

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
30 décembre 2009 (30.12.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/156687 A2

(51) Classification internationale des brevets :

C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/00 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01) A01N 37/18 (2006.01)
C07K 5/12 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)
C07C 15/14 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01) A01N 27/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2009/051180

(22) Date de dépôt international :

19 juin 2009 (19.06.2009)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

08 54053 19 juin 2008 (19.06.2008) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :

AGRONUTRITION [FR/FR]; 3 Avenue de L'Orchidée
Parc Activestre, F-31390 Carbonne (FR). INSTITUT
NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE
[FR/FR]; 6 allée Emile Monso, BP 34038, F-31029
Toulouse (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : LEBRIHI,
Ahmed [FR/FR]; Le Paraillet, F-31450 Noueilles (FR).
ERRAKHI, Rafik [MA/MA]; N° 151, Hay Essalam, Av.
Mohamed VI, Benguerir (MA). BARAKATE, Mustapha
[MA/MA]; Rue Ibn Ait Khabab, N° 404, Issil,
Marrakech, 40000 (MA).

(74) Mandataire : POUCHUCQ, Bernard; AQUINOV,
Allée de la Forestière, F-33750 Beychac et Caillau (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) :

ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

- relative au droit du déposant de revendiquer la priorité
de la demande antérieure (règle 4.17.iii))
- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))
- avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel
biologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis,
séparément, et non avec la description (règles
13bis.4.d)i) et 48.2.a) viii))
- avec la partie de la description réservée au listage des
séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : NEW *STREPTOMYCES BARAKATEI* STRAIN, CULTURE FILTRATE, DERIVED ACTIVE COMPOUNDS AND
USE THEREOF IN THE TREATMENT OF PLANTS

(54) Titre : NOUVELLE SOUCHE *STREPTOMYCES BARAKATEI*, FILTRAT DE CULTURE, COMPOSES ACTIFS
DERIVES ET LEUR UTILISATION DANS LE TRAITEMENT DES PLANTES

(57) Abstract : The subject matter of the invention is a new *Streptomyces barakatei* strain deposited with the CNCM under
number I-3640 and with the LMG under number P-23734. The invention also relates to the use of this strain or of a mutant strain
for obtaining a composition (culture filtrate) and active compounds (secondary metabolites) by fermentation. Finally, the
invention also relates to the use of the new strain, of a mutant strain, of the culture filtrate or of the active compounds, for plant
protection and the biological control of phytopathogenic agents and/or for stimulating plant growth.

(57) Abrégé : 31 ABREGE DESCRIPTIF L'objet de l'invention est une nouvelle souche *Streptomyces barakatei* déposée à la
CNCM sous le numéro I-3640 et au LMG sous le numéro P-23734. L'invention concerne également l'utilisation de cette souche ou
d'une souche mutante pour obtenir par fermentation une composition (filtrat de culture) et des composés actifs (métabolites
secondaires). 5 Enfin, l'invention vise également l'utilisation de la nouvelle souche, d'une souche mutante, du filtrat de culture ou
des composés actifs pour la protection des plantes et la lutte biologique contre des agents phytopathogènes et/ou pour stimuler la
croissance des plantes.



WO 2009/156687 A2

**NOUVELLE SOUCHE STREPTOMYCES BARAKATEI,
FILTRAT DE CULTURE, COMPOSES ACTIFS DERIVES ET LEUR
UTILISATION DANS LE TRAITEMENT DES PLANTES**

La présente invention a pour objet une nouvelle souche actinomycète *Streptomyces barakatei* ou une souche mutante de celle-ci.

L'invention vise aussi l'utilisation de cette souche pour produire une composition ou filtrat de culture, par fermentation et des composés actifs, ainsi que les
5 composés actifs obtenus.

L'invention concerne également l'utilisation de cette nouvelle souche *barakatei*, d'une souche mutante, du filtrat de culture ou d'un composé actif pour lutter contre des infections des plantes et/ou pour stimuler la croissance des plantes.

La culture agricole a toujours eu une grande importance. Aujourd'hui, les cultures
10 agricoles intensives se développent de plus en plus et la culture de végétaux sains constitue un aspect essentiel pour le bien être et la santé de l'homme.

Or, les plantes sont fragiles et sont susceptibles d'être infectées par divers facteurs, tels que des agents phytopathogènes, qui réduisent de façon conséquente la qualité et le rendement de l'agriculture.

15 On sait que les maladies phytogènes réduisent de 12 à 14% la production agricole mondiale, 70% des dommages étant d'origine fongique. Il est donc indispensable de trouver des moyens efficaces pour lutter contre les infections causées par des agents phytopathogènes.

Actuellement, plusieurs moyens de lutte sont employés.

20 Un premier moyen, simple à mettre en oeuvre, consiste à pratiquer des techniques culturales telles que le labourage ou la rotation des cultures.

Toutefois, les agents pathogènes produisent des sclérotas dans le sol qui leur permettent de survivre pendant plusieurs années, si bien que les pratiques culturales restent inefficaces en absence de moyens éradiquant dans le sol les formes de résistance et le mycélium pathogène.

- 5 Une deuxième méthode, la plus utilisée, consiste à traiter chimiquement les cultures infectées. On connaît par exemple le traitement au bromure de méthyle, qui est le fongicide chimique le plus utilisé, généralement pour désinfecter le sol avant l'ensemencement des cultures.

Toutefois, le traitement chimique n'est pas non plus satisfaisant car l'utilisation
10 de produits chimiques provoque des effets négatifs sur l'environnement et sur la santé humaine. Le bromure de méthyle en particulier constitue une menace pour la stratosphère à cause du pouvoir catalyseur de l'atome de brome.

En outre l'efficacité des agents chimiques est de plus en plus limitée du fait de l'apparition de souches pathogènes résistantes.

- 15 Depuis quelques années, des solutions plus efficaces et plus respectueuses de l'environnement ont donc été recherchées. Les spécialistes se sont orientés vers la lutte biologique basée sur l'utilisation d'agents biologiques antagonistes naturels.

Plusieurs microorganismes, tels que *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*
20 ou *Pseudomonas fluorescens*, ont été utilisés pour contrôler des maladies phytopathogènes.

Toutefois les agents biologiques existants ne sont pas satisfaisants en terme d'efficacité et de fiabilité.

En outre, depuis plusieurs décennies, le monde agricole cherche de nouvelles
25 solutions pour améliorer la qualité des sols et pour stimuler la croissance végétale.

Dans ce but, de nombreux produits ont été développés pour fertiliser le sol, stimuler la nutrition et donc la croissance des plantes cultivées.

Toutefois, ces produits sont généralement essentiellement d'origine chimique et ne sont pas satisfaisants du point de vue environnemental et humain, si bien qu'il existe un besoin pour des substances d'origine naturelle capables de stimuler efficacement la croissance des végétaux.

- 5 Il subsiste un besoin pour des agents biologiques naturels non toxiques pour l'homme et l'environnement, capables à la fois de lutter efficacement contre les maladies des plantes et de stimuler leur croissance.

C'est pourquoi la présente invention vise à répondre à ce besoin en proposant une nouvelle souche bactérienne particulièrement efficace pour lutter contre les
10 infections phytopathogènes et pour stimuler la croissance.

A cet effet l'invention a pour objet une souche actinomycète *Streptomyces barakatei* déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes CNCM sous le numéro I-3640 et au centre de collection de microorganismes belge LMG sous le numéro P-23734, ou une souche mutante, caractérisée par une
15 séquence de l'ADNr 16S SEQ n°1 déposée dans la banque de données de nucléotides Pubmed/NCBI, sous la référence : DQ385990.

Dans la description qui va suivre de l'invention, cette souche pourra être nommée « I-3640 ».

Avantageusement, cette souche est très efficace dans la lutte biologique contre
20 les agents phytopathogènes. Elle est également efficace pour la stimulation de la croissance des plantes, en particulier en améliorant l'assimilation des nutriments par les plantes.

L'invention concerne également l'utilisation de la souche I-3640 ou d'une souche mutante, pour l'obtention par fermentation d'un filtrat de culture comprenant
25 des métabolites secondaires, présentant une activité antibactérienne, antifongique et stimulatrice de la croissance des plantes.

La présente invention vise également l'utilisation de la souche I-3640 ou d'une souche mutante pour l'obtention de métabolites ou composés actifs, en particulier des antibiotiques.

L'invention vise aussi l'utilisation de la souche I-3640, d'une souche mutante, du filtrat de culture obtenu par fermentation de la souche I-3640 ou d'une souche mutante, ou des composés actifs, pour le traitement des plantes, en particulier pour la lutte contre les infections phytopathogènes et/ou pour favoriser la croissance des plantes. En particulier il s'agit de l'utilisation :

- en tant qu'agent antibactérien pour la protection des plantes et la lutte biologique contre des agents phytopathogènes, par exemple pour la protection des plantes vis-à-vis de bactéries gram-positif, et/ou
- en tant qu'agent antifongique pour la protection des plantes et la lutte biologique contre des agents phytopathogènes, et/ou
- pour activer les systèmes de défense naturels des plantes, notamment pour stimuler l'expression des gènes de défense des plantes PR1 et PDF1.2a, et/ou
- pour stimuler la croissance des plantes, et/ou
- pour améliorer l'assimilation des nutriments par les plantes, notamment pour améliorer l'assimilation du Potassium, du Zinc, du Bore, du Calcium, du Cuivre, du Phosphore, du Magnésium, du Fer, du Manganèse et de l'Azote.

D'autres caractéristiques et avantages ressortiront de la description qui va suivre de l'invention, description donnée à titre d'exemple uniquement, en regard des dessins annexés sur lesquels :

- la figure 1a représente une photo de feuille de vigne sans traitement (témoin),

- la figure 1b représente une photo de feuille de vigne traitée par *Botrytis cinerea* puis par le filtrat de culture obtenu par fermentation de la souche selon l'invention,

5 - la figure 1c représente une photo de feuille de vigne traitée par *Botrytis cinerea*,

- la figure 2a représente le résultat d'une RT-PCR sur l'expression d'un gène témoin EF1aA4, par *Arabidopsis thaliana* traitée ou non traitée par la souche selon l'invention,

10 - la figure 2b représente le résultat d'une RT-PCR sur l'expression d'un gène impliqué dans la défense naturelle des plantes, PR1, par *Arabidopsis thaliana* traitée ou non traitée par la souche selon l'invention, et

- la figure 2c représente le résultat d'une RT-PCR sur l'expression d'un gène impliqué dans la défense naturelle des plantes, PDF1,2, par *Arabidopsis thaliana* traitée ou non traitée par la souche selon l'invention.

15

I. Protocole d'isolement de la souche selon l'invention

La souche *barakatei* selon l'invention est isolée selon un procédé de sélection comprenant les étapes suivantes :

20 - mise en présence d'un échantillon biologique susceptible de contenir la souche *barakatei* et/ou une souche mutante, avec un milieu approprié pour la sélection de souches actinomycètes,

- traitement dudit échantillon pour isoler les souches actinomycètes présentes, et

25 - isolement de la souche *barakatei* et/ou d'une souche mutante, en fonction de sa capacité à inhiber des agents phytopathogènes.

L'isolement de la souche selon l'invention a été effectué à partir d'échantillons de la rhizosphère d'un jardin de la palmeraie de Marrakech.

Le protocole est décrit en suivant.

Des échantillons de sol d'un jardin de la palmeraie de Marrakech sont prélevés avec une tarière de plus de 10cm de profondeur, après avoir retiré environ 3cm de la surface du sol.

Les échantillons prélevés sont placés dans des sachets stériles en polyéthylène, fermés et stockés à 4°C.

Les souches actinomycètes sont ensuite isolées sur un milieu OL (Olson) ou un milieu SEA (Soil Extract Agar) selon deux méthodes : traitement par chaleur-agitation ou traitement par chimiotactisme.

Préférentiellement les échantillons sont traités par la méthode chaleur - agitation.

Les échantillons sont mélangés, mis en suspension dans de l'eau distillée stérile (4g pour 36ml) et agités à 200 tours par minute pendant 30 minutes. Ils sont ensuite traités à 50°C pendant 10 minutes.

Chaque échantillon est ensuite dilué à 10^{-7} , dispersé (0,1 mL) à la surface d'un milieu OL ou d'un milieu SEA, préférentiellement SEA, puis incubé à 30°C pendant 21 jours.

Selon une variante les échantillons peuvent être traités par chimiotactisme.

Des antibiotiques sont ajoutés dans le milieu d'isolation (OL et SEA), comme de l'acide nalixidique (10mg.L^{-1}) et de la novobiocine (25mg.L^{-1}). Préférentiellement on ajoute de l'acide nalixidique. Des composés antifongiques cycloheximides (40mg.l^{-1}) peuvent également être ajoutés au milieu.

Les échantillons sont ensuite incubés à 30°C pendant 3 semaines.

Le traitement des échantillons peut être précédé par une étape de pré-traitement par exemple par chauffage, micro-ondes, pulsions électriques ou encore à l'aide de réactifs chimiques.

Après traitement des échantillons, on isole les souches actinomycètes par reconnaissance au microscope sur la base de leurs caractéristiques morphologiques.

Les actinomycètes sont transférés sur un milieu Bennett. Les isolats purs sont maintenus à 4°C pendant 2 mois. Alternativement, les cultures sont resuspendues et conservées dans 20% de glycérol stérile à -20°C.

Pour isoler spécifiquement la souche I-3640 objet de la présente invention, on réalise un criblage en fonction de sa capacité à inhiber les agents pathogènes suivants :

- *Sclerotium rolfsii*
- *Fusarium oxysporum*
- *Verticillium dahliae*
- *Botrytis cinerea*
- *Pythium ultimum*

La sélection est réalisée par diffusion agar avec la méthode des cylindres (Bauer et al., 1966). Des actinomycètes purs sont inoculés sur un milieu Bennett. Après une incubation de 5 jours à 30°C, un cylindre calibré (de 6 mm de diamètre) est découpé dans le milieu de culture et placé sur un milieu test contenant les agents phytopathogènes testés. Le milieu de culture est un milieu PDA pour les champignons pathogènes et un milieu Bennett pour les bactéries pathogènes.

Les souches sont ensuite maintenues à 4°C pendant 4 heures pour permettre la diffusion des composés antibiotiques puis incubées à 30°C. Les diamètres d'inhibition sont déterminés après 48 heures d'incubation.

Parmi les différentes souches montrant une capacité d'inhibition des agents pathogènes testés, la souche barakatei I-3640 selon l'invention peut être sélectionnée pour sa capacité d'inhibition des sclérotés de *Sclerotium rolfsii* et de la croissance hyphale de *Sclerotium rolfsii*.

Pour le test de germination des sclérotés, des sclérotés de *Sclerotium rolfsii* sont collectés et désinfectés avec de l'hypochlorite de sodium à 2% pendant 3 minutes et lavés 3 fois avec de l'eau distillée stérile. Dix sclérotés sont disposés à la surface d'un support agar contenant un milieu PDA mélangé avec les souches

d'actinomycètes, et le nombre de sclérotos germés est compté après 72 heures d'incubation à 25°C.

Pour le test de croissance hyphale, un disque mycélien de 8mm est prélevé à partir de colonies de 5 jours de *Sclerotium rolfsii* et transféré sur un support.

- 5 Les croissances mycéliennes sont évaluées en mesurant le diamètre des colonies après 72 heures d'incubation à 25°C.

La souche selon l'invention est sélectionnée pour sa capacité d'inhibition des sclérotos de *Sclerotium rolfsii* de 93% et de la croissance hyphale de *Sclerotium rolfsii* de 80%. Elle est reconnaissable par ses caractéristiques phénotypiques et
10 physiologiques décrites ci-après.

II. Caractérisation de la souche selon l'invention

La nouvelle souche barakatei objet de l'invention est une souche bactérienne appartenant à la famille des actinomycètes et au genre des *Streptomyces*. Elle
15 été déposée le 30 juin 2006 à la CNCM sous le numéro I-3640 et au LMG sous le numéro P-23734.

Les actinomycètes ou les actinobactéries sont des bactéries à gram positif qui présentent une forme filamenteuse. Ce sont des bactéries saprophytes capables de dégrader de la matière organique dans le sol et d'utiliser des molécules plus
20 complexes pour leur croissance.

La souche bactérienne barakatei selon l'invention est caractérisée par un mycélium aérien blanc sur milieu ISP2 ou Bennett gélose. Le mycélium de substrat varie de jaune brun à gris brun selon le milieu de culture.

La souche I-3640 selon l'invention présente des spores lisses à chaînes en
25 spirales de type S. Les chaînes comprennent en moyenne 10 à 50 spores.

La température de croissance est comprise entre 12 et 37°C, préférentiellement entre 28 et 32°C. Le pH du milieu de culture est préférentiellement compris entre 5 et 9.

Pour sa croissance, la souche barakatei I-3640 doit être mise en culture dans un milieu contenant une variété de substances nutritives. Par exemple, comme source de carbone on peut utiliser le D-glucose, le mannitol, le lactose, le saccharose, le maltose et la dextrine. En revanche, il est préférable de ne pas
5 utiliser le galactose, l'inositol, le sorbose, le fructose, l'arabinose, le raffinose, le rhamnose et la cellulose.

Comme source d'azote on peut utiliser les acides aminés, les sels nitrate et les sels ammonium.

La souche barakatei selon l'invention n'hydrolyse pas l'amidon. Elle réduit les
10 nitrates en nitrites et dégrade l'adénine, le Tween 20 et l'acétate de sodium.

La souche selon l'invention peut également être caractérisée par ses caractéristiques moléculaires. Les principales analyses moléculaires utilisées pour la détermination des espèces bactériennes sont le séquençage de l'ADN ribosomal (ADNr) 16S et l'hybridation ADN-ADN.

15 L'hybridation ADN-ADN montre que la souche selon l'invention correspond à une nouvelle espèce dans le groupe des Streptomyces.

Le séquençage de l'ADNr 16S consiste à extraire de l'ADN génomique puis à amplifier par PCR la partie 16S ADNr en utilisant des amorces spécifiques. Le produit de la PCR est ensuite utilisé pour séquencer la partie du 16S ADNr.

20 L'amplification de la partie ADNr 16S de la souche bactérienne selon l'invention a été effectuée en utilisant deux amorces universelles 27f de séquence SEQ n°2 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r de séquence n°3 (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'). La séquence ADNr 16S caractérisant la souche bactérienne selon l'invention est la séquence SEQ n°1 :

25 1 cgaacgctgg ccgcgtgctt aacacatgca agtcgaacga tgaaccactt cgggtggggat
61 tagtggcgaa cgggtgagta acacgtgggc aatctgccct tcactctggg acaagccctg
121 gaaacgggggt ctaataccgg atacaacact ctcgggcatc cgatgagtgt ggaaagctcc
181 ggcggtgaag gatgagcccg cggcctatca gcttggttgg gaggtaacgg ctcaccaagg

241 cgacgacggg tagccggcct gagagggcga ccggccacac tgggactgag acacggccca
 301 gactcctacg ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg ggcgaaagcc tgatgcagcg
 361 acgccgcgtg agggatgacg gccttcgggt tgtaaacctc tttcagcagg gaagaagcga
 421 aagtgcgggt acctgcagaa gaagcgccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac
 5 481 gtagggcgcg agcgttgctc ggaattattg ggcgtaaaga gtcgtaggc ggtctgtcgc
 541 gtcggatgtg aaagcccggg gcttaacccc gggctgcat tcgatacggg cagactagag
 601 tgtggtaggg gagatcggaa ttcttggtgt agcggtgaaa tgcgcagata tcaggaggaa
 661 caccggtggc gaaggcggat ctctgggcca ttactgacgc tgaggagcga aagcgtgggg
 721 agcgaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cggtgggaaac taggtgttgg
 10 781 cgacattcca cgtcgtcggg gccgcagcta acgcattaag ttccccgcct ggggagtacg
 841 gccgcaaggc taaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcagcg gagcatgtgg
 901 ctttaattcga cgcaacgcga agaaccctac caaggcttga catacaccgg aaacggccag
 961 agatggtcgc ccccttgtgg tcggtgtaca ggtggtgcat ggctgtcgtc agctcgtgtc
 1021 gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt gttctgtgtt gccagcatgc
 15 1081 ccttcgggggt gatggggact cacaggagac tgccggggtc aactcggagg aagggtgggga
 1141 cgacgtcaag tcatcatgcc cttatgtct tgggctgcac acgtgctaca atggcaggta
 1201 caatgagctg cgaagccgtg aggcggagcg aatctcaaaa agcctgtctc agttcggatt
 1261 ggggtctgca actcgacccc atgaagtcgg agttgctagt aatcgcagat cagcagtgtc
 1321 gcggtgaata cgttcccggg cttgtacac accgcccgtc acgtcacgaa agtcggtaac
 20 1381 acccgaagcc ggtggcccaa ccccttgtgg gagggagctg tcgaagggtg gactggcgat
 1441 tgggacgaag tcgtaacaag gtagccg

Cette séquence SEQ n°1 est déposée dans la banque de donnée de nucléotides Pubmed/NCBI, sous la référence : DQ385990.

La présente invention vise également les souches mutantes de la souche
 25 barakatei I-3640 .

Par « souche mutante », on entend désigner toute souche pouvant être obtenue par mutation sélective à partir de la souche barakatei I-3640 .

Les souches mutantes selon l'invention sont obtenues en mettant la souche barakatei I-3640 en présence d'un agent mutagène physique, tel qu'un rayonnement, ou d'un agent mutagène chimique, ou différentes concentrations de la Nitrosoguanidine puis à sélectionner dans un milieu approprié les mutants d'intérêt restants en utilisant leur spectre antibiotique.

Avantageusement, les souches mutantes obtenues présentent des capacités de production de certains métabolites, de 10 à 100 fois plus élevées que celles de la souche selon l'invention non mutée.

La souche barakatei selon l'invention ou ses souches mutantes, montrent des activités biologiques importantes vis-à-vis de bactéries comme *Micrococcus luteus*, *Bacillus substillus*, *Bacillus cereus* et *Streptomyces scabies*, et contre des champignons phytopathogènes comme *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *Botrytis cinerea*, *Phythium ultimum*, *Verticillium dahliae*.

La souche barakatei selon l'invention ou ses souches mutantes présentent également une forte activité contre les champignons causant les maladies du bois de la vigne comme *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeomoniella aleophilum*, *Etya lata*, *Fomitiporia mediterranea* et *Botryosphaeria obtusa*.

Le spectre d'activités de la souche barakatei selon l'invention vis-à-vis de certains micro-organismes est présenté dans le tableau ci-dessous. Quatre degrés d'activité ont été mesurés :

- pas d'activité
- + activité (inhibition de 10 à 15 mm)
- + forte activité (inhibition de 15 à 20 mm)
- ++ très forte activité (inhibition supérieure à 20 mm)

Micro-organisme	Activité de
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	++
<i>Phaeomoniella aleophilum</i>	++
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	++
<i>Eutypa lata</i>	++
<i>Botryosphaeria obtusa</i>	++
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	++
<i>Sclerotium rolfsii</i>	+++
<i>Botrytis cinerea</i>	++
<i>Verticillium dahliae</i>	+++
<i>Fusarium oxysporum</i>	++
<i>Pythium ultimum</i>	++
<i>Streptomyces scabies</i>	+++
<i>Micrococcus luteus</i>	+++
<i>Bacillus subtilis</i>	+++
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-

La souche selon l'invention ou une souche mutante dérivée de celle-ci peut donc être utilisée en tant qu'agent antibactérien et/ou en tant qu'agent anti-fongique pour la protection des plantes.

III. Filtrat de culture susceptible d'être produit par fermentation de la souche selon l'invention

Selon un autre aspect l'invention vise l'utilisation de la souche barakatei I-3640 ou d'une souche mutante pour l'obtention par fermentation dans un milieu liquide, d'une composition comprenant notamment des métabolites.

La souche barakatei selon l'invention peut en effet être utilisée pour produire par fermentation une composition, ou filtrat de culture, contenant notamment des métabolites secondaires.

Le filtrat de culture est obtenu par culture de la souche barakatei dans un milieu liquide dans un fermenteur.

Le procédé de production est le suivant :

- culture de bactéries barakatei selon l'invention ou une souche mutante dans un fermenteur à 30°C pendant 10 jours, dans un milieu liquide constitué de Glucose, d'extrait de Malte, d'extrait de levure et d'eau,

- centrifugation du mélange,
- filtration à travers un filtre avec des pores de 45µm de diamètre,
- récupération du filtrat de culture.

Le filtrat de culture est une composition comprenant les éléments du milieu de culture et les métabolites produits pendant la fermentation.

- L'étape de fermentation peut être mise en œuvre selon le protocole décrit en suivant.

Un prélèvement de la souche à partir d'une culture inclinée mature est inoculé dans un flacon Erlenmeyer contenant 50mL de milieu de culture stérile contenant 0,4% de glucose, 1% d'un extrait de malt et 0,4% d'un extrait de levure (ajusté au pH 7,2 avant stérilisation) et mis en culture sur un agitateur rotatif (250 tours par minute) à 30°C pendant 10 jours.

Les étapes de centrifugation et de filtration peuvent être mises en œuvre selon le protocole décrit en suivant.

Le bouillon de culture (10 litres) est centrifugé à 12 000 tours par minute pendant 15 minutes, et le surnageant est extrait deux fois avec un volume égal d'acétate d'éthyle. La phase organique est déshydratée avec du Na₂SO₄ et séchée avec un évaporateur rotatif. L'extrait brut rouge obtenu est suspendu

dans un volume minimum de MeOH, puis filtré à travers un filtre avec des pores de 45µm de diamètre.

Le filtrat de culture issu de la fermentation de la souche selon l'invention, peut être utilisée pour la lutte contre les agents phytopathogènes et/ou pour stimuler la croissance des plantes.

IV. Composés actifs susceptibles d'être produits par fermentation de la souche selon l'invention

Selon un autre aspect l'invention vise l'utilisation de la souche barakatei I-3640 ou d'une souche mutante pour l'obtention par fermentation dans un milieu liquide, de composés actifs.

La souche barakatei selon l'invention peut en effet être utilisée pour produire par fermentation des métabolites secondaires, notamment des antibiotiques.

Ces composés actifs peuvent être obtenus par :

- culture de la souche barakatei I-3640 ou d'une souche mutante dans un milieu liquide dans un fermenteur,
- centrifugation,
- filtration,
- puis purification.

Les étapes de fermentation, centrifugation et filtration sont telles que décrites au III.

La production de l'activité antibactérienne totale est réalisée sur une gélose nutritive par un test de diffusion sur gélose contre *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Mucore* sp.. L'inhibition de la croissance est examinée après 24 heures d'incubation à 30°C. L'activité antimicrobienne est évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

Pour récupérer les composés actifs produits par la souche selon l'invention ou une souche mutante et présents dans le filtrat de culture, l'étape de filtration est

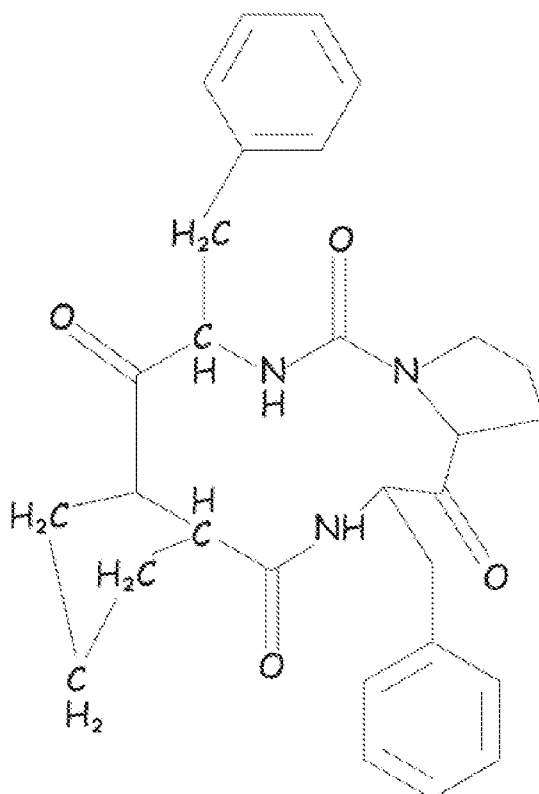
suivie d'une étape de purification des composés actifs, qui peut être réalisée comme indiqué ci-après.

Le filtrat est élué par HPLC en phase inverse dans les conditions suivantes pour obtenir des produits purs : colonne upisphere UP5ODB C18 (250x7,8 mm) soumise à un système solvant à gradient linéaire de 0% à 100% de MeOH pendant 45 minutes et à gradient isocratique à 100% MeOH dans H₂O pendant 20 minutes, avec un débit de 1ml/minute et une détection UV à 220 nm. Les fractions correspondant aux pics actifs sont obtenues par test contre *Bacillus subtilis* et *Mucore ramanniamus*.

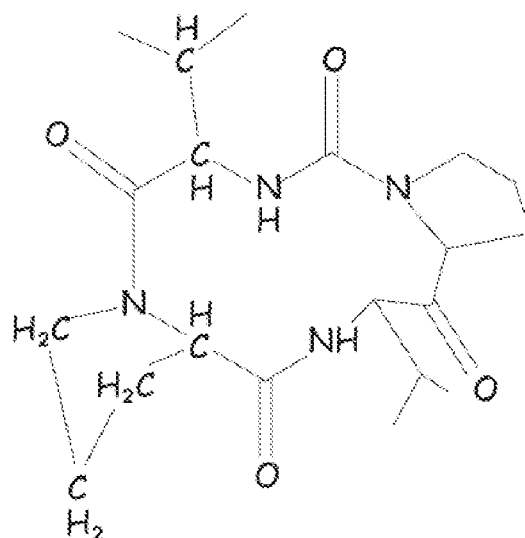
- 10 Les composés actifs obtenus sont notamment des antibiotiques impliqués dans la lutte biologique et le contrôle des maladies phytopathogènes.

La souche barakatei selon l'invention produit 8 antibiotiques différents, dont les composés bioactifs : C1, C2, C3 et C4.

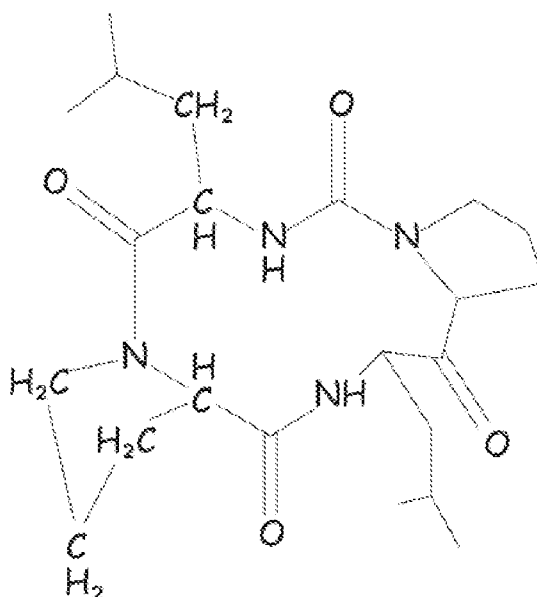
- Les composés C1, C2 et C3 sont des tétracyclopeptides de formules connues
15 présentant une conformation nouvelle et le composé C4 est une nouvelle molécule.
Le composé C1 est un tétracyclopeptide et répondant à la formule suivante :



Le composé C2 est un tétracyclopeptide répondant à la formule suivante :



5 Le composé C3 est un tétracyclopeptide répondant à la formule suivante :



Caractérisation spectroscopique et physicochimique :

Les décalages chimiques (arrangements) des atomes ^1H et ^{13}C , des composés C1, C2 et C3 ont été mesurés en spectroscopie à résonance magnétique nucléaire

RMN. Le décalage chimique dans une molécule, décrit la dépendance des niveaux d'énergie magnétique nucléaire avec l'environnement électronique.

Les décalages chimiques des atomes ^1H et ^{13}C , pour les composés C1, C2 et C3 (dans du CD_3OD à 298K) sont décrits dans les tableaux suivants :

Position	C1	
	δC	δH (mult, J)
Pro- α	58,6	4,22 (1H, m)
Pro- β	28,1	2,33/1,92 (2H, m)
Pro- γ	21,8	1,98 (2H, m)
Pro- δ	44,8	3,55 (2H, m)
Pro-Carbonyl	170,9	
Val- α	60,1	4,06 (1H, m)
Val- β	28,4	2,50 (2H, d sept, 2,6 , 7,0)
Val- γ	15,2 ; 17,5	1,11 ; 0,94 (6H, d, 7,0)
Val-Carbonyl	165,9	

5

Position	C2	
	δC	δH (mult, J)
Pro- α	58,6	4,22 (1H, m)
Pro- β	27,7	2,32/2,05 (2H, m)
Pro- γ	22,2	2,05/1,94 (2H, m)
Pro- δ	45,1	3,53 (2H, m)
Pro-Carbonyl	171,4	
Leu- α	58,3	4,14 (1H, m)
Leu- β	38,0	1,92/1,54 (2H, m)
Leu- γ	28,4	1,90 (6H, m)
Leu- δ	21,9 ; 20,8	0,97 ; 0,98 (6H, d, 6,4)
Leu-Carbonyl	167,5	

Position	C3	
	δC	δH (mult, J)
Pro- α	58,7	4,09 (1H, dd, 8,2, 6,2 1,8)
Pro- β	28,0	2,11/1,22 (2H, m)
Pro- γ	21,3	1,83 (2H, m)
Pro- δ	44,5	3,55/3,39 (2H, m)
Pro-Carbonyl	169,5	
Phe-NH		8,00 (1H, br s)*
Phe- α	56,3	4,47 (1H, dd, 4,9 1,8)
Phe- β	36,8	3,19 (2H, dd, 14,3, 4,9)
Phe- γ	135,9	
Phe- δ	129,7	7,26 (2H, d, 7,3)
Phe- ϵ	128,0	7,31 (2H, m)
Phe- ζ	126,7	7,30 (1H, m)
Phe-Carbonyl	165,5	

Les molécules C1, C2 et C3 extraites et purifiées à partir de la souche barakatei selon l'invention ou d'une souche mutante présentent une configuration originale
 5 qui confère à ces composés actifs des caractéristiques particulières, notamment une activité antibactérienne et antifongique et une activité de stimulation de la croissance des plantes.

Les composés C1, C2 et C3 obtenus à partir d'une souche barakatei selon l'invention ou d'une souche mutante sont solubles dans le méthanol et le DMSO.

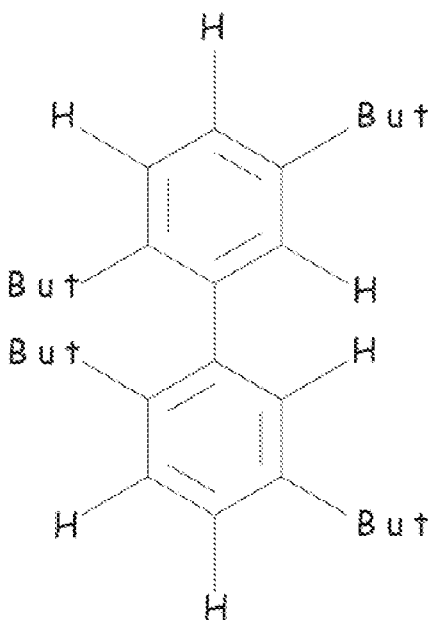
10 Ils montrent des activités biologiques importantes vis-à-vis de bactéries *Bacillus subtilis*, *Streptomyces scabies*, *Candida albicans* et *Mucor rammianus*. En revanche, ils n'ont aucun effet sur les bactéries gram-négatif.

L'activité antibiotique de chaque molécule C1, C2 et C3 a été évaluée contre différents microorganismes tests afin de déterminer les concentrations minimales à utiliser pour inhiber le développement de ces microorganismes.

Microorganismes	Concentration en ug/ml		
	C1	C2	C3
<i>B. subtilis</i>	2	2	2
<i>Micrococcus luteus</i>	2	2	2
<i>Streptomyces scabies</i>	2	2	2
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Mucor rammaniamus</i>	8	4	4
<i>C. albicans</i>	8	4	4

5

Le composé C4 est une nouvelle molécule benzénique de formule :



Le composé C4 est très hydrophobe. Il est soluble dans le méthanol et montre une activité biologique importante vis-à-vis de *Mucor rammaniamus*.

Ces composés C1, C2, C3 et C4 produits par la souche I-3640, susceptibles d'être obtenus par un procédé d'extraction et de purification simple à mettre en œuvre à partir d'une souche barakatei I-3640 ou d'une souche mutante, présentent un réel intérêt pour la lutte contre des microorganismes, en particulier contre des agents phytopathogènes, ainsi que pour la stimulation de la croissance des plantes.

V. Utilisation d'une souche barakatei selon l'invention, d'une souche mutante, du filtrat de culture ou d'un composé actif

10 Les différentes études relatives aux caractéristiques de la souche I-3640 ou d'une souche mutante, et de la composition (filtrat de culture) ou des composés actifs produits par fermentation de cette souche, montrent que ladite souche, ladite composition et lesdits composés actifs sont très efficaces du point de vue de leurs propriétés antibactériennes et antifongiques, ce qui leur confère
15 notamment la capacité d'être utilisés en tant qu'agents de lutte biologique.

Ils peuvent donc être utilisés en tant qu'agent antibactérien et/ou antifongique pour la protection des plantes et la lutte biologique contre des agents phytopathogènes.

Ils peuvent spécifiquement être utilisés pour la protection des plantes vis-à-vis
20 de bactéries gram-positif ou encore vis-à-vis des champignons phytopathogènes.

Selon un autre aspect la souche barakatei selon l'invention, une souche mutante ou une composition (filtrat de culture) ou un composé actif produits par fermentation à partir de cette souche, sont également particulièrement utiles pour stimuler la croissance des plantes.

25 En particulier la souche I-3640 une souche mutante, le filtrat de culture ou un composé actif sont capables de stimuler la partie racinaire des plantes, en augmentant le nombre de poils absorbants racinaires, de stimuler la partie

aérienne ainsi que la floraison des plantes. Ils sont également capables d'améliorer l'assimilation des nutriments.

Des tests ont été effectués pour illustrer l'action de la souche selon l'invention, d'une souche mutante, du filtrat de culture produit par fermentation et de ses
5 composés actifs, sur les plantes.

1) Etude des propriétés antibactériennes et anti-fongiques

1.a) Etude de la protection de la Vigne contre les maladies du bois

Cette étude a pour objectif de montrer la capacité de la souche selon l'invention, du filtrat de culture ou de ses composés actifs à protéger in vitro des plants de
10 vigne contre des maladies du bois (ESCA, Ethypiose, BDA) causées par des champignons phytopathogènes.

Le protocole opératoire est le suivant.

Des entre nœuds de vitro-plants de vigne (cépage sauvignon et cépage colombar) de 5 semaines sont découpés, traités avec des spores de la souche
15 I-3640 selon l'invention puisensemencés dans un milieu MS sous conditions contrôlées.

Après 5 semaines d'incubation, les feuilles de chaque vitro-plant sont traitées par une suspension de spores de champignons phytopathogène *Eutypia lata*.

La lecture des résultats est réalisée après une semaine d'infection.

20 Les résultats obtenus montrent que la souche I-3640 est capable de protéger la vigne contre les infections de champignons phytopathogènes.

1.b) Etude de la protection de la Vigne contre *Botrytis cinerea*

Cette étude a pour objectif de montrer la capacité de la souche selon l'invention à protéger des plants de vigne contre *Botrytis cinerea*, champignon
25 phytopathogène responsable de la pourriture grise, une maladie cryptogamique qui sévit sur plusieurs cultures d'intérêt agronomique majeur comme la vigne, le tournesol ou la tomate.

Les essais sont menés sur des feuilles de plants de vigne au même stade de maturation. Les feuilles sont d'abord traitées par le champignon *Botrytis cinerea* pendant 24 heures, puis certaines sont traitées par pulvérisation foliaire du filtrat de culture ou de la souche selon l'invention.

- 5 Les résultats obtenus après 24 heures sont représentés sur les figures 1a (témoin sans traitement), 1b (feuilles traitées avec *Botrytis cinerea* puis la souche selon l'invention) et 1c (feuille traitées avec *Botrytis cinerea*). Les feuilles des plants de vigne mises en contact avec *Botrytis cinerea* puis traitées avec la souche selon l'invention (Figure 1b) sont plus vertes et ne présentent pas de
- 10 tâches par rapport à celles non traitées (Figure 1c).

2) Activation des systèmes de défense naturels des plantes

L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité de la souche et de ses composés actifs, à activer des gènes de défense naturelle des plantes, en particulier d'*Arabidopsis thaliana*.

- 15 Le protocole opératoire est décrit en suivant.

Les plantules d'*Arabidopsis thaliana* sont pré-traitées au niveau des racines par I-3640 ou par deux de ses composés actifs, puis sont réensemencées sur le milieu de culture Gamgorg B5 gélosé déjà inondé par une suspension de spores de *Sclerotium rolfsii* (10^5 ufc/ml). L'ensemble est incubé dans une chambre de

20 culture à 25°C.

La lecture des résultats est effectuée après une semaine.

On constate que le traitement de plantules d'*Arabidopsis thaliana* par la souche et par ses composés actifs, active l'expression des gènes liés à la défense des plantes.

- 25 L'expression des gènes de défense d'*Arabidopsis thaliana* est mesurée en utilisant la technique de la RT-PCR. Les gènes de défense des plantes étudiés sont PR1 (gène responsable de la synthèse des molécules antifongiques des plantes), PDF1.2a (gène responsable de l'activation des voie éthylène et

jasmonate, deux voies importantes de la défense des plantes) et PAL1.

La RT-PCR est réalisée sur des plantules cultivées pendant 10 jours. Elle est basée sur l'extraction de leur ARN qui est ensuite converti en ADNc en utilisant le SuperscriptTM II RNase H-Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Carisbad, USA) avec Oligo(dT)22.

Les échantillons d'ADNc obtenus sont amplifiés dans un mélange de produits de PCR.

Les amorces spécifiques utilisés sont :

- pour PR1 : PR1 f de séquence SEQ n°4 : 5' - CTG GCT ATT CTC GAT TTT TAA TCG - 3', PR1 r de séquence SEQ n°5 : 5' - TCC TGC ATA TGA TGC TCC TTA TTG - 3' ; excepté le produit de dimension de 562 pb,
- pour PDF1.2a : PDF1 f de séquence SEQ n°6 : 5' - TCA TGG CTA AGT TTG CTT CCA TCA TCA CCC - 3', PDF1 r de séquence SEQ n°7 : - 5' GTA GAT TTA ACA TGG GAC TGC GAC - 3' ; excepté le produit de dimension de 252 pb,
- pour PAL1 : PAL1 f de séquence SEQ n°8 : 5' - CGG AGG AGG AGT GGA CGC TAT - 3', PAL1 r de séquence SEQ n°9 : 5' - TGC GAC ACC GTT TTT GGT TCT - 34 ; excepté le produit de dimension de 378 pb.

Le témoin de PCR est réalisé par l'utilisation du gène de nettoyage EF1 A4 (Liboz et al., 1990) : EF1 f de séquence SEQ n°10 : 5' - ATG CCC CAG GAC ATC GTG ATT TCA - 3', EF1 r de séquence SEQ n°11 : - TTT GCG GCA CCC TTA GCT GGA TCA - 3' ; excepté le produit de dimension de 708 pb.

Les conditions thermiques des cycles contiennent une étape de dénaturation initiale à 94°C, 2 minutes, suivie par 34 cycles pour PR1, PDF1.2a et PAL1 ou par 26 cycles pour EF1 A4, de 94°C, 30 secondes, 52°C 30 secondes, 72°C 30 secondes et se termine à 72°C pendant 10 minutes.

Le produit PCR est chargé sur gel d'électrophorèse puis visualisé sous UV par fluorescence du bromure d'éthidium.

Les résultats d'expériences de la RT-PCR, présentés sur les figures 2a à 2c, montrent que la souche active l'expression des gènes de défense des plantes PR1 (gène responsable de la synthèse des molécules antifongiques des plantes) et PDF1.2a (gène responsable de l'activation des voie éthylène et jasmonate, deux

5 voies importantes de la défense des plantes).

L'activation des ces gènes PR1 et PDF1.2a par la souche selon l'invention conduit à la production :

- d'antibiotiques végétaux, les phytoalexines,
- de protéines de défense, les PR-protéines, et
- 10 - de composés destinés à renforcer les parois des cellules végétales.

3) Etude des propriétés phytostimulatrices

Le but de cette étude est de montrer la capacité de la souche selon l'invention et de ses composés actifs, à stimuler la croissance des plantes.

L'étude est réalisée sur des plantules d'*Arabidopsis thaliana*.

- 15 Les plantules sont pré-traitées au niveau des racines par la souche I-3640 selon l'invention, son filtrat de culture ou ses composés actifs obtenus après fermentation et purification, puis sont réensemencées sur un milieu de culture Gamgong B5. L'ensemble est incubé dans une chambre de culture à 25°C.

La synthèse de la lecture des résultats effectuée après une semaine d'incubation

20 est présentée dans le tableau suivant :

	Témoin	Traité avec la souche selon l'invention
Poids (g)	0,140	0,235
Taille des plants (mm)	38	46
Longueur des racines (mm)	24	36

Ces résultats montrent bien que la souche selon l'invention stimule clairement la croissance des plantes, notamment des plantules d'*Arabidopsis thaliana*.

En particulier elle stimule la partie racinaire des plantes. Elle permet également d'augmenter leur taille et leur poids de façon considérable.

4) Amélioration de l'assimilation des nutriments par les plantes

- 5 Cette étude a pour objectif d'évaluer l'effet de la souche I-3640 , en particulier du filtrat de culture selon l'invention, sur l'assimilation des nutriments par les plantes.

Les essais sont menés sur le blé tendre.

- 10 Les graines de blé sont stérilisées en les plongeant dans un mélange d'eau distillée et de javel pendant 10 minutes. Elles sont ensuite rincées trois fois dans l'eau distillée stérile et séchées sur du papier Wattman sous une hotte.

Les graines sont ensuite plantées dans des pots en plastique perforé contenant chacun 500 g de terre. Chaque pot reçoit 10 graines plantées à 1 cm de profondeur. Les pots sont irrigués quotidiennement.

- 15 Après deux semaines de croissance, les feuilles sont traitées par pulvérisation foliaire avec le filtrat de culture selon l'invention (obtenu par la mise en œuvre du procédé au point III) ou avec de l'eau (témoin) ou avec de l'engrais organominéral (témoin positif). Le filtrat est mélangé avec de l'eau. Différentes proportions ont été testées (30% et 50%).

- 20 Les tests sont répétés cinq fois pour chaque essai.

Après trois semaines de croissance, les feuilles sont broyées à 500 microns, puis séchées à l'étuve à 105°C jusqu'à poids constant.

L'assimilation de l'azote est mesurée par la méthode de Dumas. Pour les autres minéraux on effectue une analyse par spectrométrie d'émission atomique.

- 25 Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	Azote	Phosphore	Potassium	Calcium	Magnésium	Bore	Cuivre	Fer	Manganèse	Zinc
Témoin (Eau)	1,24	0,75	2,47	0,68	0,19	14	4,86	41,1	319	41,7
Engrais Organo minéral	1,74	0,54	2,27	0,74	0,25	17,3	4,63	232	1048	42,2
Filtrat culture 30%	1,73	0,68	2,55	0,95	0,29	17,5	8,39	346	1986	59
Filtrat culture 50%	1,77	0,63	2,56	0,82	0,28	14,9	7,64	367	1684	58,7

Les résultats pour l'Azote total, le Phosphore total, le Potassium total, le Calcium total et le Magnésium total sont donnés en pourcentage de matière sèche.

Les résultats pour le Bore total, le Cuivre total, le Fer total, le Manganèse total, le Zinc total sont donnés en mg/kg de matière sèche.

- 5 On constate que l'invention permet d'améliorer significativement l'assimilation des nutriments par les plantes et donc de favoriser leur croissance.

REVENDICATIONS

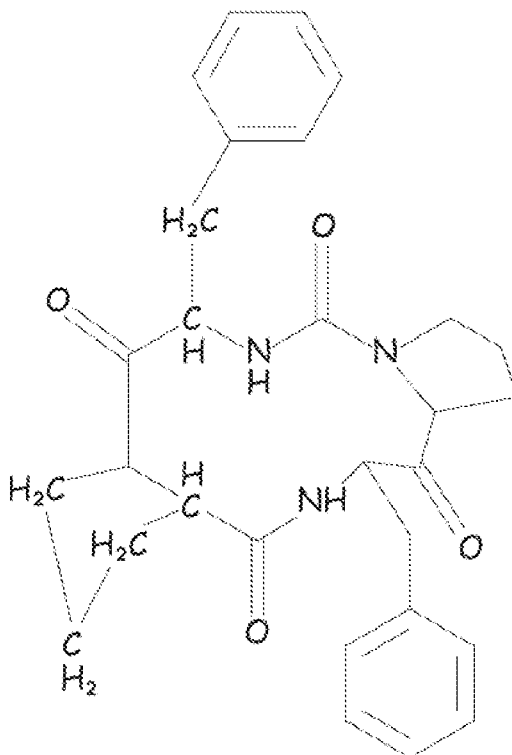
1. Souche *Streptomyces barakatei* déposée à la CNCM sous le numéro I-3640 et au LMG sous le numéro P-23734, caractérisée par une séquence de l'ADNr 16S SEQ n°1.

2. Utilisation de la souche selon la revendication 1 ou d'une souche mutante, pour l'obtention d'un filtrat de culture, par fermentation dans un milieu liquide de ladite souche, centrifugation et filtration.

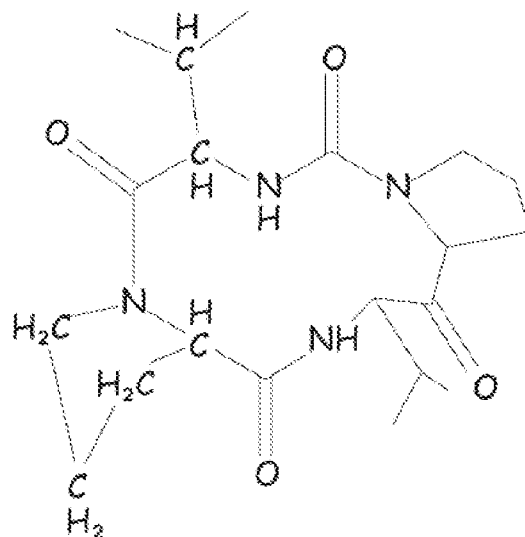
3. Utilisation de la souche selon la revendication 1 ou d'une souche mutante, pour l'obtention de composés actifs par fermentation dans un milieu liquide de ladite souche, centrifugation, filtration et purification.

4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisé en ce que au moins un des composés actifs est un des composés tétracyclopeptides suivants :

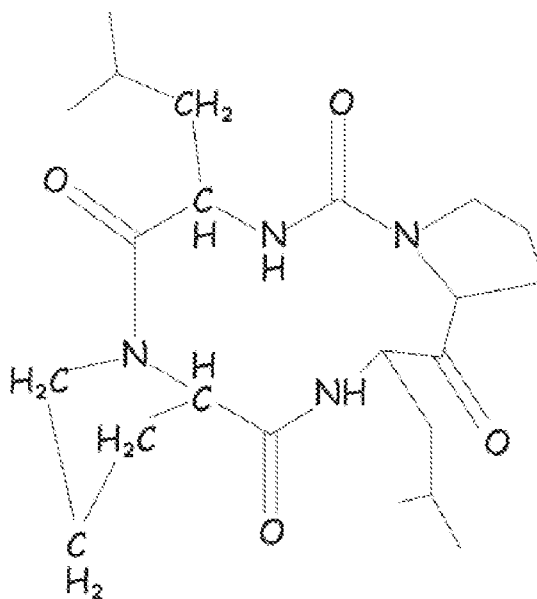
- composé C1 de formule :



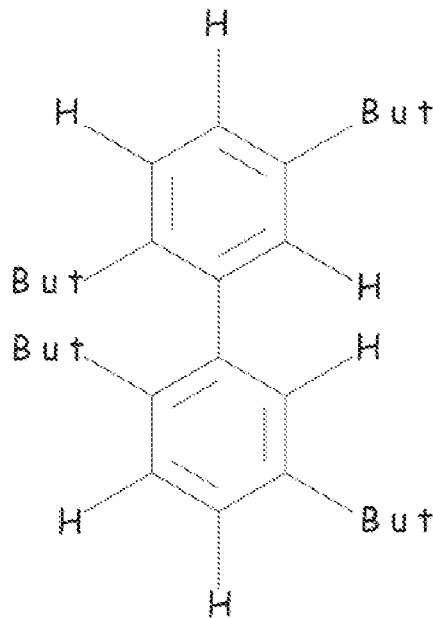
- composé C2 de formule :



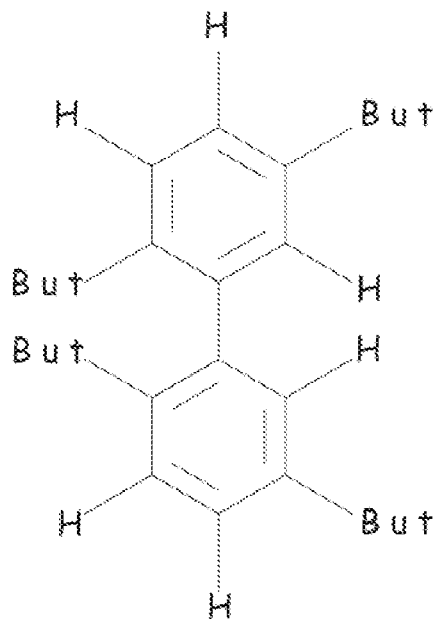
- composé C3 de formule :



5. Utilisation selon la revendication 3, caractérisé en ce que au moins un des composés actifs est un composé benzénique présentant la formule suivante :



6. Composé actif susceptible d'être obtenu par fermentation d'une souche
5 selon la revendication 1, caractérisé par la formule suivante :



7. Utilisation d'une souche selon la revendication 1, d'une souche mutante, d'un filtrat de culture obtenu selon la revendication 2 ou d'un composé actif

obtenu selon l'une des revendications 3 à 5, en tant qu'agent antibactérien pour la protection des plantes et la lutte biologique contre des agents phytopathogènes.

8. Utilisation selon la revendication 7, pour la protection des plantes vis-à-vis de bactéries gram-positif.

9. Utilisation d'une souche selon la revendication 1, d'une souche mutante, d'un filtrat de culture obtenu selon la revendication 2 ou d'un composé actif obtenu selon l'une des revendications 3 à 5, en tant qu'agent antifongique pour la protection des plantes et la lutte biologique contre des agents phytopathogènes.

10. Utilisation d'une souche selon la revendication 9, pour la protection des plantes vis-à-vis de *Botrytis cinerea*.

11. Utilisation d'une souche selon la revendication 1, d'une souche mutante, d'un filtrat de culture obtenu selon la revendication 2 ou d'un composé actif obtenu selon l'une des revendications 3 à 5, pour activer les systèmes de défense naturels des plantes.

12. Utilisation selon la revendication 11, pour stimuler l'expression des gènes de défense des plantes PR1 et PDF1.2a.

13. Utilisation d'une souche selon la revendication 1, d'une souche mutante, d'un filtrat de culture obtenu selon la revendication 2 ou d'un composé actif obtenu selon l'une des revendications 3 à 5, pour stimuler la croissance des plantes.

14. Utilisation d'une souche selon la revendication 1, d'une souche mutante, d'un filtrat de culture obtenu selon la revendication 2 ou d'un composé actif obtenu selon l'une des revendications 3 à 5, pour améliorer l'assimilation des nutriments par les plantes.

15. Utilisation selon la revendication 14 pour améliorer l'assimilation par les plantes du Potassium, du Zinc, du Bore, du Calcium, du Cuivre, du Phosphore, du Magnésium, du Fer, du Manganèse et de l'Azote.

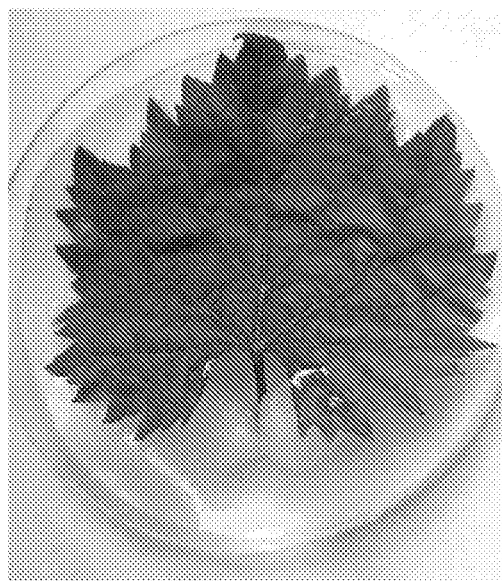


Fig. 1a

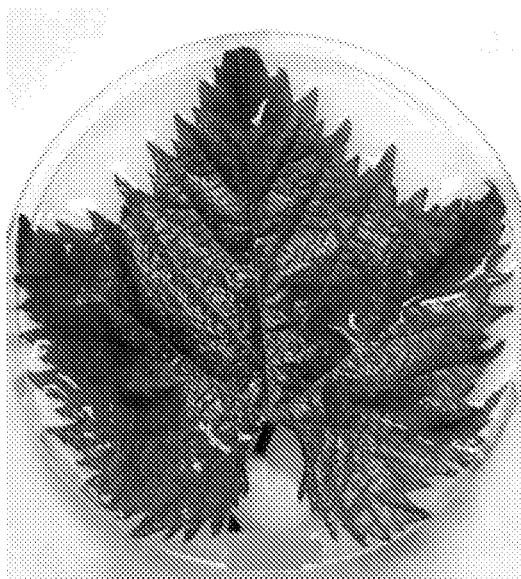


Fig. 1b



Fig. 1c

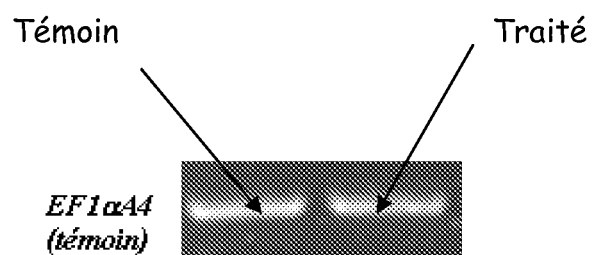


Fig. 2a

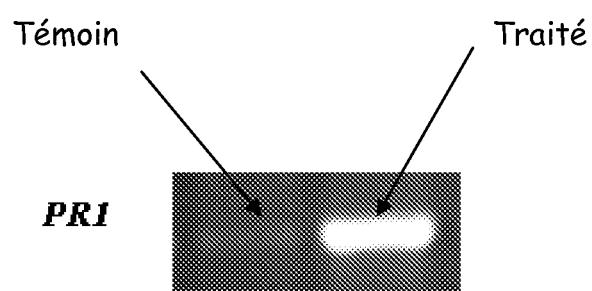


Fig. 2b

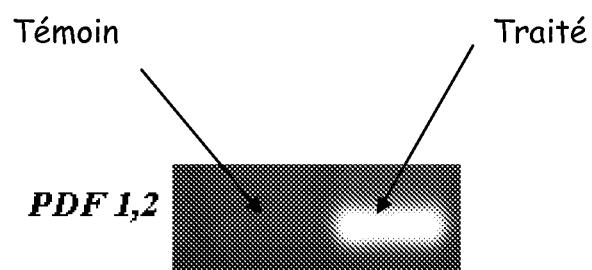


Fig. 2c