

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①1 N° de publication : **3 108 014**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **20 02511**

⑤1 Int Cl⁸ : **A 01 N 65/03 (2019.12), A 01 N 59/00**

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 13.03.20.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 17.09.21 Bulletin 21/37.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : **AGRO INNOVATION INTERNATIO-
NAL Société par actions simplifiée — FR.**

⑦2 Inventeur(s) : **NGUEMA-ONA Éric et YVIN Jean-
Claude.**

⑦3 Titulaire(s) : **AGRO INNOVATION INTERNATIONAL
Société par actions simplifiée.**

⑦4 Mandataire(s) : **CABINET BEAU DE LOMENIE.**

⑤4 Composition phytosanitaire comprenant des ulvanes et du silicium.

⑤7 Composition phytosanitaire comprenant des
ulvanes et du silicium

L'invention concerne une composition phytosanitaire
comprenant (i) des ulvanes et/ou des oligosaccharides déri-
vés d'ulvanes, par exemple sous la forme d'un extrait conte-
nant des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés
d'ulvanes ; et (ii) du silicium, l'utilisation de ladite compo-
sition pour activer des réactions de défense d'une plante et de
résistance contre des contraintes biotiques, ainsi qu'un pro-
cédé pour activer les réactions de défense d'une plante et
de résistance contre des contraintes biotiques, comprenant
l'application à ladite plante d'une quantité efficace de la
composition phytosanitaire.

FR 3 108 014 - A1



Description

Titre de l'invention : Composition phytosanitaire comprenant des ulvanes et du silicium

Domaine technique

[0001] L'invention concerne une composition phytosanitaire comprenant (i) des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes, par exemple sous la forme d'un extrait contenant des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes ; et (ii) du silicium, l'utilisation de ladite composition pour activer des réactions de défense d'une plante et de résistance contre des contraintes biotiques, ainsi qu'un procédé pour activer les réactions de défense d'une plante et de résistance contre des contraintes biotiques, comprenant l'application à ladite plante d'une quantité efficace de la composition.

Technique antérieure

[0002] Les plantes peuvent être attaquées par de multiples agents pathogènes (tels que champignons, bactéries, virus, viroïdes, protozoaires, nématodes, herbivores) avec pour conséquences des pertes de rendement et une baisse de qualité de la production.

[0003] Pour renforcer la protection des végétaux face à ces agents pathogènes, des agents chimiques, par exemple des pesticides, peuvent être utilisés. Cependant, les pesticides représentent aujourd'hui un danger potentiel pour l'homme et/ou pour l'environnement. Ainsi, de nouvelles stratégies de protection des végétaux ont été développées, grâce à l'étude des mécanismes de défense de la plante.

[0004] En effet, bien que dépourvues de système immunitaire analogue aux animaux supérieurs, les plantes disposent de leur propre arsenal de défense. La connaissance de ces mécanismes permet d'envisager leur exploitation pour lutter contre les maladies.

[0005] Les mécanismes de défense de la plante peuvent impliquer une série d'événements déclenchés dans ou à la surface des cellules végétales lorsque la plante est attaquée par un pathogène, telle que la reconnaissance de l'agent pathogène, l'envoi de cette information au noyau, l'induction de gènes de défense puis synthèse de composés antimicrobiens et de protéines dites PR (Pathogenesis-Related), la transmission du signal d'alarme à toute la plante et à ses voisines.

[0006] Ainsi, pour augmenter la capacité de réponse et donc de résistance d'une plante vis-à-vis de certains pathogènes, une des stratégies possibles consiste à induire préalablement à l'attaque du pathogène les réactions de défense par l'utilisation de molécules signaux. Ces molécules signaux, qui sont de natures chimiques très variées (protéines, peptides, glycoprotéines, lipides et oligosaccharides) sont capables de transmettre l'information d'une attaque même à très faible concentration.

[0007] Elles sont pour la plupart d'origine microbienne (par exemple la harpine) ou

d'origine végétale (par exemple les acides oligogalacturoniques) ou synthétisées chimiquement (par exemple le benzothiadiazole) ou d'origine minérale (par exemple les sels de phosphite).

- [0008] En réponse aux traitements par ces molécules signaux, la plante réagit en synthétisant des protéines structurales, qui renforcent la paroi des cellules végétales, des enzymes impliquées dans la synthèse de composés anti-microbiens tels que des phytoalexines, des hydrolases comme des chitinases ou des glucanases et des enzymes inhibitrices qui agissent contre les enzymes hydrolytiques des agents pathogènes. La mise en place de ces moyens de défense passent par l'activation, au niveau de la plante d'une signalisation hormonale (présence ou augmentation de la concentration de phytohormones telles que l'acide salicylique et/ou ses dérivés, et/ou de l'acide jasmonique et/ou ses dérivés), mais également par l'induction de gènes de défense, codant pour des enzymes de défense (hydrolases, chitinases), codant pour des protéines dites "PR" (Pathogenesis-Related), ou de gènes codant pour des enzymes de biosynthèse des métabolites de défense (phytoalexines), ou encore du renforcement des barrières structurales (i.e. renforcement pariétal).
- [0009] L'activation du système immunitaire des plantes par des molécules signaux provoque la synthèse et le dépôt de composés phénoliques et de protéines de défense dans la paroi, l'accumulation de composés antimicrobiens et la synthèse de protéines "PR". Le renforcement pariétal, qui peut ralentir ou inhiber la progression du pathogène à l'intérieur de la plante, résulte par exemple du dépôt de callose dans la paroi ou les plasmodesmes, ainsi que de la synthèse de lignines. Ces mécanismes permettent de ralentir les invasions fongiques ou virales. De même, les HRGP extensines (Hydroxyprolin Rich GlycoProtein) et les GRP (Glycin Rich Protein) peuvent, par leur rôle de renforcement de la paroi, rendre cette dernière plus difficile à dégrader.
- [0010] Les phytoalexines, composés antimicrobiens de faible poids moléculaire, permettent dans certains cas de lutter directement contre les parasites, en raison de leur capacité à s'accumuler rapidement autour du point d'infection en empêchant ainsi la progression de l'invasion. Les protéines PR (intra- ou extra-cellulaires) s'accumulent dans les plantes après leur inoculation par des agents pathogènes et, dans le cas d'interactions incompatibles, peuvent constituer jusqu'à 10% des protéines solubles de la feuille. Pour certaines, un rôle actif dans la dégradation de la paroi d'agents pathogènes fongiques (β -glucanase, chitinase) a été montré.
- [0011] Il est à noter que les trois phénomènes précités (renforcement de la paroi, synthèse de phytoalexines et synthèse de protéines PR) accompagnent l'activation du système immunitaire des plantes sans en être exclusifs. En effet, la synthèse de protéines GRP et HRGP a aussi été détectée lors d'interactions compatibles, ainsi que consécutivement à une blessure.

- [0012] L'activation du système immunitaire des plantes peut également être accompagnée de la synthèse de molécules de signalisation, telles que l'acide salicylique et/ou ses dérivés, et/ou de l'acide jasmonique et/ou ses dérivés, des phytohormones qui interviennent dans le processus de défense des plantes.
- [0013] Les algues marines constituent une ressource végétale abondante et sont, depuis longtemps, utilisées sur les régions côtières comme fertilisants du sol. La germination des graines, l'obtention de meilleurs rendements, une résistance aux maladies, une durée de conservation plus longue des fruits ont été mises en évidence par suite de traitements de plusieurs plantes par des extraits d'algues. Les conclusions en matière de santé des plantes avaient essentiellement été attribuées à la richesse en bêtaïnes, en phytohormones et en oligo-éléments des algues utilisées.
- [0014] Il est aujourd'hui reconnu que certains oligosaccharides d'origine marine présentent un effet éliciteur sur certaines voies de défense des plantes. Ainsi, le document WO 99/03346 décrit l'utilisation d'oligosaccharides de type $\beta(1-3)$ glucanes notamment extraits de l'algue brune *Laminaria digitata* pour la potentialisation et la stimulation des défenses naturelles du blé infecté par la septoriose. Ces $\beta(1-3)$ glucanes induisent également chez les cellules de tabac quatre marqueurs de défense dont l'activité phénylammionialyase (PAL), qui est une enzyme clé pour la synthèse des phytoalexines, et l'activité O-méthyl transférase (OMT), qui est une enzyme impliquée dans la synthèse de lignine.
- [0015] Dans le cas des algues rouges, il a été montré que le carraghénane induit l'expression des gènes codant pour la cyclase sesquiterpène, la chitinase et les inhibiteurs de protéinases.
- [0016] Dans le cas des algues vertes, le document WO2005094588 décrit quant à lui l'utilisation des ulvanes ou d'oligosaccharides dérivés d'ulvanes, comme activateurs des réactions de défense des plantes et de résistance contre des contraintes biotiques ou abiotiques. Cependant, il subsiste un besoin de trouver de nouvelles compositions, qui permettraient d'augmenter la capacité de réponse et donc de résistance d'une plante, par exemple en activant des mécanismes de protection supplémentaires et complémentaires de la plante, qui peuvent impliquer la stimulation de la production d'acide salicylique et/ou de ses dérivés, et/ou d'acide jasmonique et/ou de ses dérivés, mais également l'induction d'autres gènes de défense, codant pour des enzymes de défense (hydrolases, chitinases), codant pour des protéines dites "PR", ou de gènes codant pour des enzymes de biosynthèse des métabolites de défense (phytoalexines), ou encore de renforcement pariétal.
- [0017] C'est dans ce contexte que le demandeur a mis en évidence, et ceci constitue le fondement de la présente invention, qu'une composition phytosanitaire comprenant :
- (i) des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes, par exemple sous la

forme d'un extrait contenant des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes ;
et

(ii) du silicium

permettait de stimuler l'expression des gènes de défense d'une plante, notamment pour induire la production d'acide salicylique et/ou de ses dérivés, et/ou d'acide jasmonique et/ou de ses dérivés, et peut donc être utilisée pour activer des réactions de défense d'une plante et de résistance contre des contraintes biotiques. Une telle composition peut être utilisée seule ou associée à des pesticides, par exemple des fongicides. En association avec des pesticides, elle permet d'activer des réactions de défense d'une plante et de résistance contre des contraintes biotiques avec une quantité de pesticides réduite comparé à des pesticides seuls.

Résumé de l'invention

[0018] La présente invention, qui trouve application dans le domaine agro-écologique et agricole, vise à proposer une nouvelle composition phytosanitaire, pour activer des réactions de défense d'une plante et de résistance contre des contraintes biotiques.

[0019] Selon un premier aspect, l'invention concerne une composition phytosanitaire comprenant:

(i) des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes, par exemple sous la forme d'un extrait contenant des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes ;
et

(ii) du silicium.

[0020] Selon un deuxième aspect, l'invention concerne l'utilisation de la composition telle que définie ci-dessus, pour activer des réactions de défense d'une plante et de résistance contre des contraintes biotiques.

[0021] Selon un troisième aspect, l'invention concerne un procédé pour activer les réactions de défense d'une plante et de résistance contre des contraintes biotiques, comprenant l'application à ladite plante d'une quantité efficace de la composition telle que définie ci-dessus.

Description détaillée

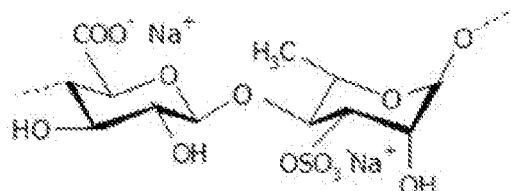
[0022] Dans le cadre de la présente invention, on entend désigner par «composition phytosanitaire» tout produit dont l'emploi est destiné à soigner ou prévenir les maladies d'une plante. Dans le cadre de la présente invention, une composition phytosanitaire permet d'activer les réactions de défense d'une plante et d'induire une résistance contre des contraintes biotiques.

[0023] Dans le cadre de la présente invention, on entend désigner par « ulvanes », des polysaccharides hydrosolubles, présents notamment dans les parois cellulaires des algues vertes des genres *Ulva* et *Enteromorpha*. Les ulvanes se définissent plus précisément

comme des polysaccharides acides fortement sulfatés et sont essentiellement composés d'unités dérivées de rhamnose 3-sulfate, de xylose, de xylose 2-sulfate, d'acide gluconique et d'acide iduronique. Les quatre unités récurrentes suivantes sont notamment caractéristiques des ulvanes :

[0024] La formule (I) montre le groupement β -D-GlcA- (1 \rightarrow 4)- α -L-Rha 3 sulfate(1 \rightarrow), encore dénommé acide ulvanobiouronique 3-sulfate type A :

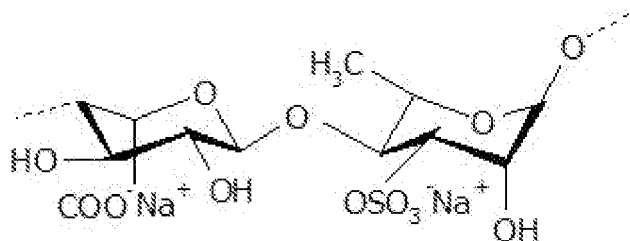
[Chem.1]



(I)

[0025] La formule (II) montre le groupement α -L-IdoA- (1 \rightarrow 4)- α -L-Rha 3 sulfate(1 \rightarrow), encore dénommé acide ulvanobiuronique 3-sulfate type B :

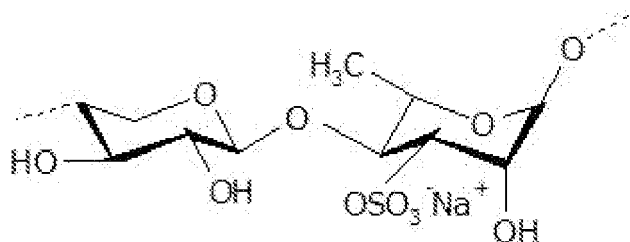
[Chem.2]



(II)

[0026] La formule (III) montre le groupement β -D-Xyl- (1 \rightarrow 4)- α -L-Rha 3 sulfate(1 \rightarrow), encore dénommé acide ulvanobiose 3-sulfate :

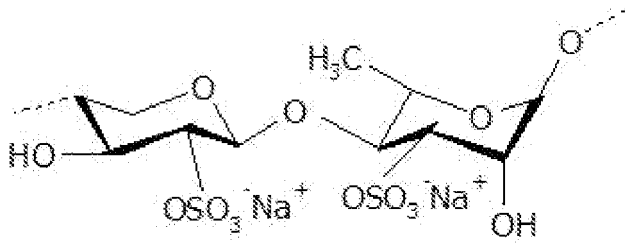
[Chem.3]



(III)

[0027] La formule (IV) montre le groupement β -D-Xyl 2 -sulfate- (1 \rightarrow 4)- α -L-Rha 3 sulfate(1 \rightarrow), encore dénommé acide ulvanobiose 2',3-disulfate :

[Chem.4]



(IV)

- [0028] Le terme « oligosaccharides dérivés d'ulvanes » désigne dans le cadre de l'invention des oligosaccharides obtenus par hydrolyse acide des ulvanes, par exemple par hydrolyse acide à chaud (e.g. à 85°C), ou par hydrolyse enzymatique des ulvanes, par exemple en utilisant une ou plusieurs glycosidases.
- [0029] Le terme « extrait » désigne le produit résultant d'une extraction à partir d'une source, par exemple, à partir d'une source biologique, comme des cellules. Lorsqu'il s'agit de cellules, le terme « extrait » désigne donc le produit résultant de l'extraction du contenu de cellules. Ainsi, par exemple, le terme « extrait d'*Ulva* » désigne le produit résultant de l'extraction du contenu des cellules d'*Ulva*.
- [0030] Les termes « extrait contenant des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes » et « extrait d'ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes » sont interchangeables et désignent un extrait obtenu à partir d'une source d'ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes. Un extrait contenant des ulvanes mis en œuvre dans le cadre de la présente invention est de préférence un extrait d'algues contenant des ulvanes, plus préférentiellement un extrait d'*Ulva* ou un extrait d'*Enteromorpha*, par exemple un extrait d'*Ulvaarmoricana*, un extrait d'*Ulvarigida*, un extrait d'*Ulva rotundata*, un extrait d'*Ulvalactuca*, un extrait d'*Enteromorphaintestinalis*, ou un extrait d'*Enteromorpha compressa*, de préférence un extrait d'*Ulvaarmoricana*, un extrait d'*Enteromorphaintestinalis* ou un extrait d'*Enteromorpha compressa*. Un extrait contenant des oligosaccharides dérivés d'ulvanes peut être obtenu par hydrolyse acide ou par hydrolyse enzymatique d'un extrait contenant des ulvanes, par exemple d'un extrait contenant des ulvanes tel que défini ci-dessus.
- [0031] L'extrait contenant des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes peut être enrichi en ulvanes et/ou en oligosaccharides dérivés d'ulvanes. Des techniques d'enrichissement des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes sont décrites dans la littérature et faciles à mettre en œuvre par l'homme de l'art, par exemple la précipitation par addition de sulfate d'ammonium, par addition d'éthanol ou par filtration. La concentration en ulvanes et/ou en oligosaccharides dérivés d'ulvanes dans l'extrait est de préférence d'au moins 1 g/L, de préférence au moins 10 g/L, au moins 11 g/L, au moins 12 g/L, au moins 13 g/L, au moins 14 g/L, au moins 15

g/L, au moins 16 g/L, au moins 17 g/L, au moins 18 g/L, au moins 19 g/L, par exemple entre 1 et 200 g/L, de préférence entre 10 et 100 g/L, plus préférentiellement entre 15 et 50 g/L, par exemple environ 20 g/L.

[0032] Les conditions d'extraction et la nature des algues seront choisies de telle façon que l'extrait obtenu présente la concentration souhaitée dans l'application envisagée. Par exemple, la concentration en ulvanes et/ou en oligosaccharides dérivés d'ulvanes varie selon le procédé de préparation. La concentration en ulvanes peut notamment varier en fonction de la quantité d'algues fraîches et/ou sèches utilisée (par exemple, lors d'une extraction aqueuse, lorsqu'on augmente le ratio algue/eau, la concentration en ulvanes et/ou en oligosaccharides dérivés d'ulvanes de l'extrait obtenu augmente également), le temps d'extraction (par exemple, une augmentation du temps d'extraction lors d'une extraction aqueuse permet généralement d'augmenter la concentration en en ulvanes et/ou en oligosaccharides dérivés d'ulvanes de l'extrait obtenu) et/ou la température d'extraction (par exemple, une augmentation de la température d'extraction lors d'une extraction aqueuse permet généralement d'augmenter la concentration en en ulvanes et/ou en oligosaccharides dérivés d'ulvanes de l'extrait obtenu).

[0033] La préparation d'un extrait d'ulvanes et/ou d'oligosaccharides dérivés d'ulvanes ne présente aucune difficulté particulière, de nombreux procédés d'extraction sont décrits dans la littérature. Le procédé d'extraction n'est pas limité à un procédé particulier, et les procédés classiques peuvent être mis en œuvre pour préparer un extrait contenant des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes, comme par exemple l'extraction aqueuse. Un extrait d'ulvanes et/ou d'oligosaccharides dérivés d'ulvanes peut par exemple être obtenu par un procédé comportant les étapes suivantes : lavage, broyage, extraction (séparation solide-liquide) et éventuellement fractionnement et concentration. L'extrait obtenu peut être plus ou moins concentré selon l'utilisation envisagée. Une déshydratation totale de cet extrait permet d'obtenir un extrait sous forme pulvérulente hydrosoluble pouvant être obtenue, par exemple, par sécheur à tambour ou par atomisation.

[0034] Au sens de la l'invention, on entend par « silicium » l'élément chimique de symbole Si sous toutes ses formes. Cela comprend notamment la silice (également connue sous le terme « oxyde de silicium »), les silicates (e.g. SiO_3^{2-} et SiO_4^{4-}) et les silicates combinés. La silice existe à l'état libre sous formes cristallines ou amorphes. Sous sa forme cristalline, la silice se présente sous forme de cristaux non-moléculaires formés de motifs tétraédriques SiO_4 liés entre eux par les atomes d'oxygène de façon régulière, comme dans le quartz. Sous sa forme amorphe, la silice se présente sous forme de dioxyde de silice (SiO_2), comme dans le verre. Le silicium peut par exemple être sous la forme de silice minérale solide, telle que la terre de diatomée ou sable, sous la forme de silice minérale liquide, telle que l'acide orthosilicique, sous la forme de produits

vitreux à base de silicium, telle que des poudres ou fibres de verres, sous la forme de silice organique et / ou sous la forme d'un sel soluble. Préférentiellement, le silicium est sous la forme d'un sel soluble. On entend par « sel soluble » un sel soluble dans un solvant tel que l'eau. La silice est un oxyde acide qui réagit avec les oxydes basiques pour donner les silicates, notamment SiO_3^{2-} et SiO_4^{4-} . Les silicates sont capables de se combiner à d'autres atomes métalliques, comme par exemple l'aluminium (Al), le fer (Fe), le Magnésium (Mg), le calcium (Ca), le sodium (Na), le potassium (K). Les silicates combinés ainsi obtenus sont respectivement le silicate d'aluminium (Al_2SiO_3), le silicate de fer (Fe_2SiO_3), le métasilicate de magnésium (MgSiO_3), le silicate de calcium (Ca_2SiO_3), le silicate de sodium (Na_2SiO_3) et le silicate de potassium (K_2SiO_3). Les silicates peuvent également être sous la forme de dérivés, par exemple K_2SiO_4 , Na_2SiO_4 , Mg_2SiO_4 .

- [0035] De préférence, le silicium est sous la forme d'un sel soluble, de préférence sous la forme de silicate de sodium (Na_2SiO_3), de silicate de potassium (K_2SiO_3), de métasilicate de magnésium (MgSiO_3) ou d'un mélange de sels solubles. Encore plus préférentiellement, le silicium est sous la forme d'un sel soluble choisi parmi le silicate de sodium (Na_2SiO_3), le silicate de potassium (K_2SiO_3), et leur mélange. Par exemple, le silicate de potassium commercialisé par la société Quaron, appelé « Silicate de potassium liquide 34,8% », est particulièrement adapté à la mise en œuvre de l'invention.
- [0036] Le terme « matière fertilisante » désigne une substance, ou un mélange de substances, naturelle ou d'origine synthétique, utilisée en agriculture, en horticulture et sylviculture, pour améliorer les sols, notamment leur structure, et fertiliser les plantes cultivées. Les matières fertilisantes comprennent les engrais et les amendements.
- [0037] Le terme « pesticide » désigne une substance utilisée contre un ou plusieurs organismes considérés comme nuisibles pour la plante, appelés pathogènes. Ce terme rassemble notamment les insecticides, les fongicides, les herbicides, les parasiticides.
- [0038] Dans le cadre de la présente invention, on entend désigner par l'expression « plante », la plante considérée dans son ensemble, incluant son appareil racinaire, son appareil végétatif, les graines, les semences et les fruits.
- [0039] La présente invention découle des avantages surprenants mis en évidence par les inventeurs de l'effet de la composition phytosanitaire selon l'invention sur une plante, pour activer des réactions de défense de la plante et de résistance contre des contraintes biotiques.
- [0040] Ainsi, l'invention concerne une composition phytosanitaire comprenant
- (i) des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes, par exemple sous la forme d'un extrait contenant des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes ;
- et

(ii) du silicium.

[0041] La composition selon la présente invention peut être sous forme de poudre, de granule ou sous forme liquide, avantageusement sous forme liquide. La préparation d'une telle composition pourra être réalisée par l'homme du métier en utilisant ses connaissances générales. Par exemple, les ulvanes et/ou les oligosaccharides dérivés d'ulvanes, par exemple sous la forme d'un extrait contenant des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes, peuvent se présenter sous forme de poudre ou sous forme liquide et peuvent être mélangés à une solution de sel(s) soluble(s) ou de silicium pour former une composition liquide selon l'invention. Un mode de préparation particulier de la composition selon l'invention est détaillé dans les exemples.

[0042] Selon un mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention est sous forme liquide et comprend :

- une concentration en ulvanes et/ou en oligosaccharides dérivés d'ulvanes de 0,01 à 100 g/L, préférentiellement de 0,1 g/L à 50 g/L, encore plus préférentiellement de 1 g/L à 20 g/L, par exemple de 8 g/L à 14 g/L, et

- une concentration en silicium de 0,01 g/L à 100 g/L, en particulier sous la forme d'un sel soluble de silicium ou sous la forme d'un mélange de sels solubles de silicium, préférentiellement de 0,1 g/L à 50 g/L, encore plus préférentiellement de 1,0 g/L à 30 g/L, de 10 g/L à 30 g/L, de 20 g/L à 30 g/L, de 5 à 10 g/L, de 5 à 8 g/L, par exemple environ 21 g/L +/- 1 g/L ou 6 g/L +/- 1 g/L.

[0043] Selon un autre mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention est sous forme liquide et comprend :

- de 10 à 90 % (v/v total de la composition) d'un extrait contenant des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes, préférentiellement de 40 à 90 %, par exemple de 40 à 80 %, de 70 à 90 % de 70 à 80 %, ledit extrait ayant une concentration en ulvanes et/ou en oligosaccharides dérivés d'ulvanes d'au moins 1 g/L, de préférence au moins 10 g/L, au moins 11 g/L, au moins 12 g/L, au moins 13 g/L, au moins 14 g/L, au moins 15 g/L, au moins 16 g/L, au moins 17 g/L, au moins 18 g/L, au moins 19 g/L, par exemple entre 1 et 200 g/L, de préférence entre 10 et 100 g/L, plus préférentiellement entre 15 et 50 g/L, par exemple environ 20,0 g/L, ,

- de 1 à 25 % (v/v total de la composition) d'une solution de silicium, en particulier d'une solution de sel soluble de silicium ou d'un mélange de sels solubles de silicium, préférentiellement de 1 à 10%, par exemple de 1 à 5 %, ladite solution de silicium ayant une concentration en silicium allant de 0,1 à 500 g/L, préférentiellement de 1 à 500 g/L, encore plus préférentiellement de 10 g/L à 300 g/L, de 100 g/L à 300 g/L, de 200 g/L à 300 g/L, par exemple environ 240 g/L +/- 10 g/L, et éventuellement
- de l'eau.

[0044] Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la composition est sous forme

liquide et comprend :

- 40 % (v/v total de la composition) d'un extrait contenant des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes, ledit extrait ayant une concentration en ulvanes et/ou en oligosaccharides dérivés d'ulvanes allant de 8 à 14 g/L,
- 9 % (v/v total de la composition) d'une solution de silicium, en particulier d'une solution de sel soluble de silicium ou d'un mélange de sels solubles de silicium, ladite solution de silicium ayant une concentration en silicium d'environ 240 g/L, et
- 51 % d'eau.

[0045] Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, la composition est sous forme liquide et comprend :

- de 70 à 80 % (v/v total de la composition) d'un extrait contenant des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes, ledit extrait ayant une concentration en ulvanes et/ou en oligosaccharides dérivés d'ulvanes allant de 8 à 14 g/L,
- de 2 à 3 % (v/v total de la composition) d'une solution de silicium, en particulier d'une solution de sel soluble de silicium ou d'un mélange de sels solubles de silicium, ladite solution de silicium ayant une concentration en silicium d'environ 240 g/L, et
- de 17 à 28 à % d'eau.

[0046] En outre, la composition selon l'invention peut comprendre une ou plusieurs matières fertilisantes, pouvant être de natures variées tel que l'urée, le sulfate d'ammonium, le phosphate naturel, le chlorure de potassium, le sulfate d'ammonium, le nitrate de magnésium, le nitrate de manganèse, le nitrate de zinc, le nitrate de cuivre, l'acide phosphorique, et/ou l'acide borique.

[0047] En outre, la composition selon l'invention peut comprendre un ou plusieurs pesticides, pouvant être de natures variées. Le ou les pesticide(s) peut/peuvent être choisi(s) parmi les insecticides, fongicides, herbicides, parasiticides. En particulier, la composition selon l'invention peut comprendre un ou plusieurs fongicide(s). Les fongicides qui conviennent à la mise en œuvre de l'invention sont par exemple référencés dans le catalogue de produits phytopharmaceutiques « e-phy » de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) ou encore dans le catalogue « liste de EPPO A1 et « liste de EPPO A2 » de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (EPPO). De préférence, la composition selon l'invention peut comprendre un ou plusieurs fongicide(s) choisi(s) parmi le chlorothalonil, le fluxapyroxad, l'époxiconazole, le captan, le dithlanon, le fenbuconazole, le pyradostrobine, le dodine, le prothioconazole, le metconazole, le propiconazole, le cyproconazole, le tebuconazole, le bromuconazole, le difenoconazole, le propiconazole, le tetraconazole, l'azoxystrobin, le picoxystrobin, le pyraclostrobin, le picoxystrobin, le trifloxystrobin, le dimoxystrobin, le fluoxastrobin maneb, le mancozeb, le penthiopyrad, le bixafen, le prochloraz, le benzo-

vindiflupyr, le boscalid, le fenpropidin, le fluopyram, le spiroxamine, le flutriafol, le folpet, le fenpropimorph, le metrafenone, le sulphur et/ou le laminarin. L'Homme du métier saura choisir le ou les pesticide(s) le/les plus adapté(s) à la plante à traiter.

- [0048] L'association de la composition selon l'invention avec un pesticide est particulièrement avantageuse car elle permet de diminuer les doses (ou quantités) de pesticide normalement utilisées en agriculture. Une dose de pesticide normalement utilisée correspond par exemple à une dose homologuée pour un pesticide considéré. L'association de la composition selon l'invention avec un pesticide peut permettre de diminuer de moitié (50%) la dose de pesticide normalement utilisée. Cela permet de réduire l'impact des produits phytosanitaires sur l'environnement, ce qui constitue un avantage écologique et économique.
- [0049] L'invention concerne également l'utilisation de la composition phytosanitaire décrite ci-dessus pour activer des réactions de défense d'une plante et de résistance contre des contraintes biotiques.
- [0050] En particulier, l'invention concerne l'utilisation de la composition phytosanitaire décrite ci-dessus pour stimuler l'expression des gènes impliqués dans la défense d'une plante. Par exemple, la composition phytosanitaire selon l'invention permet de stimuler l'expression par la plante de gènes codant :
- pour des enzymes de défense, telles que des hydrolases, des chitinases ;
 - pour des protéines dites PR ;
 - pour des enzymes de biosynthèse des métabolites de défense, telles que des phytoalexines ;
 - pour des protéines impliquées dans le renforcement pariétal ;
 - pour stimuler la production d'acide salicylique et/ou de ses dérivés ; et/ou
 - pour stimuler la production d'acide jasmonique et/ou de ses dérivés.
- [0051] Avantageusement, la composition phytosanitaire de l'invention permet de stimuler l'expression par la plante de gènes codant pour l'acide salicylique et ses dérivés et/ou l'acide jasmonique et ses dérivés. En particulier, la composition phytosanitaire décrite ci-dessus permet de stimuler l'expression des gènes ICS1, EDS1 (Disease resistance protein EDS1), WRKY (WRKY transcription factor 30), PR-1 et PR-3, ce qui induit la production d'acide salicylique et/ou de ses dérivés. En particulier, la composition phytosanitaire décrite ci-dessus permet également de stimuler l'expression des gènes LOX2 (Lipoxygenase); JAR (Jasmonate resistant) ce qui induit la produit d'acide jasmonique et/ou de ses dérivés.
- [0052] L'invention vise également un procédé pour activer les réactions de défense d'une plante et de résistance contre des contraintes biotiques, caractérisé en ce qu'il comprend l'application à ladite plante d'une quantité efficace de la composition phytosanitaire selon l'invention.

- [0053] Par « quantité efficace » ou « dose efficace » on entend une quantité suffisante pour activer des réactions de défense d'une plante et de résistance, notamment en stimulant l'expression des gènes impliqués dans la défense de la plante, contre des contraintes biotiques d'au moins 5%, avantageusement d'au moins 10%, par exemple d'au moins 15%, au moins 20%, au moins 25%, au moins 30%, au moins 35%, au moins 40%, avantageusement d'au moins 30%. Ainsi, dans un mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention est apportée à la plante dans une quantité suffisante pour activer des réactions de défense d'une plante et de résistance contre des contraintes biotiques, notamment en stimulant l'expression des gènes impliqués dans la défense de la plante, d'au moins 5%, avantageusement d'au moins 10%, par exemple d'au moins 15%, au moins 20%, au moins 25%, au moins 30%, au moins 35%, au moins 40%, avantageusement d'au moins 30%.
- [0054] Dans le cadre de l'utilisation ou du procédé selon l'invention, la composition peut être apportée à la plante par voie foliaire ou par voie racinaire, de préférence par voie foliaire.
- [0055] Dans un mode de réalisation de l'utilisation selon l'invention, la composition selon l'invention est apportée à la plante en combinaison avec un ou plusieurs pesticides, préférentiellement un ou plusieurs fongicides. Les fongicides qui conviennent à la mise en œuvre de l'invention sont par exemple référencés dans le catalogue de produits phytopharmaceutiques « e-phy » de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) ou encore dans le catalogue « liste de EPPO A1 et « liste de EPPO A2 » de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (EPPO). En particulier dans un mode de réalisation de l'utilisation, la composition selon l'invention est apportée à la plante en combinaison avec un ou plusieurs fongicides, choisis parmi le chlorothalonil, le fluxapyroxad, l'époxiconazole, le captan, le dithlanon, le fenbuconazole, le pyraclostrobine, le dodine, le prothioconazole, le metconazole, le propiconazole, le cyproconazole, le tebuconazole, le bromuconazole, le difenoconazole, le propiconazole, le tetraconazole, l'azoxystrobin, le picoxystrobin, le pyraclostrobin, le picoxystrobin, le trifloxystrobin, le dimoxystrobin, le fluoxastrobin maneb, le mancozeb, le pen-thiopyrad, le bixafen, le prochloraz, le benzovindiflupyr, le boscalid, le fenpropidin, le fluopyram, le spiroxamine, le flutriafol, le folpet, le fenpropimorph, le metrafenone, le sulphur et/ou le laminarin. L'Homme du métier saura choisir le ou les pesticide(s) le/les plus adapté(s) à la plante à traiter.
- [0056] Le procédé de l'invention peut comprendre en outre l'application à ladite plante d'un ou plusieurs pesticides, préférentiellement d'un ou plusieurs fongicides. Les fongicides qui conviennent à la mise en œuvre de l'invention sont par exemple référencés dans le catalogue de produits phytopharmaceutiques « e-phy » de l'agence nationale de

sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (anes) ou encore dans le catalogue « liste de EPPO A1 et « liste de EPPO A2 » de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (EPPO). En particulier dans un mode de réalisation du procédé, la composition selon l'invention est apportée à la plante en combinaison avec un ou plusieurs fongicides, par exemple choisi parmi le chlorothalonil, le fluxapyroxad, l'époxiconazole, le captan, le dithlanon, le fenbuconazole, le pyradostrobine, le dodine, le prothioconazole, le metconazole, le propiconazole, le cyproconazole, le tebuconazole, le bromuconazole, le difenoconazole, le propiconazole, le tetraconazole, l'azoxystrobin, le picoxystrobin, le pyraclostrobin, le picoxystrobin, le trifloxystrobin, le dimoxystrobin, le fluoxastrobin maneb, le mancozeb, le penthiopyrad, le bixafen, le prochloraz, le benzovindiflupyr, le boscalid, le fenpropidin, le fluopyram, le spiroxamine, le flutriafol, le folpet, le fenpropimorph, le metrafenone, le sulphur et/ou le laminarin. En d'autres termes, la composition selon l'invention est en outre appliquée à la plante en combinaison avec un ou plusieurs pesticides, préférentiellement un ou plusieurs fongicides. L'Homme du métier saura choisir le ou les pesticide(s) le/les plus adapté(s) à la plante à traiter.

[0057] La composition selon l'invention et le ou les pesticides peuvent être appliqués simultanément ou séquentiellement. Par exemple, la composition selon l'invention peut être appliquée lors d'un premier traitement, et un ou plusieurs pesticides peuvent être appliqués lors d'un second traitement de la plante. Plusieurs traitements successifs de la plante peuvent ainsi être réalisés. Généralement, l'homme du métier adapte le nombre de traitements et la nature du traitement en fonction de la variété de la plante, du type de pesticide, de la nature de la contrainte biotique, etc.

[0058] Lors de la mise en œuvre du procédé selon l'invention, la quantité (ou dose) de pesticide appliquée à la plante peut correspondre à une quantité normalement utilisée en agriculture (quantité homologuée) ou à une quantité réduite. Avantageusement, la dose de pesticide est une quantité réduite, par exemple réduite de 50% par rapport à une quantité normalement utilisée en agriculture.

[0059] L'utilisation selon l'invention et le procédé selon l'invention trouvent application dans le traitement d'une très grande variété de plantes. Parmi celles-ci, on citera en particulier :

- les plantes de grande culture telles que les céréales (blé, maïs, orge),
- les protéagineux (pois),
- les oléagineux (soja, tournesol),
- les cultures de Solanacées (pomme de terre),
- les cultures d'Amaranthaceae (betterave),
- les cultures spécialisées telles qu'en particulier le maraîchage (laitue, épinard, oignon, échalote, tomate, melon), la vigne, l'arboriculture (poire, pomme, nectarine),

ou l'horticulture.

[0060] La plante peut également appartenir à l'ordre des monocotylédones, de préférence à la famille des poacées. Les poacées, communément appelés les graminées, renferment notamment la plupart des espèces appelées communément « herbes » et « céréales ». Les céréales sont largement cultivées, principalement pour leurs grains, et sont utilisées dans l'alimentation humaine et animale. Avantagement, la plante est une poacée, de préférence choisie parmi le blé, le riz, l'orge, l'avoine, le seigle, la canne à sucre, la prairie ou le maïs, de préférence le blé.

[0061] Dans le cadre de la présente utilisation et du présent procédé, la composition selon l'invention peut être apportée à la plante sous forme liquide dans des solutions foliaires en une quantité allant de 0,001 à 100 L/ha, préférentiellement de 0,01 à 25 L/ha, encore plus préférentiellement de 0,1 à 10 L/ha, par exemple en une quantité 1 L/ha. En pratique, l'agriculteur utilise généralement 1 L d'une solution mère qui correspond à la composition selon l'invention qu'il dilue, par exemple dans de l'eau entre 1/10^{ème} et 1/1000^{ème}, de façon à obtenir une solution fille qui est ensuite pulvérisée sur les plantes à traiter selon les quantités définies ci-dessus (i.e. de 0,001 à 100 L/ha de solution mère).

[0062] Dans un mode de réalisation tout à fait particulier, l'invention concerne l'utilisation de la composition phytosanitaire selon l'invention pour activer des réactions de défense d'une plante (ex. le blé ou le pommier) et de résistance contre la septoriose et/ou la tavelure du pommier.

[0063] La présente invention sera maintenant illustrée par les exemples non limitatifs suivants. Dans ces exemples, et sauf indication contraire, les pourcentages sont exprimés en poids et la température est la température ambiante.

Exemples

[0064] **Exemple 1 : Procédé de préparation d'une composition selon l'invention**

[0065] A) Procédé de préparation d'un extrait d'ulvanes.

[0066] L'extrait d'ulvanes a été préparé suivant un procédé en 3 étapes :

[0067] Etape 1 : 50 kg d'algues sèches de type *Ulva spp* ont été broyées et passées au travers d'un tamis de 4 mm afin d'obtenir des fragments de taille inférieure ou égale à 4 mm, puis mélangées à 950 kg d'eau chauffée à 85°C. Le mélange a été maintenu à une température de 85°C pendant 3 heures sous agitation ce qui a permis d'extraire les ulvanes.

[0068] Etape 2 : le mélange obtenu à l'étape 1 a été filtré à l'aide d'un filtre de 50 µm.

[0069] Etape 3 : le mélange filtré a ensuite été acidifié à pH 3,5 à l'aide d'une solution concentrée d'acide sulfurique. Ce mélange correspond à l'extrait d'ulvanes utilisé dans les exemples, et qui est notamment utilisé pour la préparation de la composition « ND » (composition selon l'invention - Exemple 1C).

[0070] B) Procédé de préparation d'une solution de silicium

[0071] Une solution de silicium sous forme de silicate de potassium, commercialisée par la société « QUARON » sous le nom de « Silicate de potassium liquide 34,8% » a été utilisée. Cette solution contient 24 % w/w de SiO₂ (24 % w/w, c'est-à-dire 240 g/L, de silicium) et 11 % w/w de K₂O.

[0072] C) Procédé de préparation d'une composition phytosanitaire selon l'invention, ci-après appelée composition « ND »

[0073] La composition ND (composition selon l'invention) a été préparée en mélangeant l'extrait obtenu selon le procédé décrit à l'Exemple 1A avec de l'eau, en ajustant le pH du mélange à 12, et en ajoutant lentement la solution de silicium obtenue à l'Exemple 1B sous forte agitation, selon les proportions présentées dans le Tableau 1.

[0074] [Tableaux1]

<i>Ingrédient de la composition « ND »</i>	<i>Quantité (en % v/v par rapport au volume total de la composition)</i>
<i>Extrait d'ulvanes obtenu à l'Exemple 1A</i>	40%
<i>Solution de silicium (Silicate de potassium (SiO₂, K₂O)) obtenu à l'Exemple 1B</i>	9%
<i>Eau</i>	51%

[0075] La composition « ND » comprend 8 g/L d'ulvanes et 21,6 g/L de silicium.

[0076] **Exemple 2 : Mise en évidence des effets de la composition ND sur le contrôle du développement de la septoriose sur le blé**

[0077] A) Protocole expérimental

[0078] L'essai a été réalisé en plein champ de façon à évaluer l'efficacité de la composition ND (obtenue à l'Exemple 1) contre la septoriose du blé. La variété de blé CAPO (*Triticum aestivum*) qui est un blé tendre d'hiver présentant une sensibilité à la septoriose a été choisie. Le pathogène impliqué dans la maladie de septoriose, une maladie fongique, est *Septoria tritici*.

[0079] Les blés ont été semés à 2 cm de profondeur et à une densité de semis de 230 plants/m². Le dispositif expérimental a été réalisé selon un plan en bloc de Fisher à quatre répétitions totalement aléatoires dans le champ. Le blé, cultivé en plein champs a été infesté naturellement par la septoriose. Le *septoria tritici* se propage généralement dans les cultures de blé grâce à l'humidité ambiante ou la pluie. Les spores se disséminent vers les feuilles supérieures de la base vers le haut de la plante.

[0080] Pour cet essai, trois traitements foliaires ont été testés :

- un témoin négatif, qui n'a subi aucun traitement (Témoin non-traité, Témoin NT),
- un programme appelé « Composition ND 50% », qui a consisté en l'application de

la composition ND à un temps T_1 à une dose de 0,5 L/ha, puis en une seconde application de la composition ND à un temps T_2 à la même quantité que la dose appliquée à T_1 ,

- un programme appelé « Composition ND 100% », qui a consisté en l'application de la composition ND à un temps T_1 à une dose de 1 L/ha, puis en une seconde application de la composition ND à un temps T_2 à la même dose que la dose appliquée à T_1 .

[0081] Les trois traitements sont résumés dans le tableau 2 ci-dessous :

[0082] [Tableaux2]

	Temps T_1 (Stade 31, appelé BBCH31)	Temps T_2 (Stade 39, appelé BBCH39)
Témoin négatif	Aucun traitement	Aucun traitement
Programme « Composition ND 50 % »	0,5 L/ha	0,5 L/ha
Programme « Composition ND 100% »	1 L/ha	1 L/ha

[0083] La composition ND a été appliquée une fois au stade du premier nœud, c'est-à-dire au stade connu sous le nom de « stade 31 », correspondant à l'élongation de la tige principale (stade phénologique BBCH31, à savoir le premier nœud est au plus à 1 cm au-dessus du plateau de tallage), puis une fois au stade phénologique BBCH39 (à ce stade, le limbe de la dernière feuille est entièrement étalé, la ligule est visible).

[0084] 25 échantillons de blé ont été observés pour chacun des trois types de traitement. La septoriose est une maladie foliaire dont les symptômes caractéristiques sont des tâches marron dans lesquelles il est observé des points noirs, appelés « pycnides ». La présence de la septoriose sur les échantillons a été observée en analysant la présence de tâches et/ou points noirs sur les feuilles F0 et les feuilles F1 au stade de développement du blé connu sous le nom de « stade 75 » correspondant au stade mi-laiteux (contenu de la graine laiteux). En effet, les feuilles F0 et F1 contribuent pour une part très importante au rendement en fin de culture et les traitements phytosanitaires contre la septoriose ont principalement pour objectif de protéger ces deux feuilles de l'apparition et du développement de la septoriose (Figure 1). La sévérité de la septoriose représente le niveau de manifestation des symptômes de la septoriose, tels que la présence de tâches, présence de pycnides, propagation des tâches et des pycnides sur une seule feuille observée. Cette sévérité est prise en compte de façon prépondérante pour

l'évaluation de la présence et du développement de la septoriose. La fréquence représente le nombre d'échantillons infectés par rapport au nombre total d'échantillons observés (ici 25 échantillons). La sévérité a été mesurée selon les standards de l'OEPP (Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes) n°PP 1/26(4) appelés « Maladies des feuilles et des épis, chez les céréales.

[0085] B) Résultats

[0086] Les résultats obtenus sont présentés aux Figures 2A et 2B. Ils montrent qu'en absence de traitement (Témoin NT), la septoriose s'est développée sur le blé. En absence de traitement (Témoin NT), les feuilles F0 et F1 ont été infectées respectivement à 25% et 55% en termes de sévérité, et à 100 % en termes de fréquence.

[0087] Le traitement avec la composition ND 50% a permis de réduire la sévérité de la septoriose sur les feuilles F0 et F1, respectivement à 14% et 33% en terme de sévérité (comparativement aux 25% et 55% observés chez le témoin NT). La fréquence n'a pas été impactée (100% de feuilles infectées) après traitement avec la composition ND 50%.

[0088] Le traitement avec la composition ND 100% a permis de réduire la sévérité de la septoriose sur les feuilles F0 et F1, respectivement à 10,5% et 25,5% en terme de sévérité (comparativement aux 25% et 55% observés chez le témoin NT, et comparativement aux 14% et 33% observés après le traitement « ND 50% »). La fréquence de la septoriose n'a pas été impactée (100% de feuilles infectées) après traitement avec la composition ND 100%.

[0089] Les résultats montrent que la composition ND seule (composition selon l'invention) permet de protéger significativement les plants de blé contre la septoriose du blé.

[0090] **Exemple 3 : Mise en évidence des effets de la composition ND en combinaison avec un fongicide**

[0091] A) Protocole expérimental

[0092] L'essai a été réalisé en plein champ pour évaluer l'efficacité de la composition ND (composition selon l'invention, obtenue à l'Exemple 1) en association avec un fongicide (préparation à base de chlorothalonil). La variété de blé choisie pour conduire cet essai était la variété OREGRAIN, une variété de blé tendre d'hiver (*Triticum aestivum*), qui présente une sensibilité à la septoriose comme expliqué dans l'Exemple 2.

[0093] Les blés ont été semés à 2 cm de profondeur et à une densité de semis de 250 plants/m². Le dispositif expérimental dans la parcelle a été réalisé selon un plan en blocs de Fisher à quatre répétitions totalement aléatoires dans le champ. Le blé, cultivé en plein champs, a été infesté naturellement par la septoriose.

[0094] Pour cet essai, cinq traitement foliaires ont été testés :

- un témoin négatif, qui a consisté en l'application d'aucun traitement (Témoin NT) ;

- un programme appelé « Fongicide classique » ou « Pr. Fongi. » (témoin positif), qui correspond à un programme communément mis en œuvre par l'homme de métier, qui a consisté en l'application d'un premier traitement fongicide (chlorothalonil à sa dose homologuée, soit 500 g/ha) à un temps T_1 , et en l'application d'un second traitement fongicide (combinaison d'époxiconazole et de fluxapyroxad à leurs doses homologuées, soit 62,5 g/ha chacun) à un temps T_2 ;
- un programme appelé « Fongicide allégé » ou « Pr. Fongi. al. » (témoin de vraisemblance) qui a consisté en l'application de chlorothalonil à 250 g/ha à un temps T_1 , et en l'application d'un deuxième traitement fongicide (combinaison d'époxiconazole et de fluxapyroxad à la moitié de leurs doses homologuées, soit 31,25 g/ha chacun) à un temps T_2 ;
- un programme appelé « Composition ND 50% + Pr. Fongi. al. », qui a consisté en une première application de 0,5 L/ha de la composition ND (composition obtenue à l'Exemple 1) en association avec du chlorothalonil à la moitié de sa dose homologuée, soit 250 g/ha, à un temps T_1 , et en une deuxième application d'un traitement fongicide (combinaison d'époxiconazole et de fluxapyroxad à la moitié de leurs doses homologuées, soit 31,25 g/ha chacun) à un temps T_2 ;
- un programme appelé « Composition ND 100% + Pr. Fongi. al. », qui a consisté en une première application de 1 L/ha de la composition ND (composition obtenue à l'Exemple 1) en association avec du chlorothalonil à la moitié de sa dose homologuée, soit 250 g/ha, à un temps T_1 , et en une deuxième application d'un traitement fongicide (combinaison d'époxiconazole et de fluxapyroxad à la moitié de leurs doses homologuées, soit 31,25 g/ha chacun) à un temps T_2 .

[0095] Le temps T_1 correspond au stade 31, i.e. le stade du premier nœud, correspondant à l'élongation de la tige principale (stade phénologique BBCH31, à savoir le premier nœud est au plus à 1 cm au-dessus du plateau de tallage), et le temps T_2 correspond au stade 33, appelé BBCH33, correspondant à une élongation de la tige principale supérieure à 2 cm au-dessus du deuxième nœud.

[0096] Les cinq types de traitements sont résumés dans le tableau 3 ci-dessous :

[0097]

[Tableaux3]

Programme	Temps T ₁ (Stade 31, appelé BBCH31)	Temps T ₂ (Stade 33, appelé BBCH33)
Témoin négatif	Aucun traitement	Aucun traitement
Pr. Fongi.	500 g/ha de Chlorothalonil	62,5 g/ha d'Epoxiconazole + 62,5 g/ha de Fluxapyroxad
Pr. Fongi. al.	250 g/ha de Chlorothalonil	31,25 g/ha d'Epoxiconazole + 31,25 g/ha de Fluxapyroxad
Composition ND 50% + Pr. Fongi. al.	0,5 L/ha de la composition ND + 250 g/ha Chlorothalonil	31,25 g/ha d'Epoxiconazole + 31,25 g/ha de Fluxapyroxad
Composition ND 100% + Pr. Fongi. al.	1 L/ha de la composition ND + 250 g/ha Chlorothalonil	31,25 g/ha d'Epoxiconazole + 31,25 g/ha de Fluxapyroxad

- [0098] 25 échantillons de blé ont été observés pour chaque type de traitement. La présence de la septoriose sur les échantillons a été observée en observant la fréquence et la sévérité de la septoriose (cf. Exemple 2) sur les feuilles F0 et F1 au stade connu sous le nom de stade 75, correspondant au stade mi-laiteux (contenu de la graine laiteux).
- [0099] B) Résultats
- [0100] Les résultats obtenus sont présentés aux Figures 3A et 3B.
- [0101] Ils montrent qu'en absence de traitement (Témoin NT), la septoriose s'est développée sur le blé. En absence de traitement (Témoin NT), les feuilles F0 et F1 ont été infectées respectivement à 25% et 55% en terme de sévérité, et à 100 % en terme de fréquence pour les feuilles F0 et F1.
- [0102] Le traitement avec le Pr. Fongi. (Témoin positif) a permis de réduire la sévérité de la septoriose sur les feuilles F0 et F1, respectivement à 3% et 5% en terme de sévérité (comparativement aux 25% et 55% observés chez le témoin NT). La fréquence de la septoriose a également été réduite à 55% et 82% respectivement pour les feuilles F0 et F1, comparativement aux 100 % de fréquence observés avec le témoin NT.
- [0103] Le traitement avec le Pr. Fongi. al. (Témoin de vraisemblance) a permis de réduire la sévérité de la septoriose sur les feuilles F0 et F1, respectivement à 4,5% et 12,5% en terme de sévérité (comparativement aux 25% et 55% observées chez le témoin non-traité). La fréquence de la septoriose a été réduite à 90% pour la seule feuille F0, comparativement aux 100 % de fréquence observés chez le témoin non-traité. La fréquence de la septoriose sur la feuille F1 est restée inchangée (100%).
- [0104] L'application de la composition ND à 0,5 L/ha, en association avec le Pr. Fongi. al. a

permis de réduire la sévérité de la septoriose sur les feuilles F0 et F1, respectivement à 3,5% et 9,5% en terme de sévérité (comparativement aux 25% et 55% observées chez le témoin non-traité, et aux 4,5% et 12,5% observées suite au Pr. Fongi. al.). Cette association a également permis de réduire la fréquence de la septoriose sur la feuille F0 à 80% (comparativement au 100% observé avec le Témoin NT et au 90% observé suite au traitement Pr. Fongi. al.). La fréquence de la septoriose sur la feuille F1 est restée inchangée (100%).

[0105] Enfin, l'application de la composition ND à 1 L/ha, en association avec le Pr. Fongi. al. a permis de réduire davantage la sévérité de la septoriose sur les feuilles F0 et sur la F1, respectivement à 2,5% et 7,5% en termes de sévérité (comparativement aux 25% et 55% observées chez le témoin non-traité, et aux 4,5% et 12,5% observées suite au traitement Pr. Fongi. al.). Cette association a également permis de réduire davantage la fréquence de la septoriose sur la feuille F0 à 75% (comparativement au 100% observé avec le témoin NT et au 90% observé suite au traitement Pr. Fongi. al.). La fréquence de la septoriose sur la feuille F1 est restée inchangée (100%).

[0106] Il peut donc être conclu que la composition ND, lorsqu'elle est associée à un fongicide (Pr. Fongi. al.), confère aux plants de blé traités une meilleure protection contre la septoriose du blé que le fongicide seul. La composition ND a permis de potentialiser l'effet phytosanitaire du fongicide.

[0107] **Exemple 4 : Mise en évidence des effets d'une composition selon l'invention en comparaison avec un extrait d'ulvanes ou une solution de silicium appliqués individuellement**

[0108] A) Protocole expérimental

[0109] L'essai a été réalisé en plein champ pour évaluer l'efficacité d'une composition selon l'invention (ND) en comparaison avec un extrait d'ulvanes à une concentration de 8 g/L seul ou d'une solution de silicium seule (SiO_2 K_2O) à une concentration de 21,6 g/L. La variété de blé choisie pour conduire cet essai était la variété OREGRAIN, une variété de blé tendre d'hiver (*Triticum aestivum*), qui présente une sensibilité à la septoriose.

[0110] Les blés ont été semés à 2 cm de profondeur et à une densité de semis de 250 plants/m². Le dispositif expérimental dans la parcelle a été réalisé selon un plan en blocs de Fisher à quatre répétitions totalement aléatoires dans le champ. Le blé, cultivé en plein champs a infesté naturellement par la septoriose.

[0111] Pour cet essai, six traitements ont été testés en application foliaire :

- un témoin négatif, qui a consisté en l'application d'aucun traitement (Témoin NT) ;
- un programme appelé « Fongicide classique » ou « Pr. Fongi. » (témoin positif qui correspond à un traitement communément mis en œuvre par l'homme du métier) qui a consisté en une première application d'un fongicide, le chlorothalonil, à sa dose ho-

mologuée, soit 500 g/ha, à un instant T_1 , et en une deuxième application de chlorothalonil à 500 g/ha également à un temps T_2 ;

- un programme appelé « Fongicide allégé » ou « Pr. Fongi. al. » (témoin de vraisemblance) qui a consisté en une première application de chlorothalonil à la moitié de sa dose homologuée, soit 250 g/ha, à un instant T_1 , et en une deuxième application de chlorothalonil à 250 g/ha également à un temps T_2 ;

- un programme appelé « Composition ND + Pr. Fongi. al. », qui a consisté en une première application d'une dose de la composition ND à 1 L/ha en association avec du chlorothalonil à la moitié de sa dose homologuée, soit 250g/ha, à un temps T_1 , et en une deuxième application d'une dose de la composition ND à 1 L/ha en association avec du chlorothalonil à la moitié de sa dose homologuée, soit 250g/ha, à un temps T_2 ;

- un programme appelé « Composition Ulvanes 8 g/L+ Pr. Fongi. Al. », qui a consisté en une première application d'une dose de 1 L/ha de l'extrait d'ulvanes à une concentration de 8 g/L (c'est-à-dire la composition ND sans le silicium) en association avec du chlorothalonil à la moitié de sa dose homologuée, soit 250 g/ha, à un temps T_1 , et en une deuxième application d'une dose de 1 L/ha de l'extrait d'ulvanes à une concentration de 8 g/L en association avec du chlorothalonil à la moitié de sa dose homologuée, soit 250 g/ha, à un temps T_2 ;et

- un programme appelé « composition Silicium 21,6 g/L + Pr. Fongi. Al. », qui a consisté en une première application d'une dose de 1 L/ha de la solution de $\text{SiO}_2 \text{ K}_2\text{O}$ à une concentration de 21,6 g/L de silicium (c'est-à-dire la composition ND sans l'extrait d'ulvanes) en association avec du chlorothalonil à la moitié de sa dose homologuée, soit 250 g/ha, à un temps T_1 , et en une deuxième application d'une dose de 1 L/ha de la solution de $\text{SiO}_2 \text{ K}_2\text{O}$ à une concentration de 21,6 g/L de silicium en association avec du chlorothalonil à la moitié de sa dose homologuée, soit 250g/ha, à un temps T_2 .

[0112] Le temps T_1 correspond au stade 31, i.e. le stade du premier nœud, correspondant à l'élongation de la tige principale (stade phénologique BBCH31, à savoir le premier nœud est au plus à 1 cm au-dessus du plateau de tallage), et le temps T_2 correspond au stade 33, appelé BBCH33, correspondant à une élongation de la tige principale supérieure à 2 cm au-dessus du deuxième nœud. Les six traitements sont résumés dans le Tableau 4.

[0113]

[Tableaux4]

	Temps T ₁ (Stade 31, appelé BBCH31)	Temps T ₂ (Stade 33, appelé BBCH33)
Témoin négatif	Aucun traitement	Aucun traitement
« Pr. Fongi. »	500 g/ha de Chlorothalonil	62,5 g/ha d'Epoxiconazole + 62,5 g/ha de Fluxapyroxad
« Pr. Fongi. al. »	250 g/ha de Chlorothalonil	31,25 g/ha d'Epoxiconazole + 31,25 g/ha de Fluxapyroxad
Composition « ND + Pr. Fongi. al. »	1 L/ha de la composition ND + 250 g/ha Chlorothalonil	31,25 g/ha d'Epoxiconazole + 31,25 g/ha de Fluxapyroxad
Composition « Ulvanes 8 g/L + Pr. Fongi. al »	1 L/ha de l'extrait d'ulvanes + 250 g/ha Chlorothalonil	1 L/ha de l'extrait d'ulvanes + 250 g/ha Chlorothalonil
Composition « Silicium 21,6 g/L + Pr. Fongi. al. »	1 L/ha de la solution de silicium + 250 g/ha Chlorothalonil	1 L/ha de la solution de silicium + 250 g/ha Chlorothalonil

[0114] Les traitements ont été appliqués une fois (T₁) au stade du premier nœud, c'est-à-dire le stade connu sous le nom stade 31 correspondant à l'élongation de la tige principale (stade phénologique BBCH31, à savoir le premier nœud est au plus à 1 cm au-dessus du plateau de tallage), puis appliqués à nouveau (T₂) au stade du troisième nœud, stade connu sous le nom de BBCH33, correspondant à une élongation de la tige principale supérieure à 2 cm au-dessus du deuxième nœud.

[0115] 25 échantillons de blé ont été observés pour chaque type de traitement. La présence de la septoriose sur les échantillons a été observée en observant la fréquence et la sévérité de la septoriose (cf. exemple 2) sur la feuille F0 au stade connu sous le nom stade 85 correspondant à la maturation des graines, plus particulièrement le stade pâteux mou, au moment duquel le contenu de la graine est tendre et sec (stade BBCH85).

[0116] B) Résultats

[0117] Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 4.

[0118] Ils montrent qu'en l'absence de traitement (Témoin NT), la septoriose s'est développée sur du blé qui a été cultivé en plein champ. La feuille F0 a été infectée (70% en termes de sévérité ; 100% en termes de fréquence).

- [0119] Le Programme fongicide (Pr. Fongi.) a réduit la sévérité de la septoriose sur la feuille F0 des plants observés en termes de sévérité (40%) mais pas la fréquence de la maladie (100%).
- [0120] Le Programme fongicide allégé (Pr Fongi al.) a permis de réduire la septoriose sur la feuille F0 des plants observés en termes de sévérité, dans une mesure inférieure au Pr. Fongi (50% au lieu de 40% avec le Pr. Fongi.) mais pas la fréquence de la maladie (100%).
- [0121] Pour la composition ND appliqué en association dans un Pr. Fongi. al., il a été observé que la feuille F0 a été moins infectée que la feuille F0 des plants témoins (40%). La feuille F0 a également été mieux protégées que celle traitées avec le programme fongicide allégé et a présenté un niveau de protection vis-à-vis de la septoriose proche de celui obtenu avec le Pr. Fongi.
- [0122] Enfin, les traitements avec l'extrait d'ulvanes et avec la solution de silicium, ont fourni un niveau de protection inférieur à la composition ND. En effet, on observe qu'avec le traitement « Ulvanes 8 g/L + Pr. Fongi. al » ou « Silicium 21,6 g/L + Pr. Fongi. al. », la sévérité était de 47% et 52% respectivement, en comparaison avec 50% pour le programme fongicide allégé. La composition ND a quant à elle permis de diminuer significativement la sévérité (40%).
- [0123] Il peut donc être conclu que la composition ND a une meilleure efficacité, par rapport à l'extrait d'ulvanes seul, à la solution de silicium seule ou même par rapport à un programme fongicide allégé.
- [0124] **Exemple 5 : Etude de l'expression de gènes de défense chez du blé traité après traitement avec la composition ND**
- [0125] A) Protocole expérimental
- [0126] L'étude a été réalisée en serre expérimentale. De jeunes plantules de blé âgées de 28 jours ont été traitées avec les traitements suivants par pulvérisation foliaire au stade de la 3ème feuille étalée (stade BBCH13) :
- la composition ND de l'Exemple 1 diluée au 1/400^{ème} (v/v),
 - la composition ND de l'Exemple 1 diluée au 1/100^{ème} (v/v),
 - un produit commercial appelé Bion® 50 WG, commercialisée par Syngenta, contenant 50% d'acide benzolar-S-méthyl, concentré à 20µg/ml. Le Bion® 50 WG est un stimulateur de défense des plantes (SDP), ci-après « témoin SDP » (témoin positif),
 - de l'eau distillée (témoin négatif).
- [0127] La 3ème feuille étalée a été utilisée pour des analyses d'expression de gènes par RT-PCR quantitative, 48 heures après le traitement.
- [0128] B) Résultats
- [0129] Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 5.
- [0130] Ils montrent que le traitement des feuilles de blé avec la composition selon

l'invention aux dilutions 1/400^{ème} et 1/100^{ème} a activé significativement l'expression des gènes ICS1, PR-1 et PR-3, trois gènes marqueurs de l'induction/activation des mécanismes de défense des plantes, en particulier de la voie d'activation de l'acide salicylique, en comparaison avec le témoin NT. Le témoin SDP (Bion®), témoin positif, présente également une augmentation de l'expression de ces gènes.

[0131] Il peut donc être conclu que la composition ND permet d'activer les réactions de défense d'une plante et de résistance contre des contraintes biotiques.

[0132] **Exemple 6 : Mise en évidence des effets de la composition ND sur le contrôle du développement de la tavelure du pommier (« Apple scab »)**

[0133] A) Protocole expérimental

[0134] Les essais agronomiques d'efficacité sur la tavelure du pommier par contamination naturelle ont été réalisés pendant la phase des contaminations primaires ; sur une période de mars à juin. La tavelure du pommier est causée par un champignon ascomycète nommé *Venturia inaequalis* qui provoque des lésions noires ou brunes à la surface des feuilles du pommier, des bourgeons ou des fruits et parfois même sur le bois. Les fruits et la partie inférieure des feuilles y sont spécialement sensibles. La maladie est favorisée par un climat humide, notamment lorsque les bourgeons se développent (débourrement). La tavelure de pommier peut réduire significativement la qualité et la production des fruits en l'absence de traitement.

[0135] . Des arbres de la variété Golden Delicious (clône Reinders, douzième feuille) greffés sur porte-greffe M9-Emla, variétés très sensibles à la tavelure du pommier ont été utilisés. Pour cet essai, quatre types de traitement en pulvérisation foliaire ont été comparés :

- un programme « Fongicide classique » (appelé « PFI »), qui a consisté en l'application de fongicides en production fruitière intégré (PFI) à 7 temps différents et en alternant les types de fongicides, comme résumé dans le Tableau 5 ci-dessous ;

- un programme appelé « Fongicide allégé » (appelé « PFI allégé »), qui a consisté en l'application de fongicides en production fruitière intégré (PFI) à trois temps différents et en alternant les types de fongicides, comme résumé dans le Tableau 5 ci-dessous,

- un programme appelé « Fongicide allégé + Bion® 50 WG » ou « PFI allégé + Bion® 50 WG », qui a consisté en l'application du produit Bion®50 WG décrit à l'Exemple 5 à neuf temps différents et de fongicides à trois temps différents, comme résumé dans le Tableau 5 ci-dessous, et

- un programme appelé « Fongicide allégé + Composition ND » ou « PFI allégé + Composition ND », qui a consisté en l'application de la composition ND (obtenue à l'Exemple 1) à une dose de 3 L/ha à neuf temps différents et de fongicides à trois temps différents, comme résumé dans le Tableau 5 ci-dessous.

[0136] Les différents temps correspondent à des stades de développement du pommier et

sont mentionnés dans le tableau 5 ci-dessous.

[0137]

[Tableaux5]

	PFI	PFI allégé	PFI allégé + Bion 50 WG® 150g/ha	PFI allégé + Composition ND 3 L/ha
Temps T ₁ BBCH53	1,9 kg/ha de Captan à une concentration de 800 g/kg	1,9 kg/ha de Captan à une concentration de 800 g/kg	1,9 kg/ha de Captan à une concentration de 800 g/kg + Bion 50 WG® à dose 150g/ha	1,9 kg/ha de Captan à 800g/kg + Composition ND 3L/ha
Temps T ₂ BBCH55	Aucun traitement	Aucun traitement	Bion 50 WG® à dose 150g/ha	Composition ND 3L/ha
Temps T ₃ BBCH57	0,5 kg/ha de diathianon à une concentration de 700 g/kg	0,5 kg/ha de diathianon à une concentration de 700 g/kg	0,5 kg/ha de diathianon à une concentration de 700 g/kg + Bion 150g/ha	0,5 kg/ha de diathianon à une concentration de 700 g/kg + Composition ND à la dose de 3 L/ha
Temps T ₄ BBCH59	Aucun traitement	Aucun traitement	Bion 50 WG® à dose 150g/ha	Composition ND à la dose de 3 L/ha
Temps T ₅ BBCH60	Aucun traitement	Aucun traitement	Bion 50 WG® à dose 150g/ha	Composition ND à la dose de 3 L/ha
Temps T ₆ BBCH61	67 g/ha de pyraclostrobine et 267 g/ha de Boscalid	Aucun traitement	Aucun traitement	Aucun traitement
Temps T ₇ BBCH63	1,7 L/ha de dodine à une concentration de 544 g/L	Aucun traitement	Aucun traitement	Aucun traitement

Temps T ₈ BBCH65	Aucun traitement	Aucun traitement	Bion 50 WG® à dose 150g/ha	Composition ND à la dose de 3 L/ha
Temps T ₉ BBCH67	Aucun traitement	Aucun traitement	Bion 50 WG® à dose 150g/ha	Composition ND à la dose de 3 L/ha
Temps T ₁₀ BBCH69	1,9 kg/ha de captan à une concentration de 800 g/kg		Aucun traitement	Aucun traitement
Temps T ₁₁ BBCH71	2 L/ha de Fenbuconazole à une concentration de 25 g/L	2 L/ha de Fenbuconazole à une concentration de 25 g/L	2 L/ha de Fenbuconazole à une concentration de 25 g/L + Bion 50 WG® à dose 150G/ha	2 L/ha de Fenbuconazole à une concentration de 25 g/L + Composition ND à la dose de 3 L/ha
Temps T ₁₂ BBCH73	Aucun traitement	Aucun traitement	Bion 50 WG® à dose 150g/ha	Composition ND à la dose de 3 L/ha
Temps T ₁₃ BBCH75	2 L/ha de captan à une concentration de 800 g/kg	Aucun traitement	Aucun traitement	Aucun traitement
Total	7 traitements fongicides	3 traitements fongicides	3 traitements fongicides et 9 traitements avec le produit Bion 50 WG® 150 g/ha	3 traitements fongicides et 9 traitements avec la composition ND 3 L/ha

[0138] Chaque traitement a été appliqué sur trois micro-parcelles représentées par un plan factoriel de trois blocs de trois micro-parcelles, chaque micro-parcelle étant constituée de cinq rangs comportant treize arbres (soit 195 arbres traités). Les pommes ont ensuite été récoltées en septembre.

[0139] B) Résultats

[0140] Le pourcentage de fruits tavelés a été calculé pour chaque parcelle. Les fruits tavelés se caractérisent par des tâches et peuvent se crevasser.

[0141] Les résultats obtenus sont présentés en Figure 6.

[0142] Ils montrent que le programme fongicide classique PFI a permis une protection optimale de la culture, et s'est traduit par une récolte de pomme très faiblement tavelées, voire complètement dépourvues de tavelure.

[0143] Le programme « PFI allégé » n'a permis qu'une protection partielle du verger, avec plus de 30 % de pommes tavelées au moment de la récolte.

[0144] Le programme « PFI allégé + composition ND » a permis d'obtenir une protection améliorée du verger, par rapport au PFI allégé, avec moins de 20% des pommes qui ont été tavelées au moment de la récolte.

[0145] Enfin, il a été observé que le programme « PFI allégé + composition ND » a apporté un niveau de protection du verger supérieur au programme « PFI allégé + Bion® 50 WG ».

[0146] **Exemple 7 : Mise en évidence des effets de la composition ND sur la qualité de la récolte de pomme**

[0147] A) Protocole expérimental

[0148] 400 pommes (100 pommes par type de traitement : PFI, PFI allégé, PFI allégé + Bion 50 WG et PFI allégé + composition ND), échantillonnées aléatoirement, récoltées suite à l'essai de l'Exemple 6, ont été classées en fonction de leur aspect visuel. En l'absence de tavelure, le fruit a été considéré comme sain. Lorsqu'un fruit présentait une à trois tâches, il a été considéré comme ayant une faible présence de tavelure (appelé fruits faiblement tavelés). Lorsqu'un fruit présentait plus de trois tâches, il a été considéré comme ayant une forte présence de tavelure (appelé fruits sévèrement tavelés).

[0149] B) Résultats

[0150] Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 7.

[0151] Ils montrent que le programme de référence (PFI) a eu une efficacité optimale contre la tavelure du pommier puisque tous les fruits observés étaient sains.

[0152] Le programme « PFI allégé » a montré une altération de la qualité visuelle des pommes avec près de 40% des pommes tavelées dont 10% sévèrement tavelées.

[0153] Le programme « PFI allégé + composition ND » a permis d'obtenir un pourcentage de pommes tavelées réduit à 20% avec moins de 3% de pommes sévèrement tavelées. Ainsi, la composition ND protège efficacement les pommes.

[0154] Enfin, il a été observé que le programme « PFI allégé + composition ND » a apporté un niveau de protection supérieur au programme « PFI allégé + Bion® 50 WG ».

[0155] **Exemple 8 : Mise en évidence des effets de la composition ND sur la stimulation**

des réactions de défense chez le pommier

[0156] A) Protocole expérimental

[0157] De jeunes plants de pommiers de la variété Golden Delicious (6 semaines) cultivés sous serre et présentant des feuilles développées ont été traités par pulvérisation foliaire jusqu'à ruissellement avec :

la composition ND (obtenue à l'Exemple 1) diluée au 1/200^{ème} (v/v),

- la composition ND de l'Exemple 1 diluée au 1/66^{ème} (v/v).

[0158] Les jeunes plants ont été traités deux fois (à J-3 et à J-1) avant le prélèvement des échantillons végétaux.

[0159] Les feuilles traitées ont été échantillonnées 1 jour (J1) et 3 jours (J3) post-traitement. Les échantillons ont été utilisés pour une analyse du niveau d'expression des gènes de défense du pommier (analyse effectuée par RT-PCR quantitative). La liste des gènes du pommier, qui ont été analysés, se trouve dans le Tableau 6, ci-après. Les résultats ont été exprimés en \log_2 de la somme des gènes de défenses induits, après normalisation par rapport à un témoin (témoin : traitement des plantules avec de l'eau). Cette analyse a permis de mesurer précisément l'effet de l'application de la composition ND sur l'expression de plusieurs gènes de défense du pommier, gènes décrits dans la littérature pour activer les réactions de défense des plantes.

[0160]

[Tableaux6]

Classes et sous-classes de défense : Barrières chimiques et/ou physiques	Noms des gènes
Protéines PR	PR-1 Pathogenesis-related protein 1 ; PR-2 Pathogenesis-related protein 2 (glucanases) ; PR-4 Pathogenesis-related protein 4 (hevein-like); PR-5 Pathogenesis-related protein 5 (thaumatinlike, osmotin); PR-8 Pathogenesis-related protein 8 (class III chitinase); PR-14 Pathogenesis-related protein 14 (lipid transfer protein) ; PR-10 Pathogenesis-related protein 10 (β - glucuronidase)
Voie des phénylpropanoïdes	PAL Phenylalanine ammonia-lyase ; CHS Chalcone synthase ; DFR Dihydroflavonol reductase ; BIS2 Biphenyl synthase ; PPO Polyphenol oxidase
Voie des isoprénoïdes	HMGR Hydroxymethyl glutarate-CoA reductase ; FPPS Farnesyl pyrophosphate synthase ; Far (E,E)-alpha-farnesene synthase
Voie de la cystéine	CSL Cystéine lyase
Stress oxydant	APOX Ascorbate peroxidase ; GST Glutathion S-transférase ; POX Peroxidase ;
Modifications pariétales	CalS Callose synthase ; Pect Pectin methyl esterase ; CAD Cinnamyl alcool dehydrogenase
Voie des lectines	AGL Agglutinine
Signalisation hormonale : voie de l'acide salicylique	EDS1 Disease resistance protein EDS1, WRKY WRKY transcription factor 30
Signalisation hormonale : voie de l'acide jasmonique	LOX2 Lipoxygenase ; JAR Jasmonate resistant 1
Voie de l'éthylène	ACCO 1-aminocyclopropene-1-carboxylate oxidase ; EIN3 EIN 3-BINDING F BOX PROTEIN 1

[0161] B) Résultats

[0162] Les résultats obtenus sont présentés en Figure 8 et montrent que la composition ND a activé de manière globale les gènes de défense du pommier.

[0163] **Exemple 9 : Mise en évidence des effets de la composition ND sur certains gènes de défense, marqueurs très spécifiques des réactions de défenses chez le pommier**

- [0164] De jeunes plants de pommiers de la variété Golden Delicious (6 semaines) cultivés sous serre et présentant des feuilles développées ont été traités avec :
- la composition ND de l'Exemple 1 diluée au 1/200^{ème} (v/v), ou
 - la composition ND de l'Exemple 1 diluée au 1/66^{ème} (v/v).
- Les jeunes plants ont été traités une seule fois à 6 semaines par pulvérisation foliaire. Une partie des jeunes plantes a été traitée avec de l'eau (Témoin H₂O).
- [0165] Le protocole expérimental est identique à celui présenté à l'Exemple 8. L'expression d'une sélection de gènes, décrits dans la littérature comme marqueurs de l'activation des défenses des plantes, a été mesurée.
- [0166] Le groupe de gènes PR (Pathogenesis-Related) 1 à 14 sont régulièrement utilisés dans la littérature comme marqueurs de l'activation des défenses des plantes.
- [0167] Les feuilles traitées ont été échantillonnées 1 jour (J1) post-traitement. Les échantillons obtenus ont été utilisés pour une analyse en RT-PCR quantitative. Les résultats sont exprimés en log₂. Cette analyse a permis de mesurer précisément l'effet de l'application de la composition ND sur l'expression de plusieurs gènes PR.
- [0168] B) Résultats
- [0169] Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 9 et montrent que le traitement des jeunes plants de pommier avec la composition ND a activé l'expression des gènes PR-1, PR-5, PR-8, PR-14 et PR-10. Il a été observé pour la plupart des gènes PR une augmentation du niveau d'expression qui est dose-dépendante.
- [0170] Ces résultats confirment que la composition ND active les réactions de défenses des plantes, en particulier stimule l'expression des gènes de défense de la plante.

Brève description des dessins

- [0171] [fig.1] La Figure 1 illustre la numérotation des feuilles de blé F0 F1, F2, F3, F4.
- [0172] [fig.2A] La Figure 2A représente la sévérité de la septoriose (Figure de gauche) sur les feuilles de blé F0 au stade 75 du développement du blé et la fréquence de la septoriose (Figure de droite) observée sur les feuilles de blé F0 au stade 75 du développement du blé, pour des plants de blé qui n'ont bénéficié d'aucun traitement fongicide (Témoin NT), des plants de blé ayant été traités avec la composition ND à 50% de sa dose efficace, soit 0,5 L/ha, et des plants de blé ayant été traités avec la composition ND à 100% de sa dose efficace, soit 1 L/ha.
- [0173] [fig.2B] La Figure 2B représente la sévérité de la septoriose (Figure de gauche) sur les feuilles de blé F1 au stade 75 du développement du blé et la fréquence de la septoriose (Figure de droite) observée sur les feuilles de blé F1 au stade 75 du développement du blé, pour des plants de blé qui n'ont bénéficié d'aucun traitement fongicide (Témoin NT), des plants de blé ayant été traités avec la composition ND à 50% de sa dose efficace, soit 0,5 L/ha et des plants de blé ayant été traités avec la com-

position ND à 100% de sa dose efficace, soit 1 L/ha.

- [0174] [fig.3A] La Figure 3A représente la sévérité de la septoriose (figure de gauche) et la fréquence de la septoriose (figure de droite) observée sur les feuilles de blé F0, pour des plants de blé qui n'ont bénéficiés d'aucun traitement fongicide (Témoin NT), des plants de blé ayant été traités avec un programme fongicide (Pr. Fongi.), des plants de blé ayant été traités avec un programme fongicide allégé (Pr. Fongi. al.), des plants de blé ayant été traités avec un programme composition ND appliquée à 50% de sa dose efficace, soit 0,5 L/ha en association avec le Pr. Fongi. al., des plants de blé ayant été traités avec un programme composition ND appliquée à 100% de sa dose efficace, soit 1 L/ha en association avec le Pr. Fongi. al.
- [0175] [fig.3B] La Figure 3B représente la sévérité de la septoriose (figure de gauche) et la fréquence de la septoriose (figure de droite) observée sur les feuilles de blé F1, pour des plants de blé qui n'ont bénéficiés d'aucun traitement fongicide (Témoin NT), des plants de blé ayant été traités avec un programme fongicide (Pr. Fongi.), des plants de blé ayant été traités avec un programme fongicide allégé (Pr. Fongi. al.), des plants de blé ayant été traités avec un programme composition ND appliquée à 50% de sa dose efficace, soit 0,5 L/ha en association avec le Pr. Fongi. Al., des plants de blé ayant été traités avec un programme composition ND appliquée à 100% de sa dose efficace, soit 1 L/ha en association avec le Pr. Fongi. al.
- [0176] [fig.4] La Figure 4 représente la sévérité de la septoriose (figure de gauche) et la fréquence de la septoriose (figure de droite) observée sur les feuilles de blé F0, pour des plants de blé qui n'ont bénéficiés d'aucun traitement fongicide (Témoin NT), des plants de blé ayant été traités avec un programme fongicide classique (Pr. Fongi.), des plants de blé ayant été traités avec un programme fongicide allégé (Pr. Fongi. al.), des plants de blé ayant été traités avec un programme composition ND appliquée à sa dose efficace (soit 1 L/ha) en association avec le Pr. Fongi. al (ND + Pr.Fongi. al.), des plants de blé ayant été traités avec un programme « extrait d'ulvanes » à 8 g/L appliqué en association avec le Pr. Fongi. al (Extrait d'ulvanes + Pr.Fongi. al.), des plants de blé ayant été traités avec un programme « solution de silicium » à 21, 6 g/L appliqué en association avec le Pr. Fongi. Al (Silicium + Pr.Fongi. al.).
- [0177] [fig.5] La Figure 5 représente le niveau d'expression du gène ICS1, du gène PR-1 et du gène PR-3 des feuilles de blé au stade BBCH13 (3ème feuille étalée) mesuré par RT-PCR quantitative, pour des plants de blé qui n'ont bénéficiés d'aucun traitement (Témoin NT), des plants de blé ayant été traités avec un témoin positif (produit commercial Bion® 50 WG), des plants de blé ayant été traités avec la composition ND diluée au 1/400ème (v/v) et des plants de blé ayant été traités avec la composition ND diluée au 1/100ème (v/v).
- [0178] [fig.6] La Figure 6 représente le pourcentage de fruits tavelés, obtenus sur des

pommiers de la variété Golden Delicious, pour des pommiers qui ont été traités avec un programme de référence appelé production fruitière intégrée (PFI), un programme de fongicide allégé (PFI allégé), un programme PFI allégé + Bion® 50 WG, ou un programme de PFI allégé + composition ND.

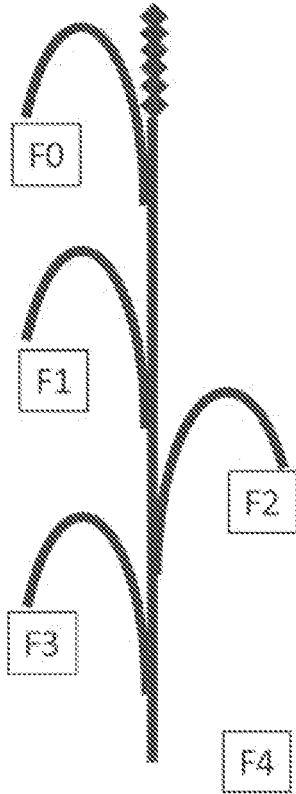
- [0179] [fig.7] La Figure 7 représente le pourcentage de fruits sains, faiblement tavelés et sévèrement tavelés, pour des pommiers qui ont bénéficié d'un traitement fongicide effectué en programme production fruitière intégrée (PFI) classique, des pommiers qui ont bénéficié d'un traitement en modalité allégé (PFI allégé), des pommiers qui ont bénéficié d'un traitement en modalité allégé + Bion® 50 WG ou des pommiers qui ont bénéficié d'un traitement en modalité allégé + composition ND.
- [0180] [fig.8] La Figure 8 représente l'activation des gènes de défense du pommier exprimée en log2 de la somme des gènes de défenses induits, après normalisation par rapport à un témoin (le témoin correspond au traitement des plantules avec de l'eau), pour des feuilles de pommiers ayant été échantillonnées au jour 1 (J1) et au jour 3 (J3) post-traitement. Les feuilles ont été traitées avec la composition ND diluée au 1/200ème (v/v) ou avec la composition ND diluée au 1/66ème (v/v).
- [0181] [fig.9] La Figure 9 représente l'activation des gènes de défense du pommier PR1, PR5, PR8, PR14 et PR10 exprimée en log2 de la somme des gènes de défenses induits, après normalisation par rapport à un témoin (le témoin correspond au traitement des plantules avec de l'eau), pour des feuilles de pommiers ayant été échantillonnées au jour 1 (J1) post-traitement. Les feuilles ont été traitées avec la composition ND diluée au 1/200ème (v/v) ou avec la composition ND diluée au 1/66ème (v/v).

Revendications

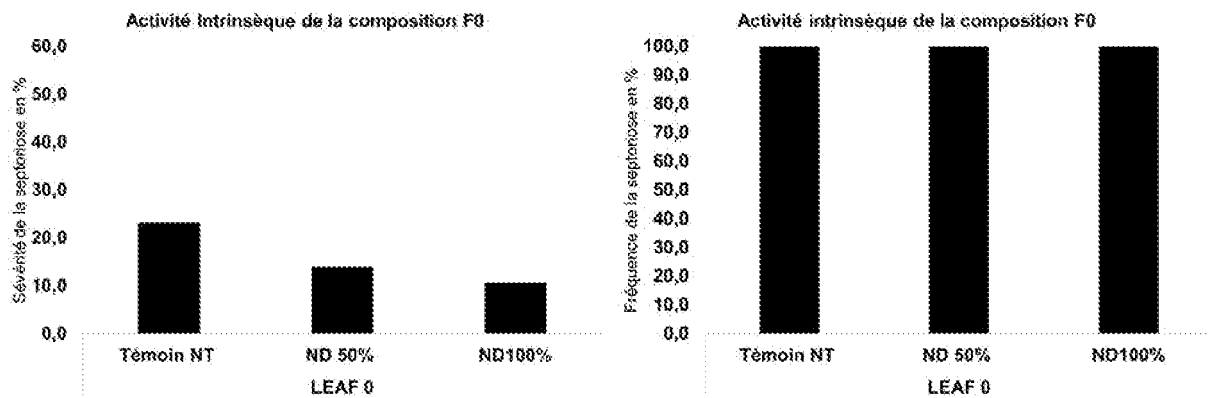
- [Revendication 1] Composition phytosanitaire comprenant :
- (i) des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes; et
(ii) du silicium.
- [Revendication 2] Composition phytosanitaire selon la revendication 1, caractérisée en ce que les ulvanes et/ou les oligosaccharides dérivés d'ulvanes sont sous la forme d'un extrait contenant des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes, par exemple un extrait d'*Ulva* ou un extrait d'*Enteromorpha*.
- [Revendication 3] Composition phytosanitaire selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'extrait contenant des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes est un extrait d'*Ulvaarmoricana*, un extrait d'*Ulva rigida*, un extrait d'*Ulva rotundata*, un extrait d'*Ulva lactuca*, un extrait d'*Enteromorpha intestinalis*, ou un extrait d'*Enteromorpha compressa*, de préférence un extrait d'*Ulva armoricana*, un extrait d'*Enteromorpha intestinalis* ou un extrait d'*Enteromorpha compressa*.
- [Revendication 4] Composition phytosanitaire selon l'une quelconque des revendications 2 ou 3, caractérisée en ce que l'extrait contenant des ulvanes et/ou des oligosaccharides dérivés d'ulvanes est un extrait enrichi en ulvanes et/ou en oligosaccharides dérivés d'ulvanes.
- [Revendication 5] Composition phytosanitaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les oligosaccharides dérivés d'ulvanes sont obtenus par hydrolyse acide ou enzymatique d'ulvanes.
- [Revendication 6] Composition phytosanitaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le silicium est sous la forme d'un sel soluble, de préférence choisi parmi le silicate de potassium (K_2SiO_3), le silicate de sodium (Na_2SiO_3), ou leur mélange.
- [Revendication 7] Composition phytosanitaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ladite composition se présente sous forme liquide.
- [Revendication 8] Composition phytosanitaire selon la revendication l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ladite composition est sous forme liquide et qu'elle comprend :
- une concentration en ulvanes et/ou en oligosaccharides dérivés d'ulvanes de 0,01 à 100 g/L , préférentiellement de 0,1 g/L à 50 g/L, encore plus préférentiellement de 1 g/L à 20 g/L, par exemple de 8 g/L à 14 g/L, et

- une concentration en silicium de 0,01 g/L à 100 g/L, préférentiellement de 0,1 g/L à 50 g/L, encore plus préférentiellement de 1,0 g/L à 30 g/L, de 10 g/L à 30 g/L, de 20 g/L à 30 g/L, de 5 à 10 g/L, de 5 à 8 g/L par exemple environ 21 g/L +/- 1 g/L ou 6 g/L +/- 1 g/L.
- [Revendication 9] Utilisation d'une composition telle que définie selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour activer des réactions de défense d'une plante et de résistance contre des contraintes biotiques.
- [Revendication 10] Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que la composition est apportée à la plante sous forme liquide dans des solutions foliaires, par exemple en une quantité allant de 0,001 à 100 L/ha, préférentiellement de 0,01 à 25 L/ha, encore plus préférentiellement de 0,1 à 10 L/ha, par exemple en une quantité 1 L/ha. .
- [Revendication 11] Utilisation selon l'une quelconque des revendications 9 à 10, caractérisée en ce que la composition est apportée à la plante en combinaison avec un ou plusieurs pesticides, préférentiellement un ou plusieurs fongicides.
- [Revendication 12] Procédé pour activer les réactions de défense d'une plante et de résistance contre des contraintes biotiques, caractérisé en ce qu'il comprend l'application à ladite plante d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.
- [Revendication 13] Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la composition stimule l'expression des gènes impliqués dans la défense de la plante.
- [Revendication 14] Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce que la composition est apportée à la plante sous forme liquide dans des solutions foliaires, par exemple en une quantité allant de 0,001 à 100 L/ha, préférentiellement de 0,01 à 25 L/ha, encore plus préférentiellement de 0,1 à 10 L/ha, par exemple en une quantité 1 L/ha.
- [Revendication 15] Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'application à ladite plante d'un ou plusieurs pesticides, préférentiellement d'un ou plusieurs fongicides.

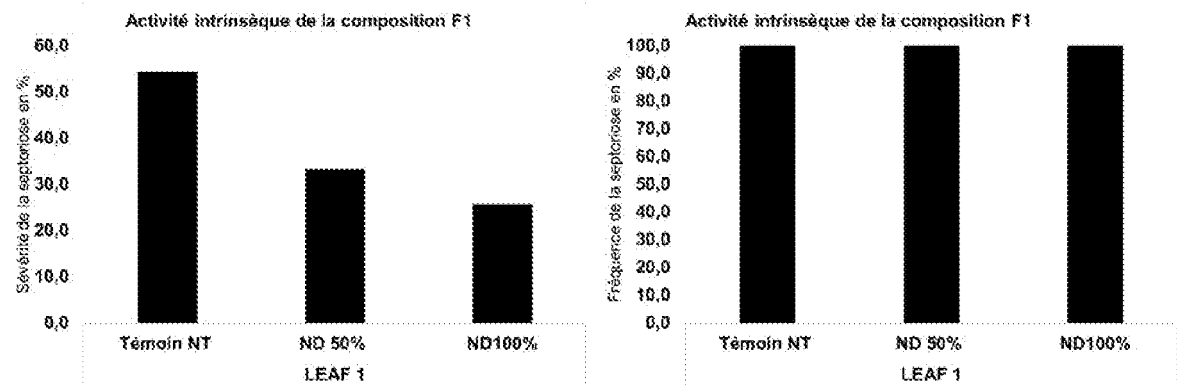
[Fig. 1]



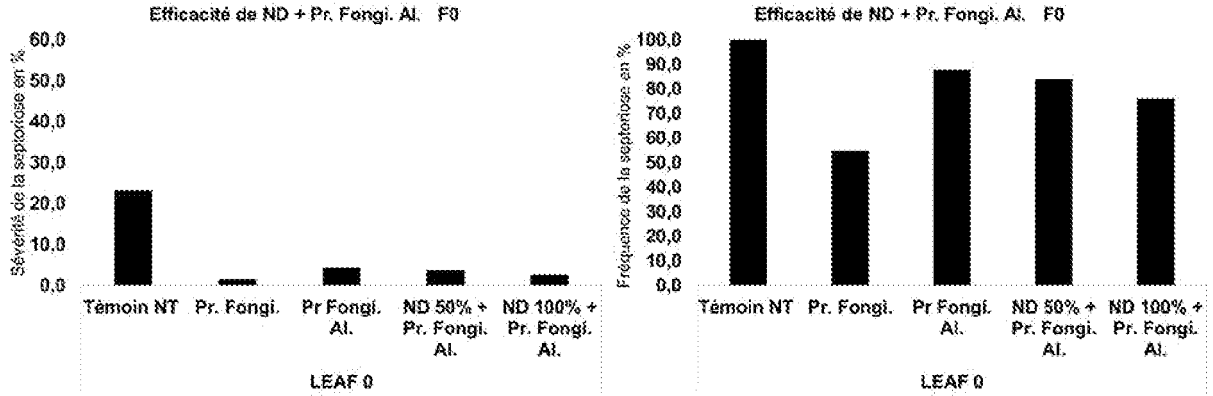
[Fig. 2A]



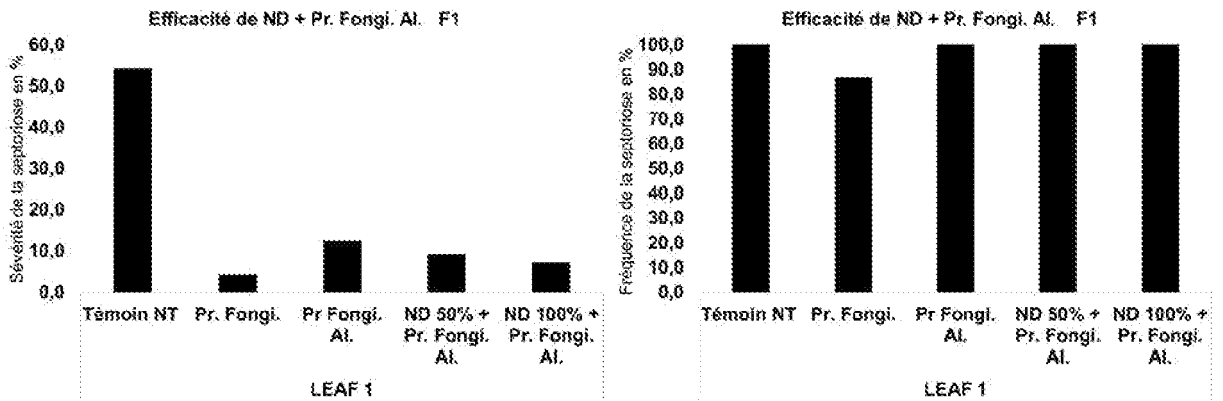
[Fig. 2B]



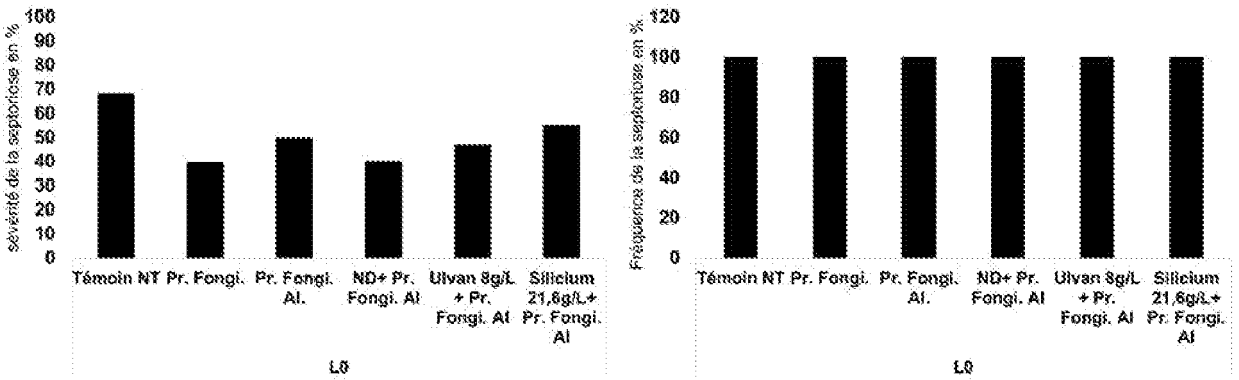
[Fig. 3A]



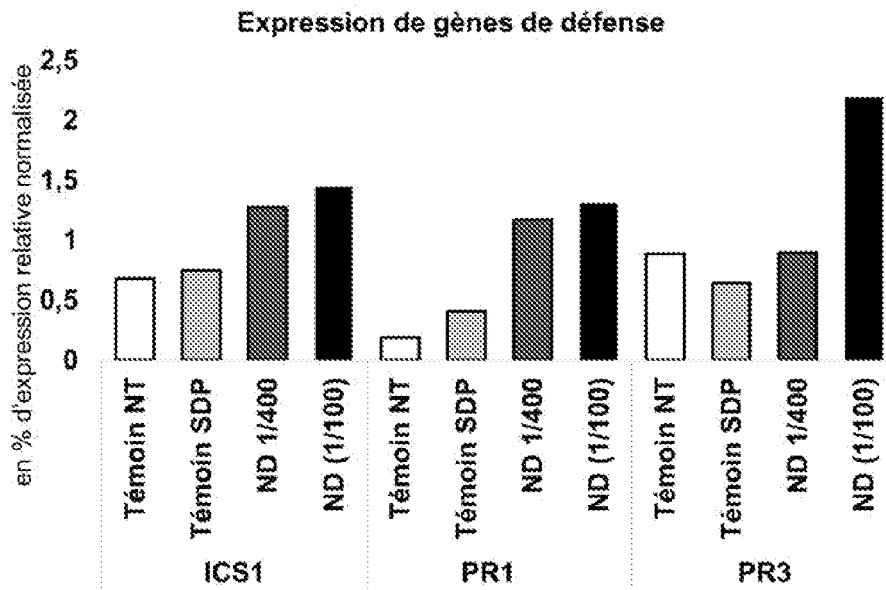
[Fig. 3B]



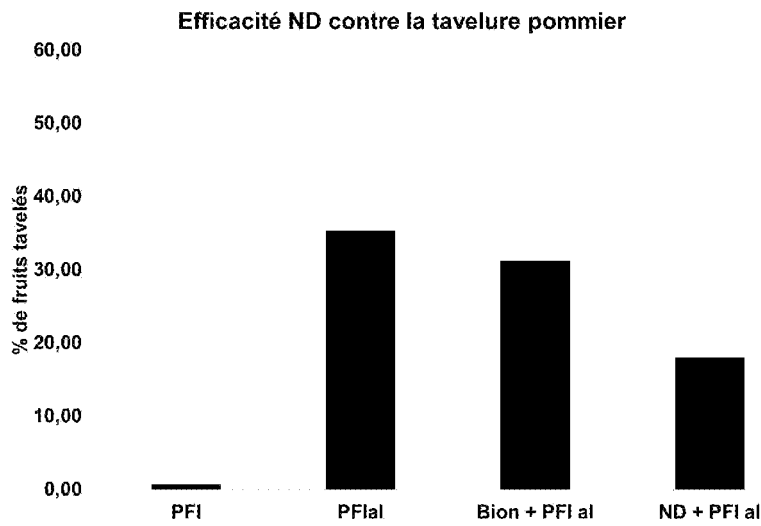
[Fig. 4]



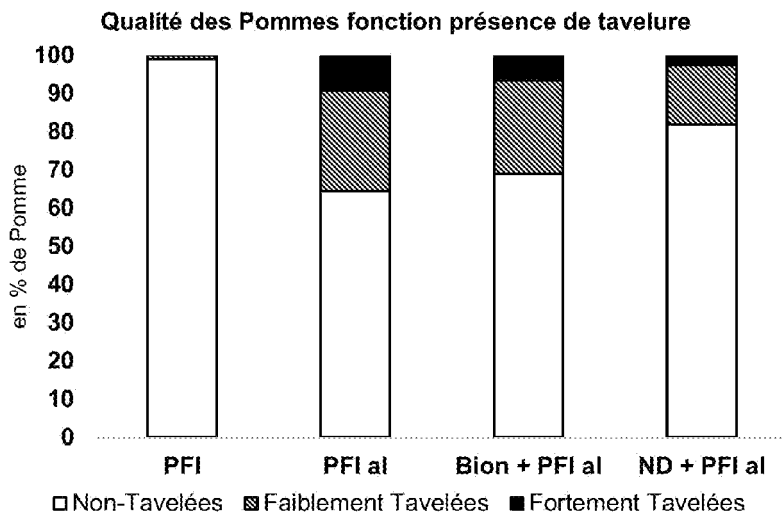
[Fig. 5]



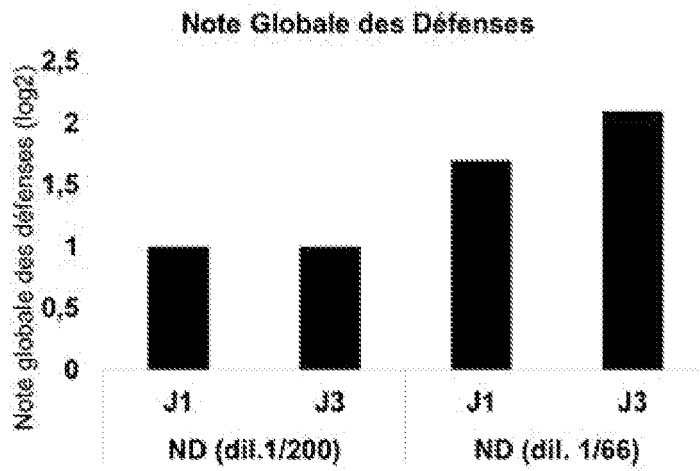
[Fig. 6]



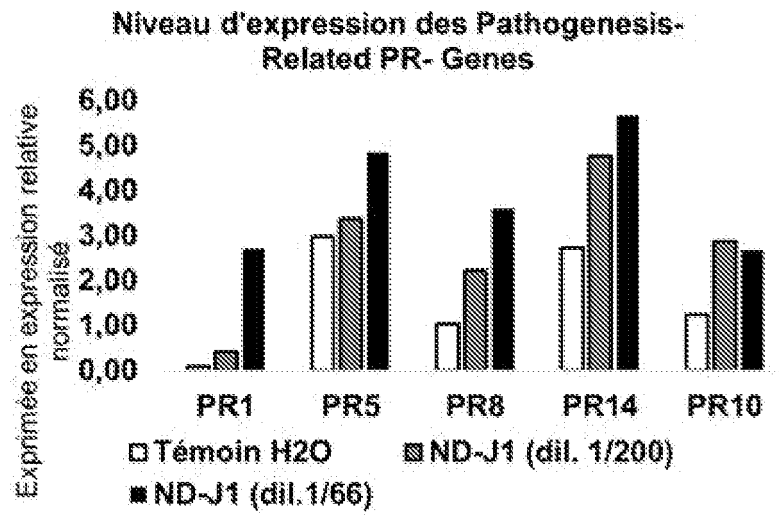
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]





**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement national

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

FA 878441
FR 2002511

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y,D	WO 2005/094588 A1 (CIE FINANCIERE ET DE PARTICIPA [FR]; BRIAND XAVIER [FR] ET AL.) 13 octobre 2005 (2005-10-13) * le document en entier * -----	1-15	A01N65/03 A01N59/00
Y	CN 107 306 998 A (WEIHAI WENXI BIOLOGICAL TECH CO LTD) 3 novembre 2017 (2017-11-03) * alinéa [0008] * -----	1-15	
X	FR 2 882 997 A1 (OLMIX SARL [FR]) 15 septembre 2006 (2006-09-15) * page 1, ligne 4 - ligne 5; revendication 6; exemples * -----	1-4,6-8	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
			A01N
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		29 octobre 2020	Bertrand, Franck
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2002511 FA 878441**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **29-10-2020**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2005094588	A1	13-10-2005	BR PI0509523 A 18-09-2007
			CA 2561378 A1 13-10-2005
			CA 2838231 A1 13-10-2005
			EP 1729582 A1 13-12-2006
			ES 2561112 T3 24-02-2016
			FR 2868253 A1 07-10-2005
			PL 1729582 T3 31-05-2016
			PT 1729582 E 28-03-2016
			US 2007232494 A1 04-10-2007
			WO 2005094588 A1 13-10-2005

CN 107306998	A	03-11-2017	AUCUN

FR 2882997	A1	15-09-2006	AUCUN
