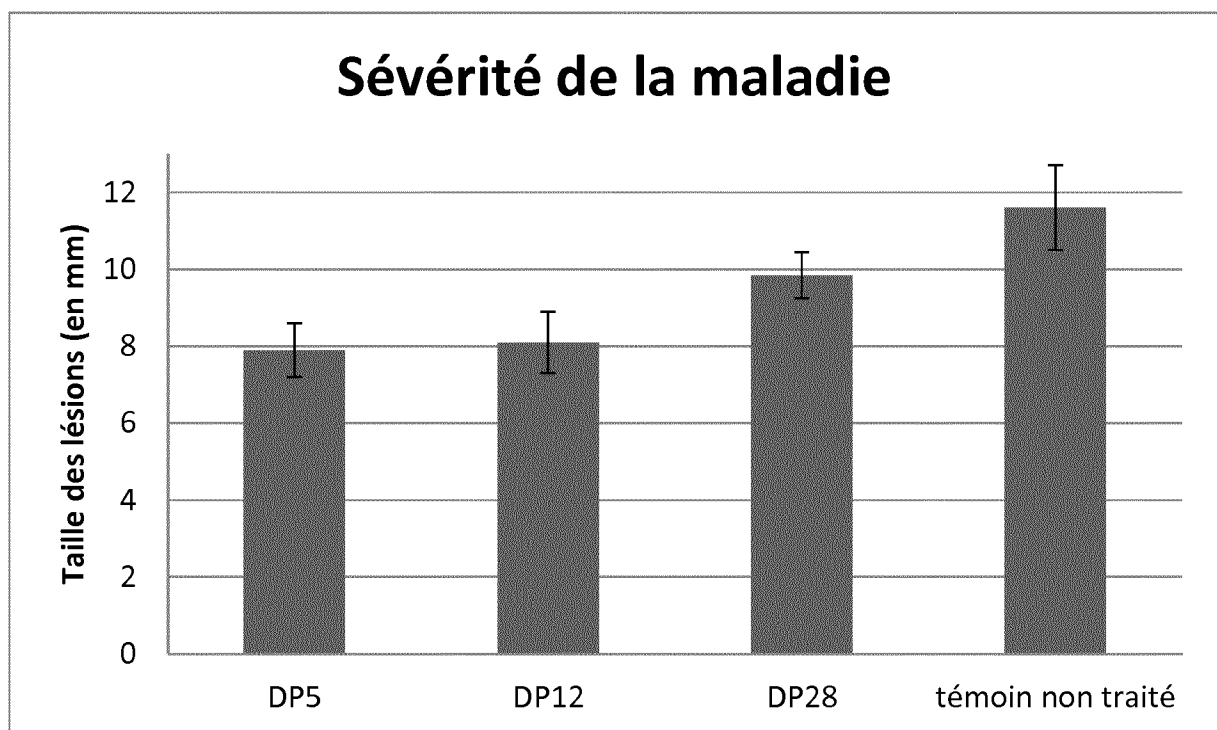
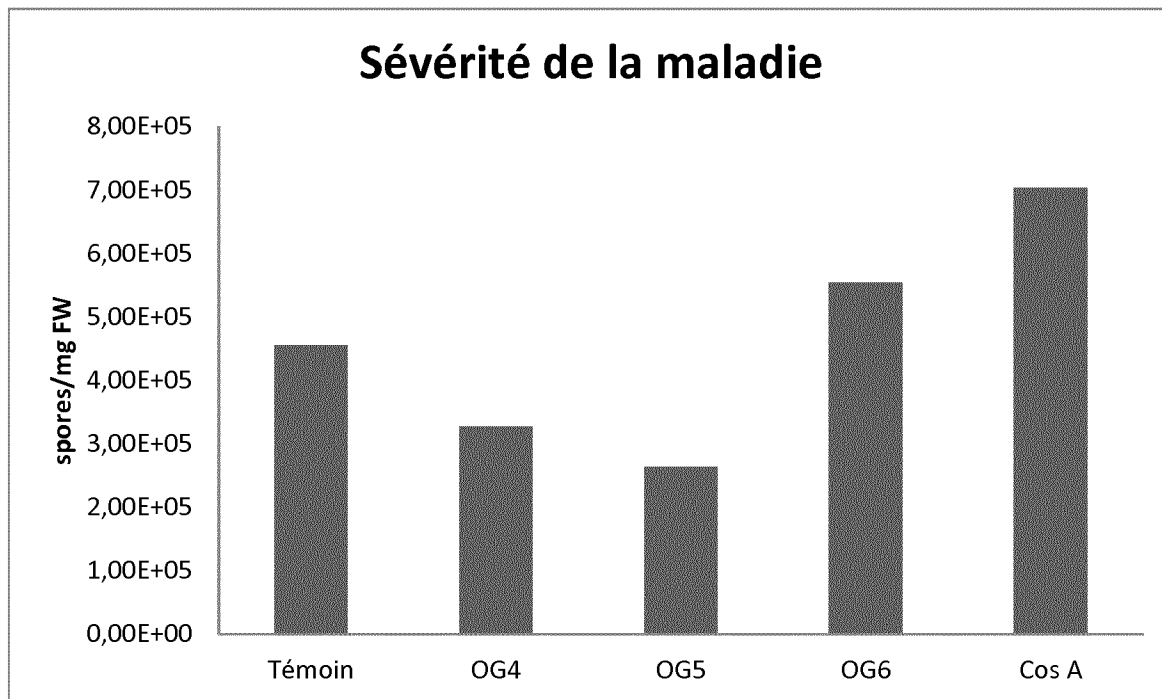


FIGURE 5

A



B

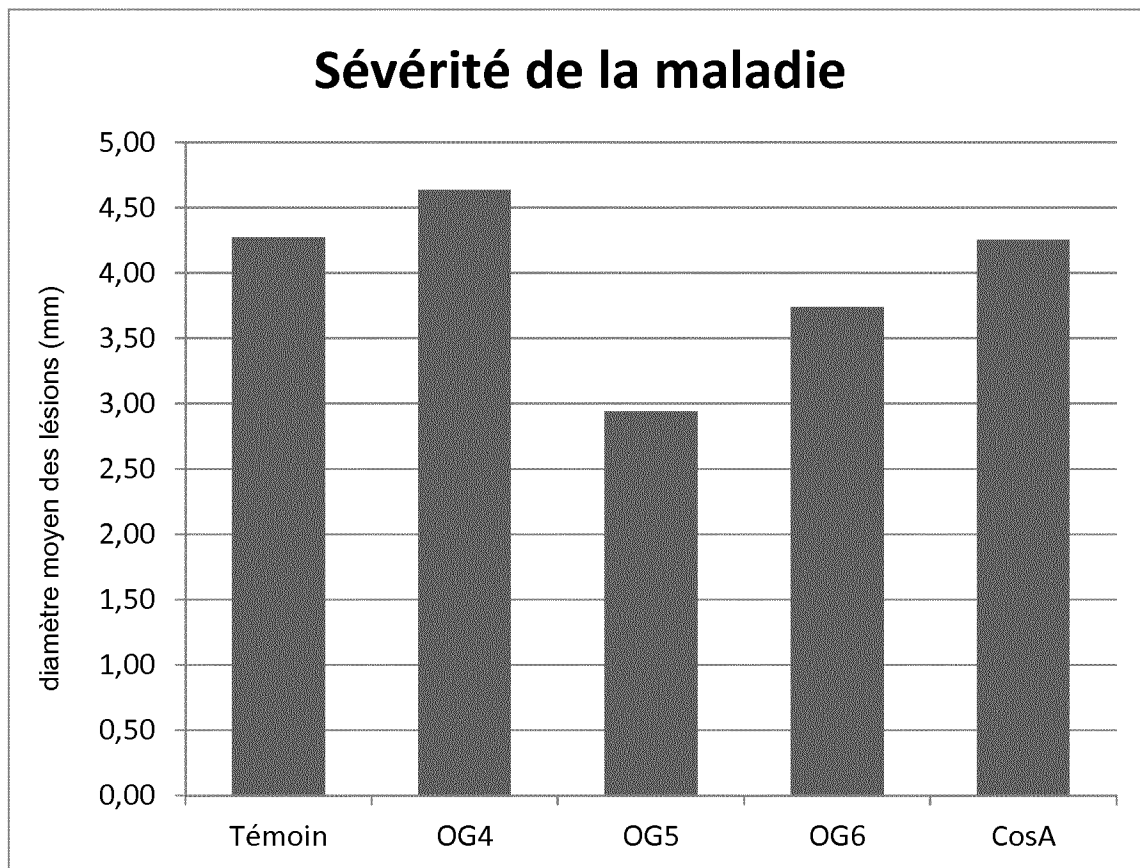
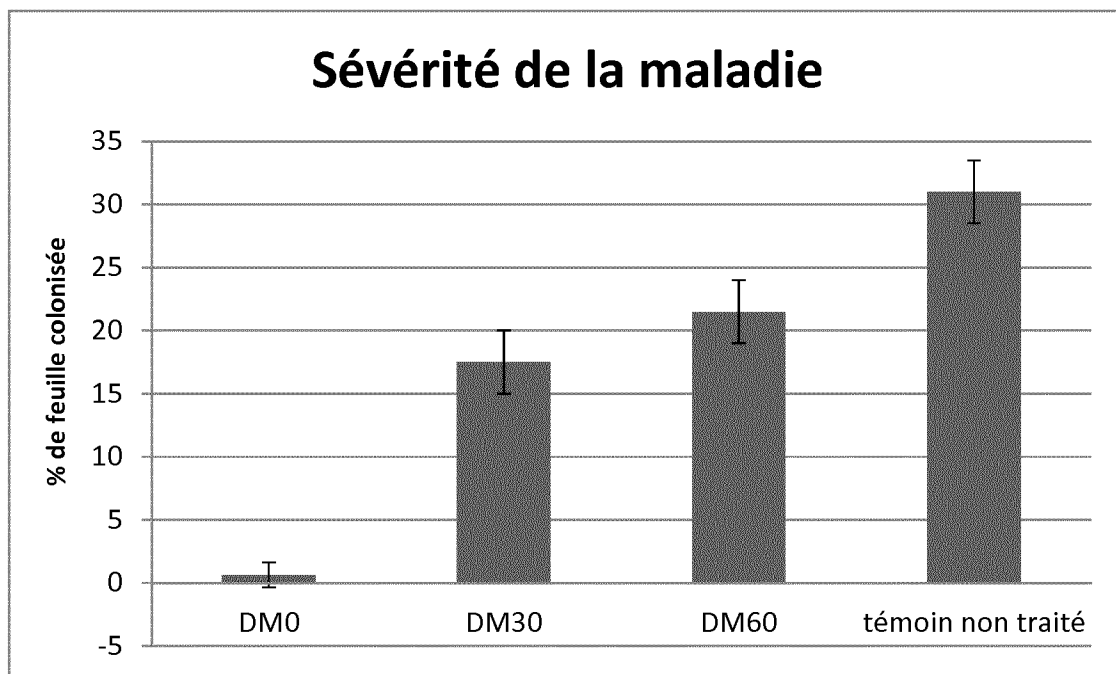


FIGURE 6

6/7

A



B

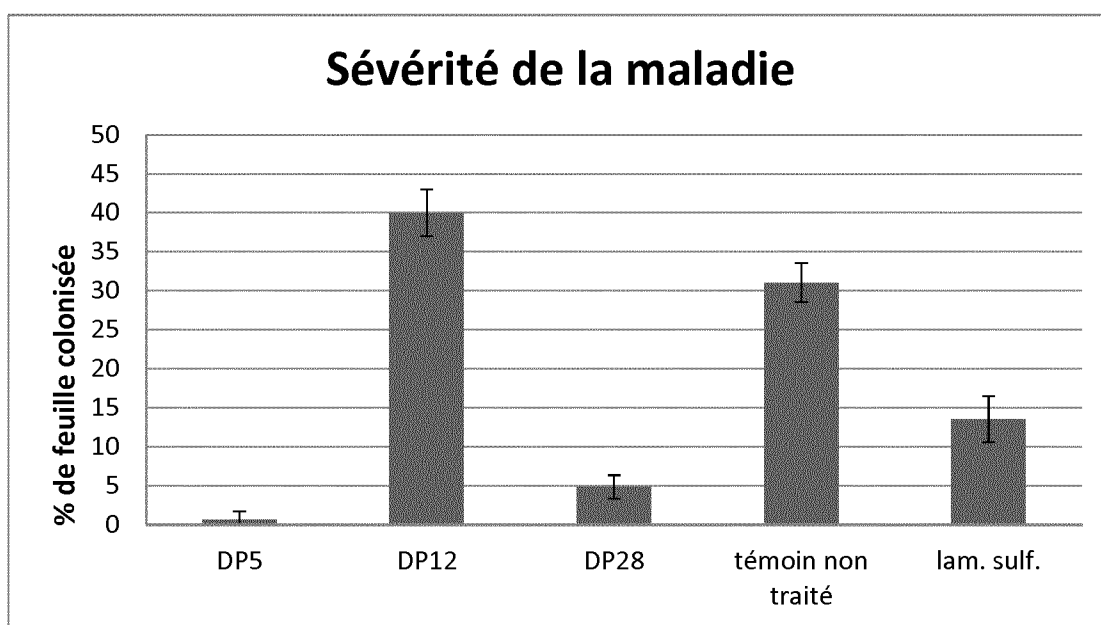


FIGURE 7

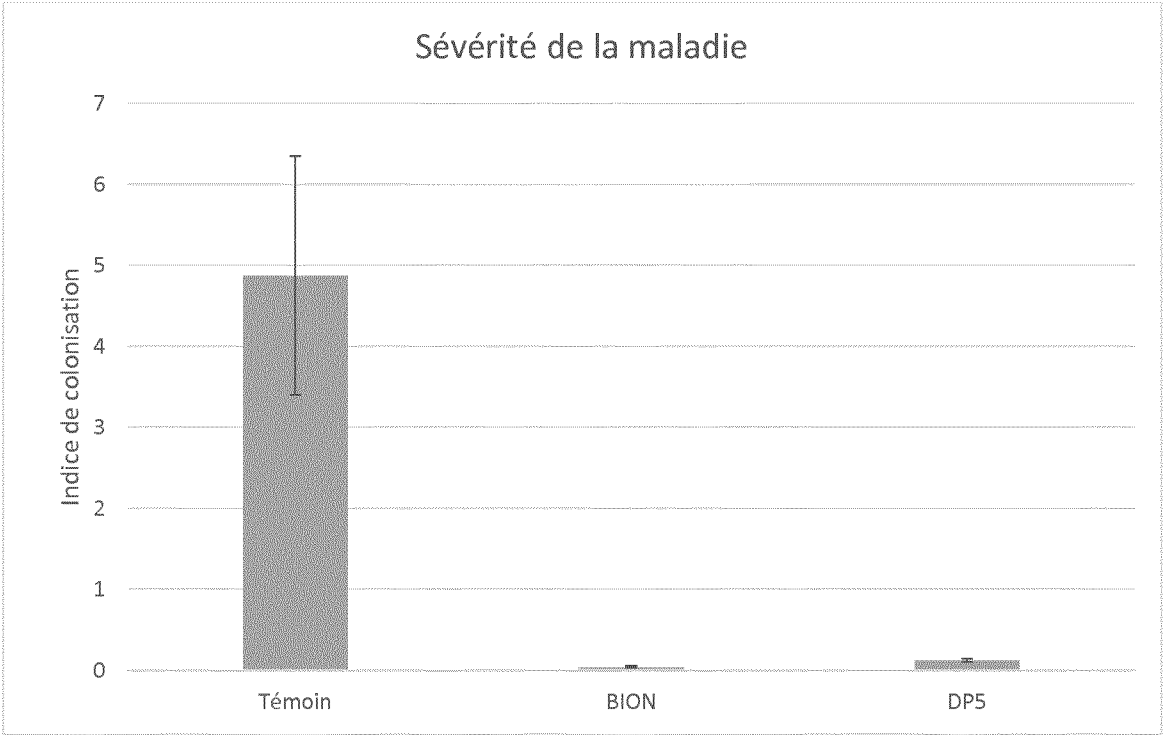


FIGURE 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/078652

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C07H 1/08*(2006.01)i; *C07H 7/033*(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)

C07H

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, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RU 2570708 C1 (FEDERAL NOE G BJUDZHETNOE UCHREZHDENIE NAUKI INST BIOLOG MORJA IM A V) 10 December 2015 (2015-12-10) claim 1	1,4-8
X	RU 2028304 C1 (PYATIGORSKIJ FARMATSEVTICHESKI [RU]) 09 February 1995 (1995-02-09) claim 1	1,2,4-8
X	JP H08245399 A (AOMORI PREFECTURE) 24 September 1996 (1996-09-24) table 1 claim 1	1-3,8
X	Landis W Doner ET AL. "High-performance thin-layer chromatographic resolution of oligogalac- turonic acids" <i>Note Carbohydrate Research</i> , 01 January 1988 (1988-01-01), pages 292-296, Retrieved from the Internet: https://doi.org/10.1016/0008-6215(91)84009-4 XP055611588 figures 1-3	1-3,8



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

07 January 2020

Date of mailing of the international search report

21 January 2020

Name and mailing address of the ISA/EP

European Patent Office
p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk
Netherlands

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

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

Authorized officer

Fanni, Stefano

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ELBOUTACHFAITI R ET AL. "Oligogalacturonans production by free radical depolymerization of polygalacturonan" <i>INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES</i>, ELSEVIER BV, NL, Vol. 43, No. 3, 01 October 2008 (2008-10-01), pages 257-261, [retrieved on 2008-06-13] DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2008.06.003 ISSN: 0141-8130, XP024098379 figure 4	1-3,8
X	MEI XIE ET AL. "Analysis of linear oligogalacturonic acids by negative-ion electrospray ionization mass spectrometry" <i>RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY.</i>, GB, Vol. 9, No. 15, 01 January 1995 (1995-01-01), pages 1572-1575 DOI: 10.1002/rcm.1290091521 ISSN: 0951-4198, XP055611634 figures 1-3	1-3,8
X	DONER L W ET AL. "Preparative chromatography of oligogalacturonic acids" <i>JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A</i>, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Vol. 449, 01 January 1988 (1988-01-01), pages 229-239, [retrieved on 1988-01-01] DOI: 10.1016/S0021-9673(00)94382-6 ISSN: 0021-9673, XP026551249 figures 1,6; table I	1-3,8
X	HOTCHKISS A T ET AL. "Isolation of oligogalacturonic acids up to DP 20 by preparative high-performance anion-exchange chromatography and pulsed amperometric detection" <i>CARBOHYDRATE RESEARCH</i>, PERGAMON, GB, Vol. 334, No. 2, 23 August 2001 (2001-08-23), pages 135-140 DOI: 10.1016/S0008-6215(01)00170-7 ISSN: 0008-6215, XP004298618 table 1	1,8
X	SUZUKI T ET AL. "Preparation and Isolation of Oligogalacturonic Acids and Their Biological Effects in Cockscomb (<i>Celosia argentea</i> L.) Seedlings" <i>JOURNAL OF PLANT GROWTH REGULATION</i>, SPRINGER-VERLAG, NE, Vol. 21, No. 3, 01 September 2002 (2002-09-01), pages 209-215 DOI: 10.1007/S003440010060 ISSN: 1435-8107, XP019884540 figures 2-4	1-3,8
X	LIEKER H P ET AL. "High-performance anion-exchange chromatography of saturated and unsaturated oligogalacturonic acids" <i>CARBOHYDRATE RESEARCH</i>, PERGAMON, GB, Vol. 238, 15 January 1993 (1993-01-15), pages 307-311, [retrieved on 1993-01-15] DOI: 10.1016/0008-6215(93)87021-J ISSN: 0008-6215, XP026634942 Results and discussion; page 308 - page 309	1-3,8
A	S. FERRARI ET AL. "Resistance to <i>Botrytis cinerea</i> Induced in <i>Arabidopsis</i> by Elicitors Is Independent of Salicylic Acid, Ethylene, or Jasmonate Signaling But Requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3" <i>PLANT PHYSIOLOGY</i>, Vol. 144, No. 1, 16 March 2007 (2007-03-16), pages 367-379 DOI: 10.1104/pp.107.095596 ISSN: 0032-0889, XP055197735 cited in the application page 368, left-hand column, line 6 - line 8	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/078652

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOZO KOMAE ET AL. "A 4,5-Unsaturated Low Molecular Oligogalacturonide as a Potent Phytoalexin-elicitor Isolated from Polygalacturonide of Ficus awkeotsang" <i>AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY</i>, JP, Vol. 54, No. 6, 09 June 1990 (1990-06-09), pages 1477-1484 DOI: 10.1080/00021369.1990.10870151 ISSN: 0002-1369, XP055611616 page 1477, left column, 1st paragraph figure 2 tables I,II	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2019/078652

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
RU	2570708	C1	10 December 2015	-----	
RU	2028304	C1	09 February 1995	NONE	
JP	H08245399	A	24 September 1996	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2019/078652

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07H1/08 C07H7/033 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) C07H		
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, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	RU 2 570 708 C1 (FEDERAL NOE G BJUDZHETNOE UCHREZHDENIE NAUKI INST BIOLOG MORJA IM A V) 10 décembre 2015 (2015-12-10) revendication 1	1,4-8
X	RU 2 028 304 C1 (PYATIGORSKIJ FARMATSEVTICHESKI [RU]) 9 février 1995 (1995-02-09) revendication 1	1,2,4-8
X	JP H08 245399 A (AOMORI PREFECTURE) 24 septembre 1996 (1996-09-24) tableau 1 revendication 1	1-3,8
----- -/--		
☒ 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 7 janvier 2020		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 21/01/2020
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 Fanni, Stefano

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	Landis W Doner ET AL: "High-performance thin-layer chromatographic resolution of oligogalac- turonic acids", Note Carbohydrate Research, 1 janvier 1988 (1988-01-01), pages 292-296, XP055611588, Extrait de l'Internet: URL:https://doi.org/10.1016/0008-6215(91)8 4009-4 figures 1-3	1-3,8
X	----- ELBOUTACHFAITI R ET AL: "Oligogalacturonans production by free radical depolymerization of polygalacturonan", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, ELSEVIER BV, NL, vol. 43, no. 3, 1 octobre 2008 (2008-10-01), pages 257-261, XP024098379, ISSN: 0141-8130, DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2008.06.003 [extrait le 2008-06-13] figure 4	1-3,8
X	----- MEI XIE ET AL: "Analysis of linear oligogalacturonic acids by negative-ion electrospray ionization mass spectrometry", RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY., vol. 9, no. 15, 1 janvier 1995 (1995-01-01), pages 1572-1575, XP055611634, GB ISSN: 0951-4198, DOI: 10.1002/rcm.1290091521 figures 1-3	1-3,8
X	----- DONER L W ET AL: "Preparative chromatography of oligogalacturonic acids", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 449, 1 janvier 1988 (1988-01-01), pages 229-239, XP026551249, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/S0021-9673(00)94382-6 [extrait le 1988-01-01] figures 1,6; tableau I ----- -/-	1-3,8

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	HOTCHKISS A T ET AL: "Isolation of oligogalacturonic acids up to DP 20 by preparative high-performance anion-exchange chromatography and pulsed amperometric detection", CARBOHYDRATE RESEARCH, PERGAMON, GB, vol. 334, no. 2, 23 août 2001 (2001-08-23), pages 135-140, XP004298618, ISSN: 0008-6215, DOI: 10.1016/S0008-6215(01)00170-7 tableau 1 -----	1,8
X	SUZUKI T ET AL: "Preparation and Isolation of Oligogalacturonic Acids and Their Biological Effects in Cockscomb (Celosia argentea L.) Seedlings", JOURNAL OF PLANT GROWTH REGULATION, SPRINGER-VERLAG, NE, vol. 21, no. 3, 1 septembre 2002 (2002-09-01), pages 209-215, XP019884540, ISSN: 1435-8107, DOI: 10.1007/S003440010060 figures 2-4 -----	1-3,8
X	LIEKER H P ET AL: "High-performance anion-exchange chromatography of saturated and unsaturated oligogalacturonic acids", CARBOHYDRATE RESEARCH, PERGAMON, GB, vol. 238, 15 janvier 1993 (1993-01-15), pages 307-311, XP026634942, ISSN: 0008-6215, DOI: 10.1016/0008-6215(93)87021-J [extrait le 1993-01-15] Results and discussion; page 308 - page 309 -----	1-3,8
A	S. FERRARI ET AL: "Resistance to Botrytis cinerea Induced in Arabidopsis by Elicitors Is Independent of Salicylic Acid, Ethylene, or Jasmonate Signaling But Requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3", PLANT PHYSIOLOGY, vol. 144, no. 1, 16 mars 2007 (2007-03-16), pages 367-379, XP055197735, ISSN: 0032-0889, DOI: 10.1104/pp.107.095596 cité dans la demande page 368, colonne de gauche, ligne 6 - ligne 8 ----- -/--	1-10

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	KOZO KOMAE ET AL: "A 4,5-Unsaturated Low Molecular Oligogalacturonide as a Potent Phytoalexin-elicitor Isolated from Polygalacturonide of Ficus awkeotsang", AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 54, no. 6, 9 juin 1990 (1990-06-09), pages 1477-1484, XP055611616, JP ISSN: 0002-1369, DOI: 10.1080/00021369.1990.10870151 page 1477, colonne de gauche, alinéa 1st figure 2 tableaux I,II -----	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2019/078652

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
RU 2570708	C1	10-12-2015	-----	
RU 2028304	C1	09-02-1995	AUCUN	

JP H08245399	A	24-09-1996	AUCUN	
