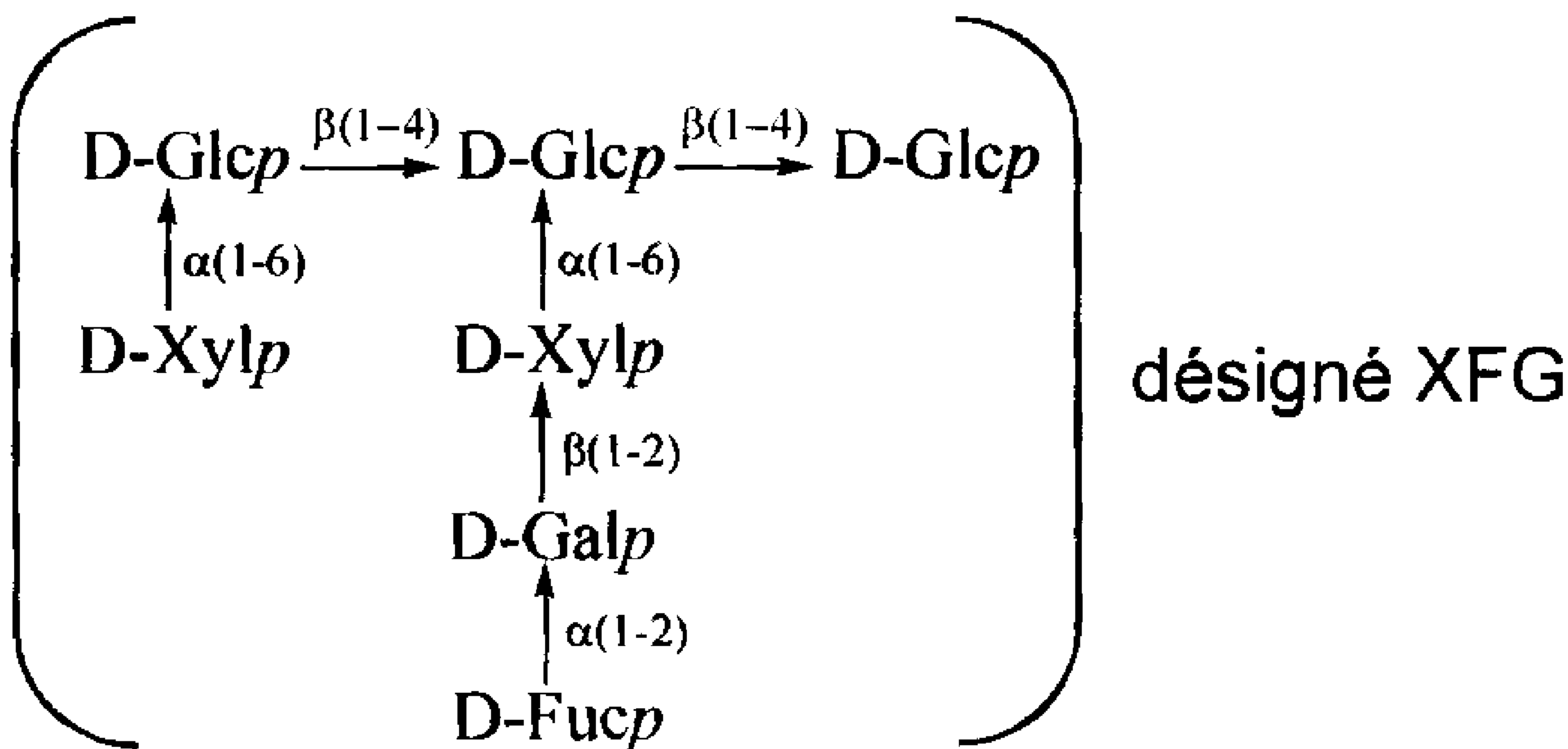




(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2003/03/27
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2003/10/02
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2012/06/12
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2004/09/22
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2003/000969
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2003/079785
(30) Priorité/Priority: 2002/03/27 (FR02/03849)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *A01N 43/16* (2006.01)
(72) Inventeurs/Inventors:
LIENART, YVETTE JANINE, FR;
HEYRAUD, ALAIN CHARLES ABEL, FR
(73) Propriétaire/Owner:
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE, FR
(74) Agent: FETHERSTONHAUGH & CO.

(54) Titre : UTILISATION DE COMPOSES COMPRENANT UNE STRUCTURE OSIDIQUE CONTENANT X, F, ET G, ET
DE COMPOSES DERIVES, EN TANT QUE PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET BIOFERTILISANTS
(54) Title: USE OF COMPOUNDS COMPRISING A POLYSACCHARIDE STRUCTURE CONTAINING X, F AND AND
DERIVATIVE COMPOUNDS AS BIOFERTILIZER AND PHYTOSANITARY PRODUCTS



(57) Abrégé/Abstract:

L'invention a pour objet l'utilisation d'un composé comprenant une structure osidique de formule XFG, ou une structure dérivée, dans le cadre de l'adaptation des plantes à un stress abiotique, le contrôle de la floraison, le contrôle de la fructification, et l'induction de réactions de défense contre les pathogènes.

(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
2 octobre 2003 (02.10.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/079785 A1(51) Classification internationale des brevets⁷ : A01N 43/16(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR03/00969

(22) Date de dépôt international : 27 mars 2003 (27.03.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/03849 27 mars 2002 (27.03.2002) FR(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris
CEDEX 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : LIENART,
Yvette, Janine [FR/FR]; St Nizier d'Uriage, F-38410
Uriage (FR). HEYRAUD, Alain, Charles, Abel [FR/FR];
6, côte du Verdaret, F-38113 Veuret-Voroize (FR).(74) Mandataire : DEMACHY, Charles; Grosset-Fournier &
Demachy SARL, 54, rue Saint-Lazare, F-75009 Paris (FR).(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF COMPOUNDS COMPRISING A POLYSACCHARIDE STRUCTURE AS BIOFERTILISER AND PHY-
TOSANITARY PRODUCTS(54) Titre : UTILISATION DE COMPOSES COMPRENANT UNE STRUCTURE OSIDIQUE EN TANT QUE PRODUITS PHY-
TOSANITAIRES ET BIOFERTILISANTS(57) Abstract: The invention relates to the use of a compound comprising a polysaccharaide structure having formula XFG, or
a derivative structure, in relation to adapting plants to abiotic stress, controlling flowering and fructification and inducing defence
reactions against pathogens.(57) Abrégé : L'invention a pour objet l'utilisation d'un composé comprenant une structure osidique de formule XFG, ou une struc-
ture dérivée, dans le cadre de l'adaptation des plantes à un stress abiotique, le contrôle de la floraison, le contrôle de la fructification,
et l'induction de réactions de défense contre les pathogènes.

WO 03/079785 A1

UTILISATION DE COMPOSES COMPRENANT UNE STRUCTURE OSIDIQUE CONTENANT X, F, ET G, ET DE COMPOSES DERIVES, EN TANT QUE PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET BIOFERTILISANTS

5

La présente invention a pour objet de nouvelles utilisations de composés comprenant une structure osidique contenant des enchaînements X, F et G, ainsi que de composés dérivés, dans le domaine phytosanitaire, et celui de la biofertilisation.

10

Les parois cellulaires des fruits et des végétaux sont formés de polysaccharides, dont principalement la pectine, la cellulose et le xyloglucane qui intervient dans la mise en place des parois (Levy S et al., Plant J. 1997, 11(3) : 373-86). Le xyloglucane se retrouve également en grande quantité dans l'endosperme des graines des Dicotylédones.

15

Le xyloglucane est un polymère de 1,4- β -glucane substitué différemment selon son origine. Chez les Dicotylédones, les substitutions des chaînes linéaires de 1,4 β -D-glucane impliquent le plus souvent des ramifications de type 1,6 α -D-xylosyl, ou 1,6 α -D-xylose 1,2 β -D-galactosyl, et du fucose peut être associé, en position terminale, au galactose, soit une ramification latérale de type 1,6 α -D-xylose 1,2 β -D-galactose 1,2 α -L-fucosyl. Toujours chez les Dicotylédones, le résidu fucose est absent de l'endosperme, et il peut être remplacé par le résidu α -L-arabinose, par exemple chez certaines Solanacées. Le xyloglucane des Monocotylédones diffère de celui des Dicotylédones par un taux plus faible de substitution par les résidus xylose, galactose et par l'absence de fucose. Le xyloglucane forme avec les microfibrilles de cellulose des structures pontées qui constituent l'ossature et assurent la flexibilité de la paroi cellulaire des végétaux (Pauly M, Albersheim P, Darvill A, York WS (1999) Plant J, 20 (6): 629-39).

20

25

30

Le xyloglucane est un substrat d'endoxyloglucanases (Vincken JP, Beldman G, Voragen AG Carbohydr Res (1997) 13, 298(4):299-310) ou de xyloglucane endotransglycosylase (Steele NM, Fry SC, Biochem J (1999) 15, 340, 1, 207-211), à savoir d'activités enzymatiques aptes à modifier la structure des parois cellulaires au cours de l'élongation cellulaire, en période de germination, de fructification par exemple et qui sont dépendantes d'hormones notamment d'auxines (Hetherington PR et Fry S.

(1993) Plant Physiology, 103, 987-992), et de gibbérellines (Maclachlan G et Brady C (1994) Plant Physiol 105, 965-974).

Le xyloglucane, en particulier un oligomère fucosylé, le nonasaccharide XXFG (décrit dans Fry et al. (1993) Physiologia Plantarum, 89, 1-3), est bien connu pour son effet antiauxinique (Mac Dougall CJ et Fry SC (1989) Plant Physiol 89, 883-887). A l'opposé, des oligomères sans fucose mais avec du galactose comme les oligomères XXLG et XLLG ont un effet auxinique (Mc Dougall GJ et Fry SC (1990) Plant Physiology 93, 1042-1048).

Par ailleurs, de nombreux signaux génèrent des espèces activées d'oxygène (on parle également de "burst oxydatif"). Des espèces activées d'oxygène sont bien connues pour être libérées au cours des interactions plante-pathogène. Des oligosaccharides de diverse origine (acide polygalacturonique, chitosane, O-glycanes ..) ont été répertoriés pour leur capacité à générer un burst oxydatif (Low PS et Heinsteins PF (1986) Arch. Biochem. Biophys. 249, 472-479; Rogers KR., Albert F, et Anderson AJ (1988) Plant Physiol 86, 547-553; Apostol I, Heinsteins PF et Low PS (1989) Plant Physiol 90, 109-116; Vera-Estrella R, Blumwald E et Higgins VJ (1992) Plant Physiol. 1208-1215; Bolwell GP, Butt VS, Davies DR et Zimmerlin A. (1995) Free Rad. Res. Comm. 23, 517-532 ; Orozco-Cardenas M et Ryan CA (1999) PNAS, 96, 11, 6553-6555; Nita-Lazar M, Iwahara S, Takegawa K, Liénart Y (2000) J Plant Physiol, 156, 306-311). Les enzymes NAD(P)H oxydo-reductases pour la libération d'anion superoxyde (Van Gestelen PV, Asard A, Caubergs RJ (1997) Plant Physiol 115, 543-550) et peroxydases pour la formation de peroxyde ou d'anion superoxyde ou de radicaux $\cdot\text{OH}$, sont impliquées (Baker CJ et Orlandi EW (1995) Ann. Rev. Phytopathol, 33, 299-321; Chen SX et Schopfer P (1999) Eur Biochem 260, 726- 735). D'autres signaux (acide salicylique, jasmonates, cGMP, NO...) génèrent aussi un burst (Chen Z, Malamy J, Henning J, Conrath U, Sanchez-Casas P, Silva H, Ricigliano J, Klessig DF (1995) Proc Natl Acad Sci USA, 92, 4134-4137; Voros K, Feussner I, Kuhn H, Lee J, Graner A, Lobler M, Parthier B, Wasternack C Eur J Biochem (1998) 15, 251, 36-44; Durner J, et Klessig J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) Proc Natl Acad Sci USA, 95, 10328-10333; Durner D et Klessig DF (1999) Current Opinion in Plant Biology, 2, 369-374).

Des conditions extrêmes d'environnement (sécheresse, froid, UV, salinité...) déclenchent le même effet.

Le rôle majeur de H_2O_2 dans la génération du burst comme dans la régulation du stress oxydant repose :

- sur sa formation par dismutation à partir de l'anion superoxyde (Bolwell GP, Davies DR, Gerrish C, Auh CK et Murphy TM (1998) Plant Physiol 116, 1379-1385),

- sur son utilisation dans des séquences du métabolisme des acides gras C_{18} (pour la peroxydation de lipides (Koch E, Meier BM, Eiben H-G, Slusarenko A (1992) Plant Physiol 99, 571-576) ou pour la synthèse d'octadécanoïdes et de leurs dérivés dont certains comme les méthyl-jasmonates sont des métabolites à fonction hormonale,

- sur sa fonction de substrat pour des enzyme peroxydase et catalase, propriété limitant l'accumulation de peroxyde toxique pour la cellule (Baker CJ, Harmon GL, Glazener JA et Orlandi EW (1995) Plant Physiol, 108, 353-359).

Les espèces activées d'oxygène, l'anion superoxyde en particulier, contrôlent différentes voies métaboliques. Elles interviennent dans :

- la biosynthèse des polyamines : des monoamines sont oxydées en aldéhydes avec production de NH_3 et de peroxyde. L'oxydation de la L-arginine par la nitrite-synthase aboutit à la formation d'un précurseur de polyamine (L-citrulline),

- la synthèse de l'éthylène,

- la synthèse des gibbérellines. Plus de 20 oxydases sont impliquées dans la régulation de la biosynthèse des gibbérellines.

Les espèces activées d'oxygène interviennent dans des étapes de transduction de signaux, parce qu'elles sont associées à l'activité de liaison de récepteurs ou à l'activité d'enzymes de transduction (Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K et Scheel D (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94, 9, 4800-4805; Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) Proc Natl Acad Sci USA, 95, 10328-10333).

Elles interviennent dans la régulation du potentiel redox cellulaire par l'intermédiaire des groupements thiols (conversion GSSG-GSH, cystine-cystéine, etc.). A ce titre, elles contrôlent des processus de sénescence qui se manifestent à certaines phases de la floraison et de fructification dans différents organes.

Le burst oxydatif interfère avec le métabolisme hormonal, le potentiel le plus performant pour réguler les stades de floraison et de fructification (en particulier leur déclenchement et leur durée sont programmés par une balance hormonale (rapport auxine/cytokinine par exemple), et les espèces activées d'oxygène, dont le peroxyde, contrôlent la synthèse des polyamines).

La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs du fait que les composés comprenant une structure osidique de formule XFG, ainsi que des composés dérivés de ces derniers, ont un effet de stimulation de l'enzyme glutathion réductase, de l'enzyme phospholipase D chez les plantes, ainsi que des glycosylhydrolases.

En stimulant l'enzyme glutathion réductase, les composés de l'invention déclenchent des réactions d'adaptation à tout stress oxydant, comme le froid en particulier, en limitant les effets toxiques des espèces activées d'oxygène (Allen RD, Webb RP, Schake SA (1997) Free Radic Biol Med, 23 (3):473-479; O'Kane D, Gill V, Boyd P, Burdon R (1996) Planta, 198 (3):371-377), et ils régulent le potentiel redox de la cellule, ce qui modifie l'activité d'enzymes ou de protéines thiol-dépendantes, phospholipase D, thiol-protéases et inhibiteurs de thiol-protéases en particulier (Taher MM, Mahgoub MA, Abd-Elfattah (1998) AS Biochem Mol Biol Int 46 3, 619-28), ainsi que par un effet d'induction d'un inhibiteur de protéase thiol-dépendante, et ce sans pour autant activer en cascade d'autres systèmes enzymatiques dans des proportions néfastes pour la plante.

En stimulant l'activité phospholipase D, les composés de l'invention amplifient l'effet hormonal de l'acide abscissique dans la mesure où l'activation de l'enzyme conduit à la production d'acide phosphatidique (qui mime les effets de l'acide abscissique). A ce titre, ils peuvent révéler un antagonisme contre les gibberellines, l'éthylène ou les jasmonates (Grill E., Himmelbach A. (1998) Current Opinion in Plant Biology, 1, 1, 5, 412-418; Ritchie S, Gilroy S (1998) Plant Biology, 95, 5, 3, 2697-2702; Moons A, Prinsen E, Bauw G, Van Montagu M (1997) Plant Cell 9 12, 2243-59).

Actuellement, en dehors des engrais chimiques, le contrôle du développement des végétaux repose principalement sur :

- l'utilisation de compositions agricoles enrichies en oligo-éléments, en composants nitrate, phosphate, et potassium, en polyamines ou en certaines hormones,
- l'utilisation de micro-organismes, naturels ou génétiquement modifiés, qui améliorent la qualité du sol, favorisent la croissance des végétaux ou accroissent le rendement des cultures ; il s'agit notamment des rhizobiacées comme *R. meliloti* et *B. japonicum*, des bactéries fixatrices d'azote libre, comme *Bacillus* et *Pseudomonas*, et des champignons comme *Penicillium*,
- le développement de plantes transgéniques. Cette technologie se heurte à des problèmes législatifs et à une forte opposition de la part des consommateurs; de plus,

elle n'a pas encore abouti à des applications satisfaisantes dans le secteur des biofertilisants.

Un des buts de la présente invention est de fournir de nouvelles compositions utilisables dans le domaine phytosanitaire et de la biofertilisation, et plus particulièrement pour lutter contre le stress abiotique chez les plantes, et contrôler la floraison et la fructification.

La présente invention a pour objet l'utilisation de composés comprenant :

- un ou deux enchaînements X, à savoir un enchaînement α -D-Xylopyranosyl (1,6)- β -D-Glucopyranosyl ou α -D-Xylopyranosyl (1,6)- D-Glucopyranose, ou β -D-Xylopyranosyl (1,4)- β -D-Glucopyranosyl ou β -D-Xylopyranosyl (1,4)- D-Glucopyranose, ou une forme réduite de X, encore désignée Xol,

- un ou deux enchaînements F, à savoir un enchaînement α -L-Fucopyranosyl (1,2)- β -D-Galactopyranosyl (1,2)- α -D-Xylopyranosyl (1,6)- β -D-Glucopyranosyl ou α -L-Fucopyranosyl (1,2)- β -D-Galactopyranosyl (1,2)- α -D-Xylopyranosyl (1,6)- D-Glucopyranose, ou un enchaînement α -L-Fucopyranosyl (1,2)- β -D-Galactopyranosyl (1,2)- β -D-Xylopyranosyl (1,4)- β -D-Glucopyranosyl ou α -L-Fucopyranosyl (1,2)- β -D-Galactopyranosyl (1,2)- β -D-Xylopyranosyl (1,4)- D-Glucopyranose , ou une forme réduite de F, encore désignée Fol,

- et au moins un enchaînement G, à savoir une unité β -D-glucopyranosyl ou D-Glucopyranose, substituée ou non en position 4, ou une forme réduite de G, encore désignée Gol,

lesdits enchaînements X, F, et G étant liés les uns aux autres dans un ordre aléatoire, et comportent, le cas échéant, les modifications suivantes : (i) modification de groupements hydroxyle, à savoir des dérivés acétylés ou méthoxylés ou acylés, dont le résidu glucose en position terminale est réduit ou non, (ii) modification de l'unité terminale réductrice, telle que par amination réductrice, (iii) oxydation, en position 6 des résidus Gal et Glc accessibles,

lesdits composés ayant la propriété de :

- stimuler la glutathion réductase,
- et/ou de stimuler la phospholipase D chez les plantes,
- et/ou de stimuler des glycosylhydrolases,

dans le cadre d'applications liées aux propriétés susmentionnées desdits composés, à savoir :

11534-69

6

- l'adaptation des plantes à un stress abiotique, tel que l'adaptation au froid, ou à un stress hydrique tel que la sécheresse, l'humidité ou la salinité,

- le contrôle de la floraison,

- le contrôle de la fructification,

5 - l'induction de réactions de défense contre les pathogènes tels que les bactéries, virus, champignons,

à l'exclusion de l'utilisation susmentionnée du composé de formule XXFG.

L'invention a pour objet l'utilisation de composés comprenant : un ou deux enchaînements X, à savoir un enchaînement α -D-Xylopyranosyl (1,6)- β -D-Glucopyranosyl ou
 10 α -D-Xylopyranosyl (1,6)-D-Glucopyranose, ou β -D-Xylopyranosyl (1,4)- β -D-Glucopyranosyl ou β -D-Xylopyranosyl (1,4)-D-Glucopyranose, ou une forme réduite de X, encore désignée Xol; un ou deux enchaînements F, à savoir un enchaînement α -L-Fucopyranosyl (1,2)- β -D-Galactopyranosyl (1,2)- α -D-Xylopyranosyl (1,6)- β -D-Glucopyranosyl ou α -L-Fucopyranosyl (1,2)- β -D-Galactopyranosyl (1,2)- α -D-Xylopyranosyl (1,6)-D-Glucopyranose, ou un
 15 enchaînement α -L-Fucopyranosyl (1,2)- β -D-Galactopyranosyl (1,2)- β -D-Xylopyranosyl (1,4)- β -D-Glucopyranosyl ou α -L-Fucopyranosyl (1,2)- β -D-Galactopyranosyl (1,2)- β -D-Xylopyranosyl (1,4)-D-Glucopyranose, ou une forme réduite de F, encore désignée Fol, et au moins un enchaînement G, à savoir une unité β -D-glucopyranosyl ou D-Glucopyranose, substituée ou non en position 4, ou une forme réduite de G, encore désignée Gol; les
 20 enchaînements X, F, et G étant liés les uns aux autres dans un ordre aléatoire, et comportent, le cas échéant, les modifications suivantes : (i) par modification de groupements hydroxyle, à savoir des dérivés acétylés ou méthoxylés ou acylés, dont le résidu glucose en position terminale est réduit ou non, (ii) par modification de l'unité terminale réductrice, telle que par amination réductrice, (iii) par oxydation, en position 6 des résidus Gal et Glc accessibles, les
 25 composés ayant la propriété de : stimuler la glutathion réductase, dans le cadre d'applications liées aux propriétés susmentionnées des composés, à savoir : l'adaptation des plantes à un stress abiotique, ou à un stress hydrique à l'exclusion de l'utilisation susmentionnée du composé de formule XXFG.

11534-69

6a

L'invention a aussi pour objet un procédé de stimulation de la glutathion réductase chez les plantes, comprenant une étape de traitement des plantes avec au moins un composé tel que défini plus haut et plus bas, notamment par irrigation du sol sur lequel ces plantes sont cultivées, avec une composition comprenant le composé, ou par enrobage
5 des semences avec une telle composition, ou par pulvérisation foliaire en champ d'une telle composition sur les plantes à traiter.

L'invention a également pour objet une application telle que définie plus haut et plus bas, à la mise en œuvre d'un procédé d'adaptation des plantes à un stress abiotique ou à un stress hydrique.

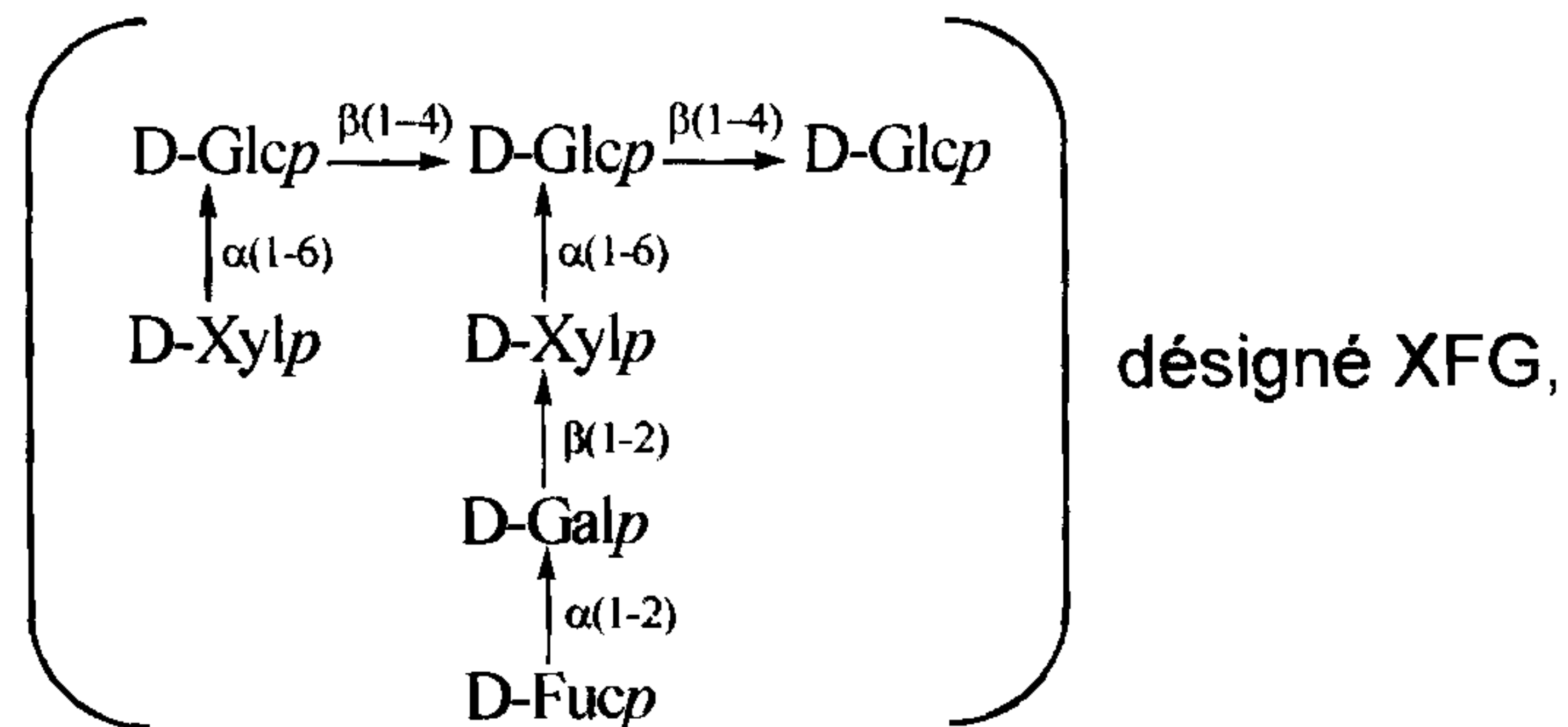
10 L'invention a également pour objet un procédé de stimulation de la production de la phospholipase D chez les plantes, comprenant une étape de traitement des plantes avec au moins un composé tel que défini plus haut et plus bas, notamment par irrigation du sol sur lequel ces plantes sont cultivées, avec une composition comprenant le composé, ou par enrobage des semences avec une telle composition, ou par pulvérisation foliaire en
15 champ d'une telle composition sur les plantes à traiter.

L'invention a également pour objet une application du procédé tel que défini plus haut et plus bas, à la mise en œuvre d'un procédé de contrôle de la floraison, et plus particulièrement d'un procédé de contrôle de l'induction florale, de la durée de la floraison, et de l'abscission des fleurs, et/ou à la mise en œuvre d'un procédé de contrôle de la
20 fructification des plantes, et plus particulièrement d'un procédé de contrôle du déclenchement et de la durée de la maturation des fruits, de l'abscission des feuilles et des fruits.

11534-69

6b

Selon un aspect, la présente invention vise l'utilisation du composé de formule :



- 5 D-Xylp représentant le D-Xylopyranosyl, D-Glcp représentant le D-Glucopyranosyl, D-Galp représentant le D-Galactopyranosyl et D-Fucp représentant le D-Fucopyranosyl, le résidu glucose en position terminal étant le cas échéant sous forme réduite, ce composé ayant la propriété de stimuler la glutathion reductase, pour l'adaptation des plantes à un stress abiotique ou à un stress hydrique.

- 10 Selon un autre aspect, la présente invention vise un procédé de stimulation de la glutathion réductase chez les plantes, comprenant une étape de traitement des plantes avec le composé tel que défini plus haut et plus bas.

- 15 L'invention a également pour objet un procédé de stimulation de la production des glycosylhydrolases chez les plantes, comprenant une étape de traitement des plantes avec au moins un composé tel que défini plus haut et plus bas, notamment par irrigation du sol sur lequel ces plantes sont cultivées, avec une composition comprenant le composé, ou par enrobage des semences avec une telle composition, ou par pulvérisation foliaire en champ d'une telle composition sur les plantes à traiter.

- 20 Par contrôle de la floraison, on entend plus particulièrement le contrôle des phases clefs du processus de floraison comme l'antheresis (Wang M, Hoekstra S, van Bergen S,

11534-69

6c

Lamers GE, Oppedijk BJ, Heijden MW, de Priester W, Schilperoort RA (1999) *Plant Mol Biol* 39,3 : 489-501), ou le développement des boutons floraux (Lim CO, Lee SI, Chung WS, Park SH, Hwang I, Cho MJ (1996), *Plant Mol Biol*, 30, 2, 373-379), comme les phases d'induction ou d'abscission florale (Colasanti J, Sundaresan V (2000) *Trends Biochem Sci*, 25,5, 236-240.

Par contrôle de la fructification, on entend plus particulièrement le contrôle du déclenchement et/ou de la durée de la phase de maturation (Fan L, Zheng S, Wang X (1997) *Plant Cell*, 9, 12, 2183-9; Ryan SN, Laing WA, Mc Canus MT (1998), *Phytochemistry*, 49, 4, 957-963), le contrôle du métabolisme des parois cellulaires en rapport avec l'accumulation des sucres et des phénols (Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thevenot P, Lemoine R, Romieu C, Delrot S (1999) *Plant Physiol* 120 (4): 1083-94), et le contrôle de l'abscission des feuilles et des fruits (Gomez-Cadenas A, Mehrouachi J, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talon M (2000), *Planta*, 210, 4, 636-643).

L'induction de réactions de défense contre les pathogènes est en rapport avec l'éllicitation de PR-protéines, en particulier des enzymes 1, 3- β D glucanase et endochitinase aussi connues pour intervenir aussi dans le développement des plantes (Munch-Garthoff S, Neuhaus JM, Boller T, Kemmerling B, Kogel KH (1997) *Planta* 201, 2, 235-44; Buchter R, Stromberg A, Schmelzer E, Kombrink E (1997) *Plant Mol Biol* 35, 6, 749-61; Robinson SP, Jacobs AK, Dry IB (1997) *Plant Physiol* 114, 3, 771- 8).

Le contrôle de remaniements métaboliques et cataboliques dont certains tissus sont l'objet en période de différenciation ou de sénescence, est en rapport avec l'éllicitation des enzymes 1, 4- β -D-glucanase et β -D-xylosidase (Trainotti L, Spolaore S,

Ferrarese L, Casadoro G (1997) Plant Mol Biol 34 (5):791-802; Kalaitzis P, Hong SB, Solomos T, Tucker ML (1999) Plant Cell Physiol 40(8), 905-8).

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de composés définis ci-dessus, correspondant à des dérivés acétylés choisis parmi :

5 - les formes mono-acétylées en position 2 ou 3 ou 4 pour le xylose, ou en position 3 ou 4 ou 6 pour le galactose, ou en position 2 ou 3 ou 4 ou 6 pour le glucose, ou en position 2 ou 3 ou 4 pour le fucose,

10 - les formes di-acétylées en position 2 et 3, 2 et 4, 3 et 4, 2 et 6, 3 et 6, ou 4 et 6 pour le glucose, ou en position 2 et 3, 2 et 4, ou 3 et 4 pour le xylose, ou en position 3 et 4, 3 et 6, ou 4 et 6 pour le galactose, ou en position 2 et 3, 2 et 4, ou 3 et 4 pour le fucose, ou toute combinaison prenant en compte deux sucres monoacétylés constitutifs de la molécule,

15 - les formes tri-acétylées en position 2, 3 et 4 pour le xylose, ou en position 2, 3 et 4, ou 2, 3, et 6 pour le glucose, ou en position 3, 4, et 6 pour le galactose, ou en position 2, 3, et 4 pour le fucose, ou toute combinaison prenant en compte trois sucres mono-acétylés ou un sucre mono-acétylé et un sucre di-acétylé constitutifs de la molécule,

 - les formes tétra-acétylées à totalement acétylées, ou toutes combinaisons des différents sucres acétylés ou non constitutifs de la molécule.

20 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, de composés dans lesquels les oses sont des résidus glycosyl (L) ou (D), le cas échéant sous forme réduite, et/ou sous forme α ou β , le cas échéant sous forme pyranose ou furanose, et sont liés entre eux par des liaisons du type 1 $\rightarrow$ 2, 1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4, ou 1 $\rightarrow$ 6, et plus particulièrement du type α 1 $\rightarrow$ 2 dans le cas de la liaison d'un fucose à un galactose, β 1 $\rightarrow$ 2 dans le cas de la liaison d'un galactose à un xylose, β 1 $\rightarrow$ 4, dans le cas de la liaison d'un glucose à un glucose, ou α 1 $\rightarrow$ 6, dans le cas de la liaison d'un xylose à un glucose.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet encore, l'utilisation susmentionnée de composés comprenant une structure osidique choisie parmi celles de formules suivantes :



$$(F)_b (G)_c (X)_a$$

$$(G)_c (X)_a (F)_b$$

$$(G)_c (X)_a (F)_b$$

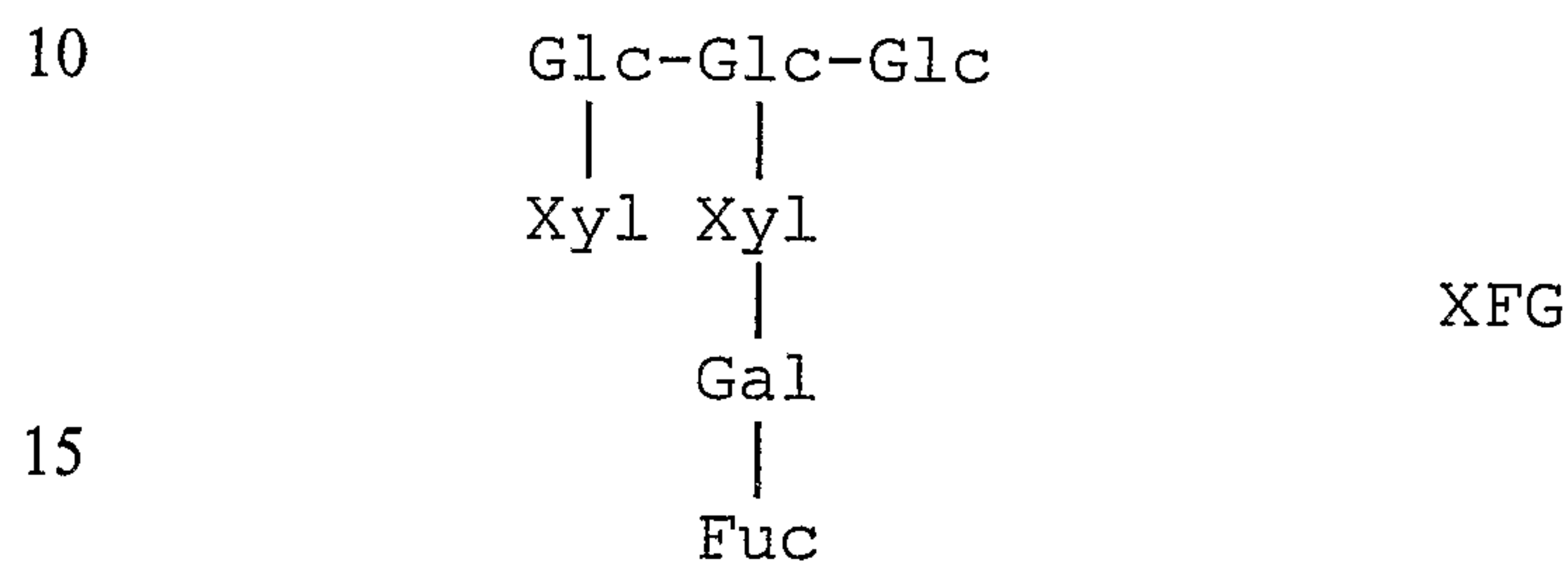
5 dans lesquelles :

- G, X et F sont tels que définis ci-dessus,

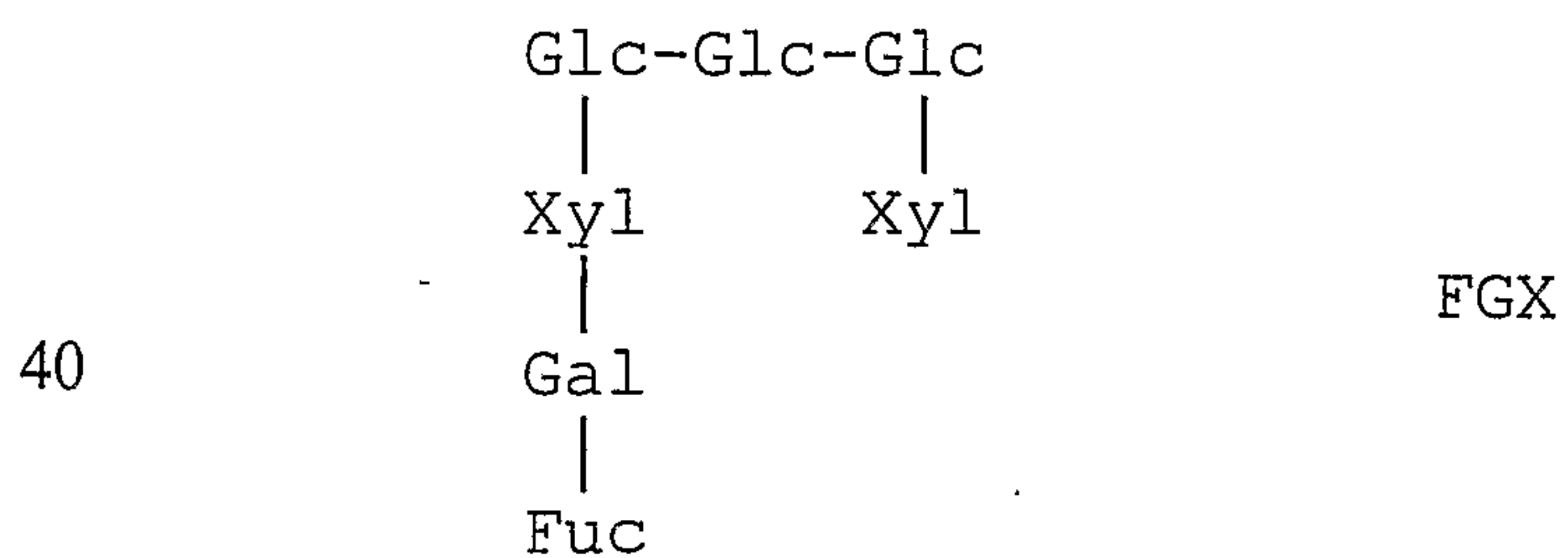
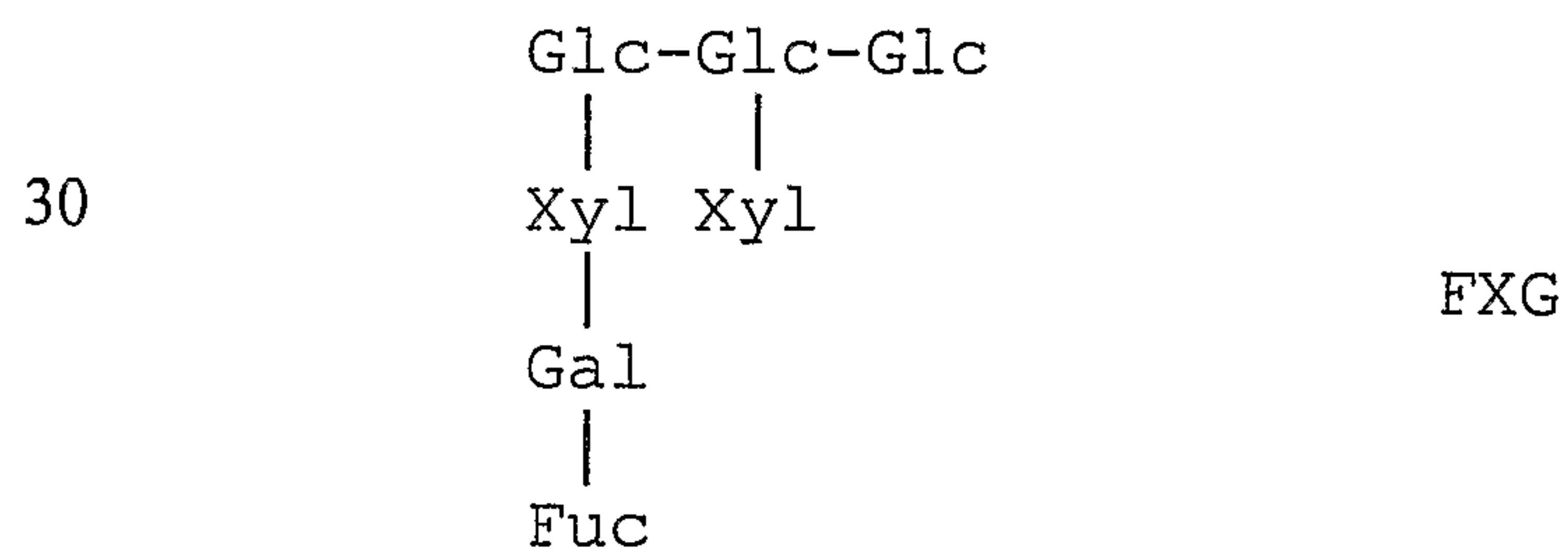
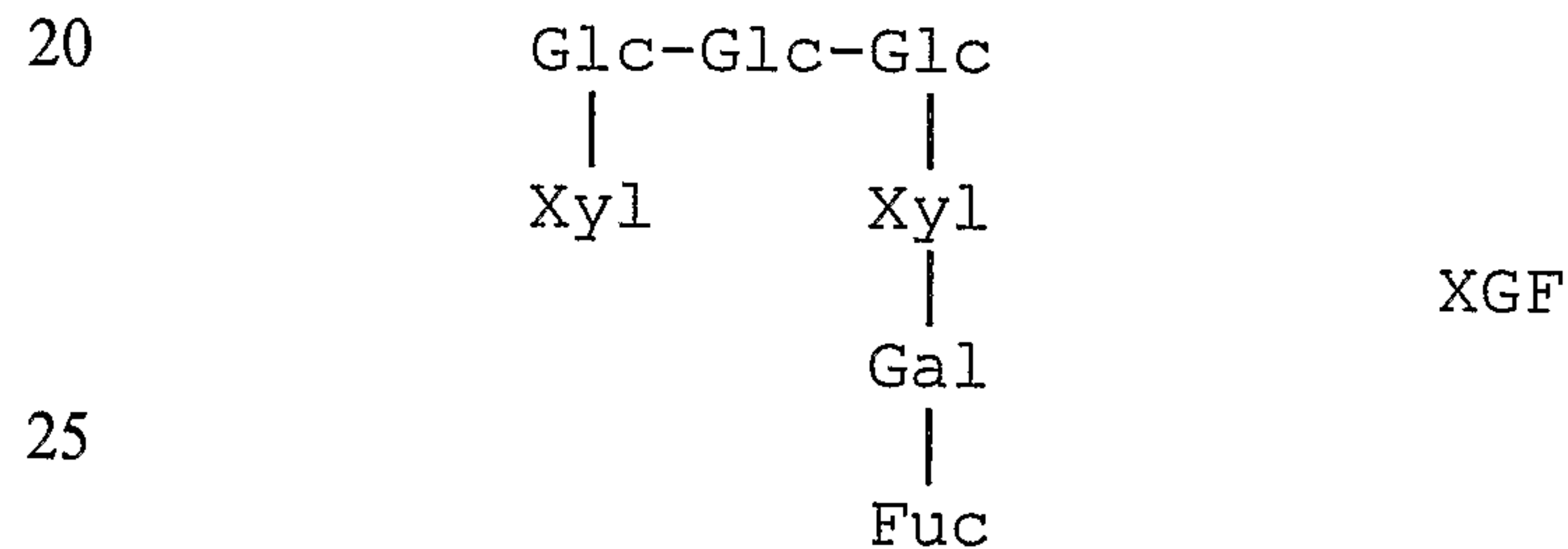
- a, b, et c, indépendamment les uns des autres représentent 1, ou 2.

L'invention a plus particulièrement pour objet encore, l'utilisation susmentionnée :

- de composés comprenant une structure osidique de formule XFG suivante :

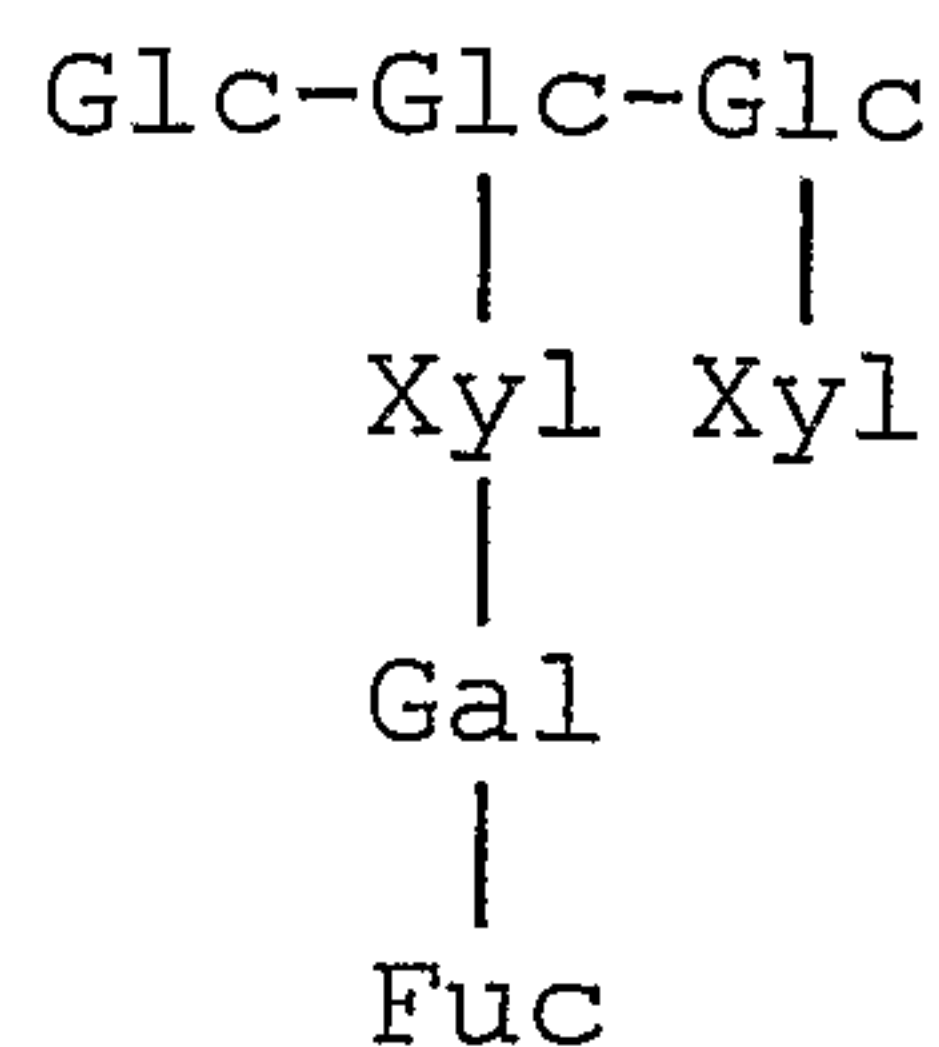


- ou de composés comprenant une structure dérivée de XFG répondant aux formules XGF, FXG, FGX, GFX, et GXF, suivantes :



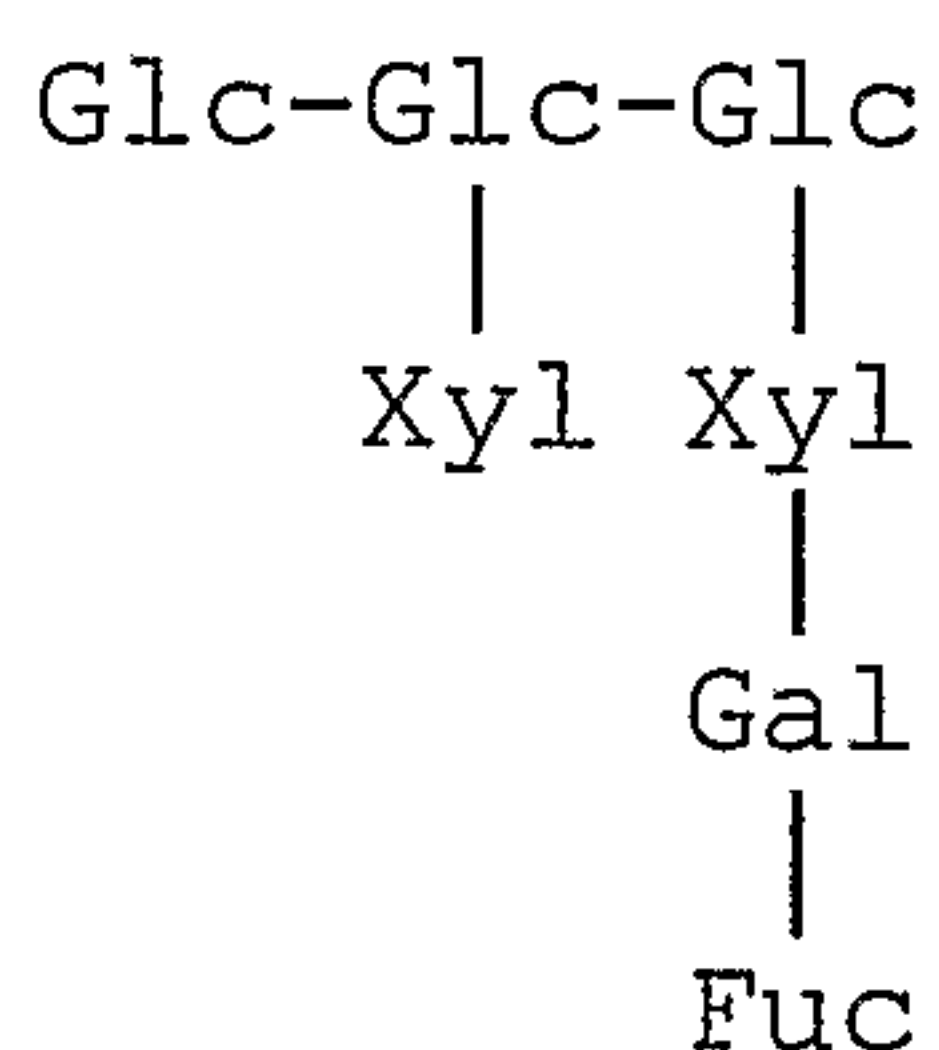
9

5



GFX

10



GXF

15

le résidu glucose en position terminale desdits composés étant réduit ou non, ou comprenant des structures dérivées par modification telles que définies ci-dessus.

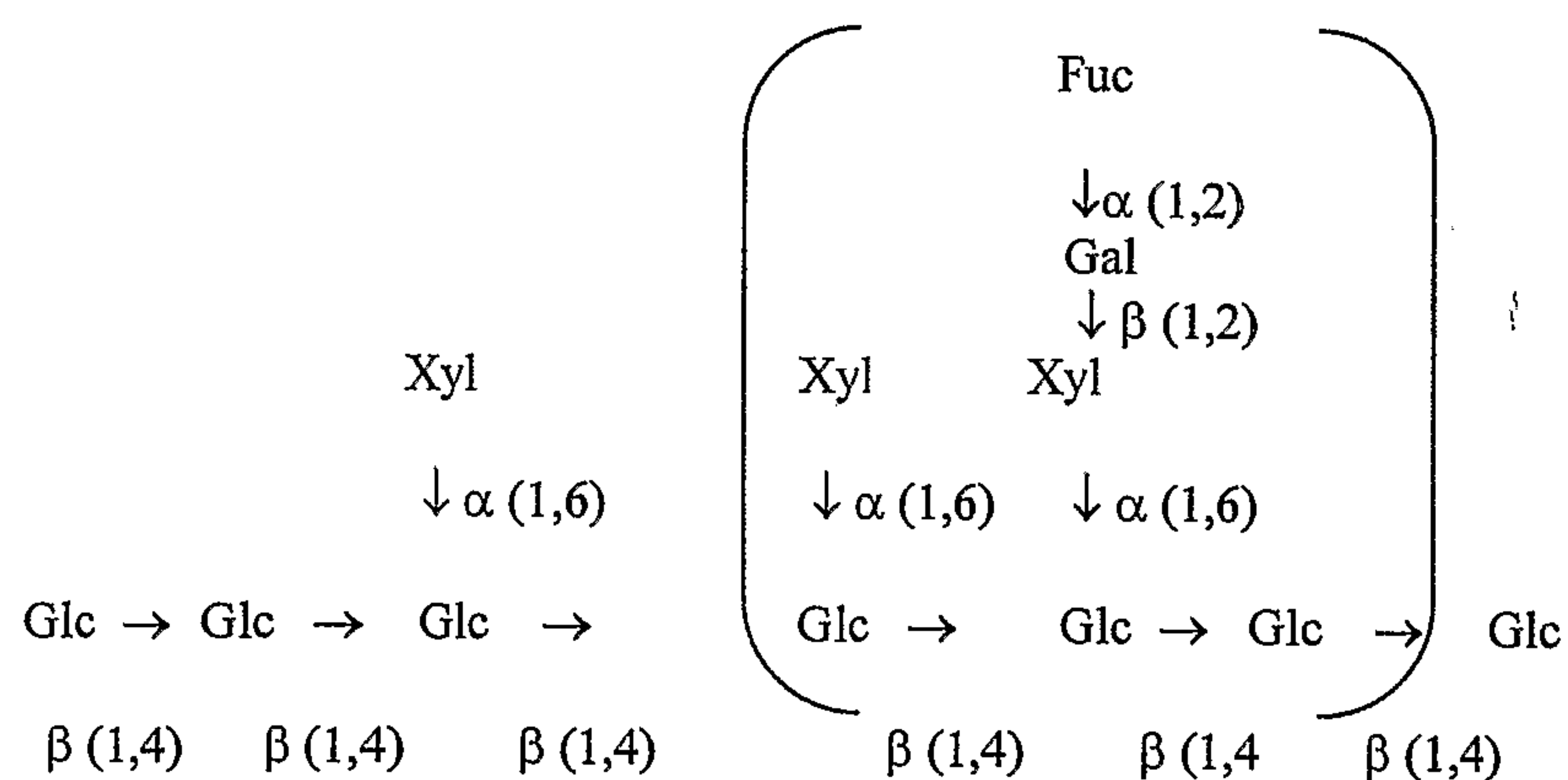
20

L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée, de composés choisis parmi les suivants : XFXG, XFGX, FGXX, FXGX, FXXG, GXXF, GXFX, GFXX, XXGF, XGXF, XGFX.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée, du composé de formule

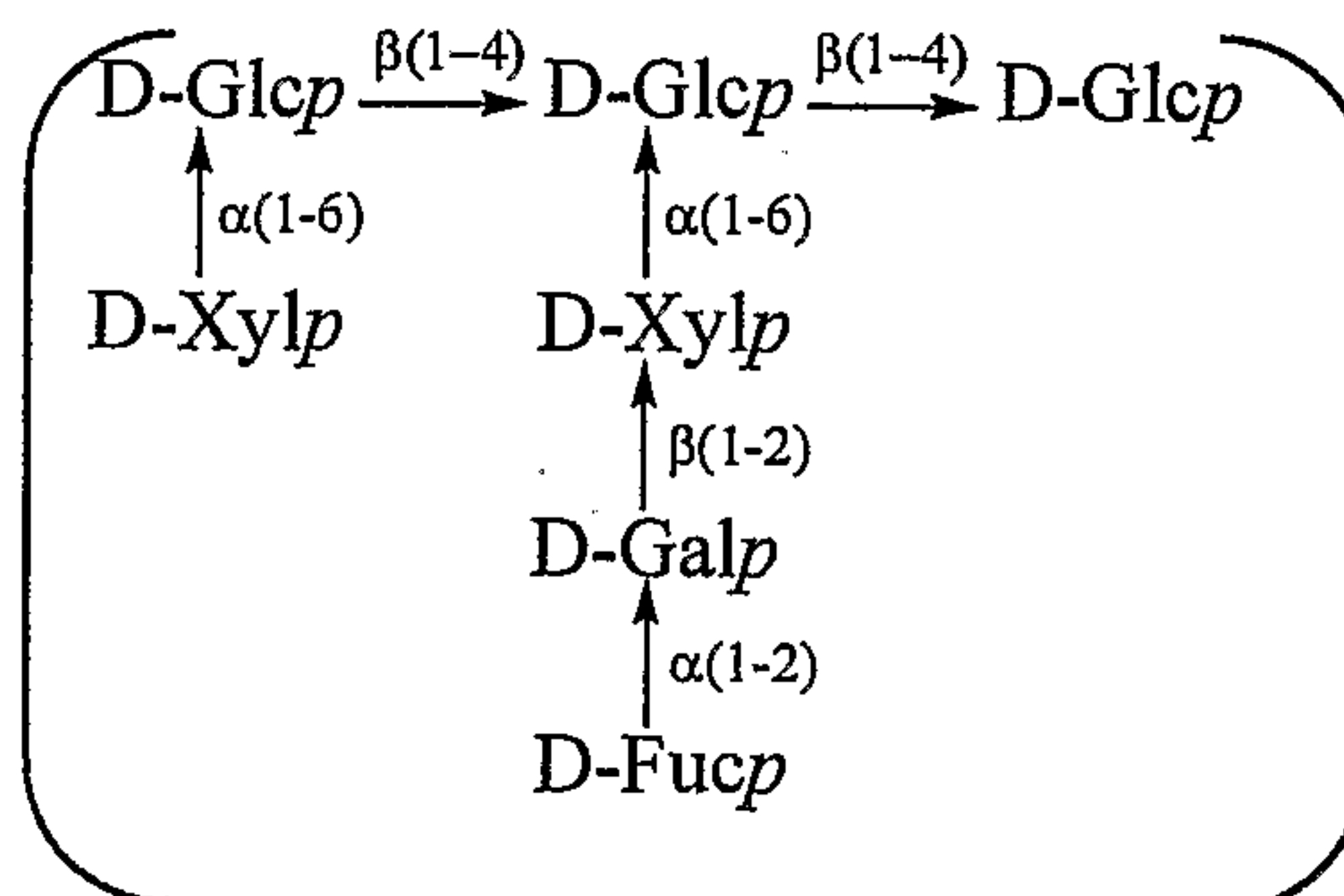
25

30



35

L'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation susmentionnée, du composé XFG de formule



5

L'invention a également pour objet l'utilisation susmentionnée de polymères ou d'oligomères comprenant à titre d'unité monomérique, des composés tels que définis ci-dessus, lesdits polymères ou oligomères comprenant entre 2 et environ 300 unités monomériques, notamment entre 2 et environ 100 unités, ou entre 2 et environ 50 unités, ou entre 2 et environ 20 unités, notamment entre 5 et 12 unités.

10

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, de polymères susmentionnés comprenant un nombre d'unités monomériques définies ci-dessus inférieur ou égal à 12, et de préférence inférieur ou égal à 5 (à savoir des polymères dont le degré de polymérisation DP est inférieur ou égal à 12, et de préférence inférieur ou égal à 5).

15

L'invention a également pour objet l'utilisation susmentionnée d'enchaînements successifs d'au moins deux unités monomériques définies ci-dessus, l'une au moins des unités desdits enchaînements étant différente de l'autre ou des autres unités.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée d'enchaînements d'unités tels que définis ci-dessus, dans lesquels le nombre d'unités est inférieur ou égal à 12, de préférence inférieur ou égal à 5.

20

L'invention concerne également un procédé de stimulation de la glutathion réductase chez les plantes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement des plantes avec au moins un composé tel que défini ci-dessus, notamment par irrigation du sol sur lequel ces plantes sont cultivées, avec une composition comprenant ledit composé, ou par enrobage des semences avec une telle composition, ou par pulvérisation foliaire en champ d'une telle composition sur les plantes à traiter.

25

L'invention a également pour objet l'application du procédé de stimulation de la glutathion réductase susmentionné, à la mise en œuvre d'un procédé d'adaptation des

plantes à un stress abiotique, tel que l'adaptation au froid, ou à un stress hydrique tel que la sécheresse, l'humidité ou la salinité.

L'invention concerne également un procédé de stimulation de la production de la phospholipase D chez les plantes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement des plantes avec au moins un composé tel que défini ci-dessus, notamment par irrigation du sol sur lequel ces plantes sont cultivées, avec une composition comprenant ledit composé, ou par enrobage des semences avec une telle composition, ou par pulvérisation foliaire en champ d'une telle composition sur les plantes à traiter.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'application du procédé de stimulation de la production de la phospholipase D susmentionné, à la mise en œuvre d'un procédé de contrôle de la floraison, et plus particulièrement d'un procédé de contrôle de l'induction florale, de la durée de la floraison, et de l'abscission des fleurs, et/ou à la mise en œuvre d'un procédé de contrôle de la fructification des plantes, et plus particulièrement d'un procédé de contrôle du déclenchement et de la durée de la maturation des fruits, de l'abscission des feuilles et des fruits.

L'invention a également pour objet un procédé de stimulation de la production des glycosylhydrolases chez les plantes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement des plantes avec au moins un composé tel que défini ci-dessus, notamment par irrigation du sol sur lequel ces plantes sont cultivées, avec une composition comprenant ledit composé, ou par enrobage des semences avec une telle composition, ou par pulvérisation foliaire en champ d'une telle composition sur les plantes à traiter.

L'invention concerne plus particulièrement l'application du procédé de stimulation de la production des glycosylhydrolases susmentionné, à la mise en œuvre d'un procédé d'induction de réactions de défense contre les pathogènes tels que les bactéries, virus, champignons, et/ ou de contrôle de certaines phases de développement des plantes (germination, fécondation, différenciation cellulaire au cours de la floraison ou de la fructification).

Avantageusement, les compositions susmentionnées comprenant au moins un composé défini ci-dessus et utilisées dans le cadre de la présente invention, se présentent en tant qu'intrant agricole sous forme solide (notamment poudre, granulés, pastilles), ou sous forme liquide (notamment en solution aqueuse), associé ou non à d'autres composants d'intrant agricole.

Parmi les plantes susceptibles d'être traitées dans le cadre de la présente invention, on citera principalement les plantes agronomiquement utiles, telles que la vigne, les

arbres fruitiers (notamment pommier, poirier, noyer), les céréales (notamment riz, orge), les oléagineux (notamment soja, colza, tournesol), les protéagineux (notamment les pois), et les cultures maraîchères (notamment les tomates).

L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée de composés définis ci-dessus, tels qu'obtenus :

- à partir de plantes, notamment par extraction de semences, feuilles, racines, fruits, en particulier à partir de pommes (*Malus malus* L., *Rosaceae*), notamment selon la méthode décrite dans Vincken JP, Beldman G, Niessen WMA, Voragen AGJ (1996) Carbohydrate Polymers, 29, 1, 75-85 ; Spronk BA, Rademaker GJ, Haverkamp J, Thomas-Oates JE, Vincken JP, Voragen AG, Kamerling JP, Vliegenthart JF (1997) Carbohydrate Research, 305, 2, 233-242); le procédé se déroule en 3 étapes: a) extraction du polymère xyloglucane de la biomasse par traitement alcalin suivi d'une dépectinisation par voie enzymatique; b) hydrolyse du polymère à l'aide de cellulases et plus particulièrement d'endo 1-4 β D glucanase isolée de *Trichoderma viride*; c) purification d'oligomères par chromatographie d'exclusion sur Bio-Gel P-2 suivie d'une chromatographie d'échange d'anions sur système Dionex .

- à partir de suspensions cellulaires de plantes, notamment de

. *Rubus fruticosus* L. en particulier selon Joseleau JP, Cartier N, Chambat G, Faik A, K Ruel (1992), Biochimie, 74,81-88;

. *Rosa* sp. en particulier selon Fry SC (1989) J.Exp.Bot. 40, 1-11; Mc Dougall, G.J. Fry SC (1991) Carbohydrate Research 219, 123-132,

le procédé se déroulant en 3 étapes: a) extraction du polymère xyloglucane des parois cellulaires par traitement alcalin couplé à une dépectinisation par voie chimique ou bien par déprotéinisation couplée à un traitement alcalin; b) hydrolyse du polymère à l'aide de cellulases et plus particulièrement d'endo 1-4 β D glucanase isolée de *Trichoderma viride*; c) purification d'oligomères par chromatographie d'exclusion sur Bio-Gel P-2 suivie d'un fractionnement par chromatographie d'échange d'anions sur système Dionex ou par chromatographie d'exclusion sur Bio-Gel P-2 suivie d'un fractionnement par chromatographie en phase inverse sur colonne C₁₈ ou par échange d'anions sur système Dionex; les cellulases peuvent être des enzymes obtenues par fermentation de souches bactériennes génétiquement modifiées ou non ou obtenues par voie recombinante.

L'invention a également pour objet l'utilisation susmentionnée de composés définis ci-dessus, tels qu'obtenus :

* par synthèse chimique, notamment selon la méthode décrite dans Pavlova ZN, Ash AO, Vnuchkova VA, Babakov AV, Torgov VI, Nechaev OA, Usov AI, Shibaev VN (1992) Plant Science 85, 131-134; ou sur la base des travaux de Watt D. K., Brasch D.J, Larsen D. S, Melton L. D, Simpson J Carbohydrate Research, 325, 2000, 300-312,

5 * par synthèse chemoenzymatique, notamment à partir d'oligomères de xyloglucane modifiés par activité endo-transglycosylase (β -D-glucosidase, α -(β) L-xylodidase, β -D-galactosidase) selon York W.S., Harvey L.K., Guillen R., Alberheim P., Darvill A., Carbohydrate Research, 1993, 248, 285-301 ou par activité endo transxyloglucanases selon G. Maclachlan, C. Brady, Plant Physiology, 105, 1994, 965-10 974) ou par activité fucosyltransférase (s) d'origine végétale ou animale selon Baydoun E. A.-H., Abdel-Massih R. m, Dani D, Rizk S, Bret C. T, Journal of Plant Physiology, 158, 2000, 145-150 ; Faik A, Bar Peled M, DeRocher AE, Zeng W, Perinn RM, Wilkerson C, Raikhel NV, Keegstra K J Biol Chem, 2000, 275,20,

* par voie recombinante,

15 * par hydrolyse du polymère xyloglucane ou à partir d'oligomères tels qu'obtenus de polymères ou de glycanes représentant la partie glycanique de glycoprotéines à partir d'une dégradation enzymatique de xyloglucanes présents dans des biomasses telles que :

20 1/ les fruits et légumes, et plus particulièrement, poivrons, tomates, pommes de terre, olives et pommes, ou de résidus issus de ces biomasses (« pomaces »...) selon les méthodes décrites dans :

Spronk B.A., Rademaker G.J., Haverkamp J., Thomas-Oates J.E., Vincken J.P., Voragen A.G., Kamerling J.P., Vliegthart J.F., Carbohydrate Research, 305, 1997, 233-242,

25 Renard C.M.G.C., Lomax J.A., Boon J.J., Carbohydrate Research, 232, 1992, 303-320,

Vincken J.P., Beldman G., Niessen W.M.A., Voragen A.G.J., Carbohydrate Polymers, 29 (1996) 75-85 ;

2/ les suspensions cellulaires (Rubus fruticosos, sycomore) selon :

30 Joseleau J.P., Cartier N., Chambat G., Faik, A., Ruel K., Biochimie, 74 (1992) 81-88,

Augur C., Yu L., Ogawa T., Sinay P., Darvill A.G., Albersheim P., Plant Physiology, 99 (1992) 180-185 ;

3/ par fermentation de microorganismes (bactéries, champignons...) génétiquement modifiés ou non ;

4/ les graines (capucine, *Hymenaea*,...) selon McDougall G.J., ry S.C., Plant Physiology, 89 (1989) 883-887,

5 5/ les feuilles, et plus particulièrement celles d'*Hymenaea courbaril*, Busato A.P., Vargas-Rechia C.G., Reicher F., Phytochemistry, 58 (2001) 525-531,

en utilisant des enzymes qui sont :

10 . des xyloglucanases (Garcia-Garrido J.M., Rejon-Palomares A., Ocampo J.A., Garcia-Romera I., Mycol. Res., 103 (1999) 882-886),

15 . des cellulases, et plus particulièrement des endo β -1,4 glucanases de *Trichoderma viride* (Vincken JP., de Keiser A., Beldman G., Voragen A.G., J., Plant Physiology, 108, 1995, 1579-1585), de *Tricoderma. Reesei* (Hasper A.A., Dekkers E., van Mil M., van de Vondervoort P.J.L., de Graaff L.H., Applied and Environmental Microbiology, 68, 2002, 1556-1560) ou d'*Aspergillus oryzae* (Kato Y, Matsuda K., Agric. Biol. Chem., 44, 1980, 1759-1766),

. des exo cellulases comme celles d'*Irpex lacteus*,

lesdites enzymes étant :

20 . soit isolées de souches bactériennes ou fongiques génétiquement modifiées ou non, ou obtenues par voie recombinante (Pauly M, Andersen LN, Kaupinnen S, Kofod LV, York WS, Albersheim P, Darvill A (Glycobiology 1999, 9, 1, 93-100),

25 . utilisées seules ou en mélange associées de préférence avec des enzymes pectolytiques (polygalacturonases, pectine estérases, pectine lyases) selon Renard C.M.G.C., Searle-can Leewen M.J.F., Voragen A.G.J., Thibault J.F., Pilnik W., Carbohydrate Polymers, 14, 1991, 295-314, ou bien remplacées par des enzymes à spectre large de type pectolytique.

30 Le mélange d'oligomères obtenu par hydrolyse du polymère est fractionné en degré de polymérisation (DP) par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de Bio-Gel et les oligosaccharides de DP d'intérêt sont ensuite séparés en fonction de caractéristiques structurales par chromatographie haute performance (HPLC).

Plusieurs systèmes sont susceptibles d'être utilisés parmi la chromatographie sur échangeur d'anions (HPAEC) ou sur colonne DIONEX (Vincken J.P., Beldman G., Niessen W.M.A., Voragen A.G.J., Carbohydrate Polymers, 29, 1996, 1, 75-85), et la chromatographie d'affinité sur phase normale (Kakegawa K., Edashige Y., Ishii T.,

Phytochemistry, 47, 1998, 767-771) ou phase inverse (Watt D.K., Brash D.J., Larsen D.S., Melton L.D., Carbohydrate Polymers, 39, 1999, 165-180).

La structure de chaque oligosaccharide est ensuite confirmée par des méthodes spectroscopiques (RMN et spectrométrie de masse) (York W.S., van Halbeek H., Darvill A.G., Albersheim P., Carbohydrate Research, 200, 1990, 9-31).

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit du potentiel éliciteur de composés selon l'invention chez la vigne, à savoir de l'effet inducteur d'une résistance au froid

Des plants provenant de différents cépages dont le cépage *Pinot noir* sont utilisés pour l'étude. Chaque échantillon, composé de 5 plants, est traité par pulvérisation foliaire à différents stades végétatifs de l'échelle BBCH avec l'éliciteur xyloglucane : heptasaccharide XFG en solution à des doses variables ; la vaporisation de 2.5ml de solution par plante se fait à l'aide d'un vaporisateur (écart de +/- 1%).

Après l'application de l'éliciteur, les plants ont été exposés à un stress froid d'intensité et de durée variable. Après l'exposition au froid, les plants sont mis en chambre climatique à 20°C avec une alternance jour/nuit de 12h. L'aspect des feuilles est observé 24h, 72h après la sortie du froid. Les effets de froid sont évalués en observant les nécroses foliaires induites par le gel et les plantes sont conservées plusieurs mois pour suivre leur développement ultérieur.

Les résultats sur 50 plants et relatifs à 10 réplifications sont exprimés par l'indice de protection $I_f(\%) = 100 - P$; P, étant la proportion de feuilles nécrosées. Les résultats concernant les plants témoins T traités à l'eau et les plants élicités par l'heptasaccharide : XFG ou XFGol ont été exprimés par l'indice de protection $I_f(\%)$ mesuré 24h après le stress.

Résultats :

Cépage : Pinot noir au stade BBCH 13

Température : 3,5°C durée 180 min

	T (I_f)	XFG (I_f)	XFGol (I_f)
dose : 33 mg/l	75	100	100
dose : 33 µg/l	75	100	100

5 Par ailleurs, on a noté que l'application de l'éliciteur :

- apporte aussi un effet de protection contre le gel sur les cépages Chenin, Chardonnay, Cabernet sauvignon, Pinot meunier, Merlot, Grolleau,
- ne change pas le développement de la vigne,
- a un effet protecteur contre le gel qui se maintient plusieurs jours.

10 Les plants traités par l'éliciteur xyloglucane à la dose de 3,3 mg/l résistent au stress froid qui détruit les feuilles des témoins traitées à l'eau : la coloration des feuilles des plants élicités reste normale au lieu de virer au vert sombre dès le dégel (comme cela s'observe pour les témoins traités à l'eau), et aucun signe de nécrose n'apparaît après 24 h comme cela s'observe pour les témoins traités à l'eau).

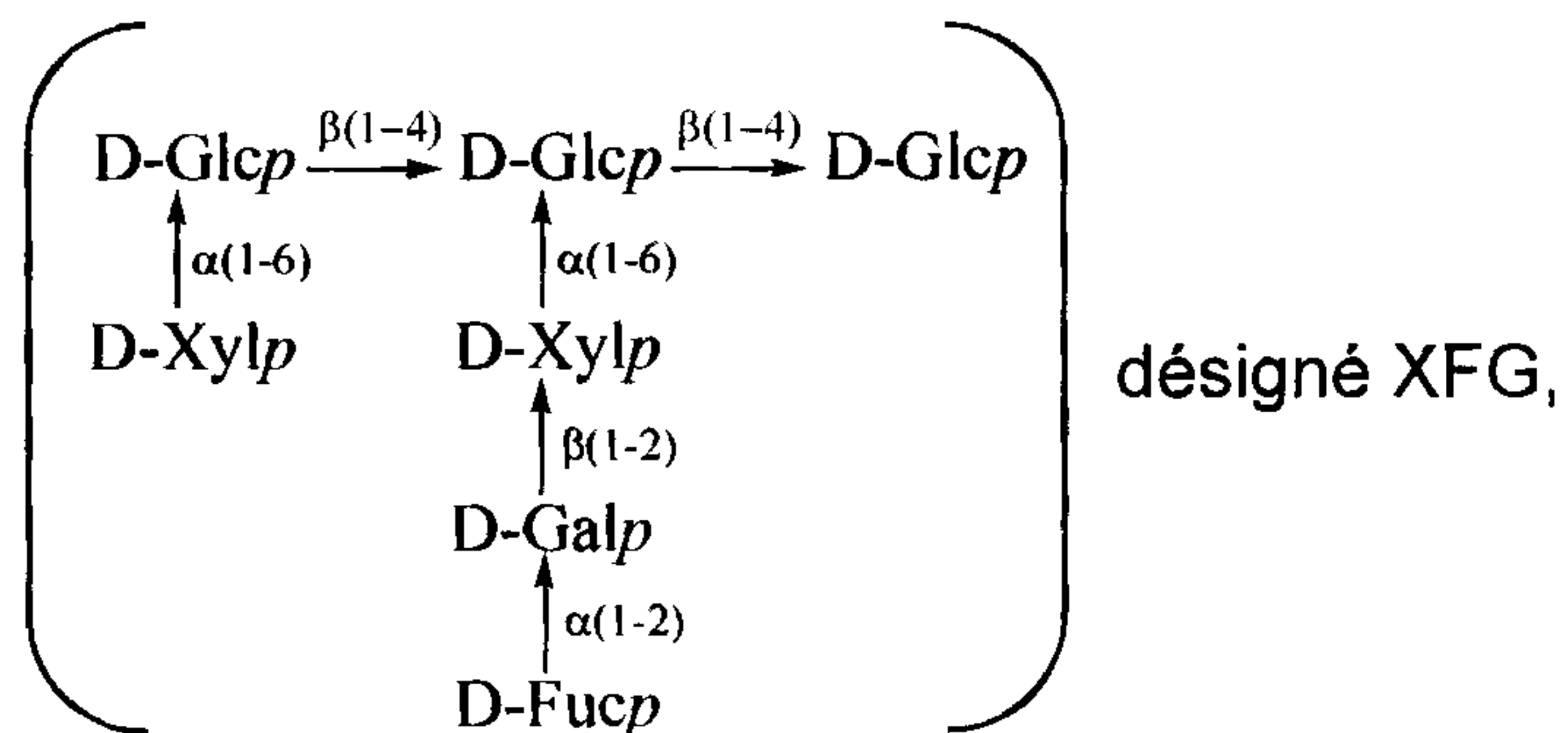
15 On a noté que l'application de l'éliciteur n'apporte pas de perturbation dans l'évolution de la plante étant donné que le développement des plants élicités après le stress froid est comparable à celui des plants témoins non exposés au froid.

11534-69

17

REVENDICATIONS

1. Utilisation du composé de formule :



5

D-Xylp représentant le D-Xylopyranosyl, D-Glcp représentant le D-Glucopyranosyl, D-Galp représentant le D-Galactopyranosyl et D-Fucp représentant le D-Fucopyranosyl, le résidu glucose en position terminal étant le cas échéant sous forme réduite, ce composé ayant la propriété de stimuler la glutathion reductase, pour l'adaptation des plantes à un stress abiotique ou à un stress hydrique.

10

2. L'utilisation selon la revendication 1, dans laquelle le stress abiotique est le froid.
3. L'utilisation selon la revendication 1, dans laquelle le stress hydrique est la sécheresse, l'humidité ou la salinité.
4. Procédé de stimulation de la glutathion réductase chez les plantes, comprenant une étape de traitement des plantes avec le composé tel que défini dans la revendication 1.
5. Le procédé selon la revendication 4, dans lequel le traitement des plantes se fait soit par irrigation du sol avec une composition comprenant le composé, soit par enrobage des semences avec une telle composition, soit par pulvérisation foliaire en champ d'une telle composition sur les plantes à traiter.

15

