

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 25.07.17.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 01.02.19 Bulletin 19/05.

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) : POLLENERGIE Société par actions
simplifiée — FR et

72 Inventeur(s) : CARDINAULT NICOLAS, DUDOIT
VERHAEGHE AURIANE, MERTZ CHRISTIAN, BRAT
PIERRE et CHILLET MARC.

73 Titulaire(s) : POLLENERGIE Société par actions sim-
plifiée, CENTRE DE COOPERATION INTERNATIO-
NAL EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE
DEVELOPPEMENT (CIRAD).

74 Mandataire(s) : AQUINOV.

54 EXTRAIT HYDROSOLUBLE DE PROPOLIS, PROCEDE D'OBTENTION ET UTILISATION POUR PREVENIR ET/
OU LUTTER CONTRE LES MALADIES DES VEGETAUX.

57 L'objet de l'invention est un extrait hydrosoluble ne
contenant pas d'alcool, obtenu à partir d'au moins une pro-
polis choisie parmi la propolis de Peuplier, la propolis de
Baccharis et la propolis de Dalbergia, et son utilisation pour
la prévention ou le traitement des maladies des végétaux.



EXTRAIT HYDROSOLUBLE DE PROPOLIS, PROCEDE D'OBTENTION ET UTILISATION POUR PREVENIR ET/OU LUTTER CONTRE LES MALADIES DES VEGETAUX

La présente invention concerne un extrait particulier de propolis, son procédé d'obtention et son utilisation pour prévenir ou lutter contre les maladies des végétaux, et notamment pour le traitement des fruits et/ou des légumes en post-récolte.

Les végétaux sont sans cesse menacés par des maladies causées par des microorganismes :
5 virus, bactéries ou encore champignons. Sur les cultures vivrières, fruitières et légumières et même sur les cultures ornementales, ces maladies sont responsables d'importantes pertes de rendement. Ce sont parfois des récoltes, voire des filières toutes entières, qui sont anéanties.

Ces maladies peuvent toucher les plantes en culture, mais également leurs éventuels fruits
10 et légumes produits par ces plantes, avant et/ou après la récolte. Pour protéger les fruits et légumes contre les attaques pathogènes et par conséquent diminuer les pertes et accroître leur durée de conservation, la majorité d'entre eux sont traités pendant leur phase de développement sur la plante et après la récolte.

Toutefois, la majorité des traitements existants consiste en l'utilisation de fongicides
15 chimiques qui présentent des inconvénients majeurs liés aux abus et risques de pollution, au développement de souches résistantes, et à l'impact négatif sur la santé et l'environnement. De plus, ces traitements sont en total opposition avec la volonté des consommateurs de s'orienter vers une agriculture biologique et des volontés politiques de réduction des phytosanitaires chimiques.

20 Il existe par conséquent un besoin urgent et important de produits naturels, respectueux de l'environnement et de la santé humaine et animale et c'est l'objectif de l'invention d'y répondre.

A cet effet l'invention propose un extrait de propolis particulier.

La propolis est connue et a déjà été décrite pour ses propriétés antimicrobiennes et
25 antifongiques. Toutefois, en pratique, la propolis n'est pas utilisée pour traiter les plantes

et/ou les fruits et/ou les légumes en particulier du fait du caractère hydro-alcoolique et non standardisé des extraits existants testés, qui empêche toute utilisation phytosanitaire du produit. En effet l'utilisation d'extraits contenant de l'alcool est proscrite dans ces traitements. De plus, seuls des essais in vitro de propolis d'origine botanique plus ou moins bien identifiée ont été réalisés et aucun essai in vivo n'a été présenté jusqu'alors démontrant la réelle efficacité de la propolis.

Pour répondre à son objectif et pallier ces inconvénients, l'invention vise spécifiquement un extrait liquide hydrosoluble ne contenant pas d'alcool, comprenant au moins 5g de polyphénols totaux par litre d'extrait, et obtenu à partir d'au moins une propolis choisie parmi la propolis de Peuplier, la propolis de Baccharis et la propolis de Dalbergia.

Avantageusement, la nature hydrosoluble de l'extrait permet une solubilisation des polyphénols qui, combinée à la teneur importante en ces molécules, permet une très grande efficacité de l'extrait pour prévenir et/ou lutter contre les phytopathogènes. En outre, comme l'extrait ne contient pas d'alcool, il peut être utilisé sur les végétaux, en particulier sur les plantes (toute partie, y compris les éventuels fruits et/ou légumes) en culture, ou en post récolte, notamment pour les fruits et/ou légumes. Il est écologique, respectueux de la santé humaine, et répond aux réglementations en vigueur concernant les produits phytosanitaires, tout en présentant une grande efficacité dans la prévention et la lutte contre les phytopathogènes.

L'invention a par conséquent également pour objet l'utilisation de l'extrait pour prévenir et/ou lutter contre les maladies des végétaux, en particulier pour le traitement post-récolte des fruits et/ou légumes.

L'invention vise aussi un procédé d'obtention de l'extrait qui comprend notamment l'utilisation d'une solution tamponnée ou tampon.

L'invention est à présent décrite en détails.

DEFINITIONS

Par « extrait » au sens de l'invention on entend un extrait obtenu à partir d'une ou plusieurs propolis d'origine botanique spécifique. Un extrait est constitué par au moins une molécule ou par un mélange de plusieurs molécules issues d'une propolis d'origine botanique spécifique.

Par « plante » au sens de l'invention, on entend tout ou partie d'une plante, c'est-à-dire la plante entière ou une partie seulement de la plante comme par exemple les racines, les feuilles, les fruits ou les légumes.

Par « végétaux » au sens de l'invention, on entend toute matière végétale, incluant notamment les plantes en culture mais également tout ou partie de plantes après récolte (feuilles, fruits, légumes, racines, etc.).

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

L'invention a donc pour objet un extrait liquide hydrosoluble de propolis, ne contenant pas d'alcool, comprenant au moins 5g de polyphénols totaux par litre d'extrait et obtenu à partir d'au moins une propolis choisie parmi la propolis de Peuplier, la propolis de Baccharis et la propolis de Dalbergia.

L'extrait selon l'invention est donc soluble dans l'eau et ne contient pas d'alcool, contrairement aux extraits classiques de propolis.

L'extrait comprend une teneur en principe actif élevée. En effet il comprend au moins 5g de polyphénols totaux par litre d'extrait, préférentiellement entre 5 et 50g par litre d'extrait, et encore plus préférentiellement entre 10 et 25g par litre d'extrait.

La nature des polyphénols est dépendante de l'origine de la ou des propolis. Préférentiellement l'extrait comprend au moins un des polyphénols suivants : Apigénine, Artepeline C, Biochanine A, chrysine, CAPE, Drupamine, galangine, Liquiritigénine, Medicarpine, Néovestitol, Pinocembrine, vestitol.

L'extrait selon l'invention est obtenu à partir d'au moins une propolis choisie parmi la propolis de Peuplier, la propolis de Baccharis et la propolis de Dalbergia. Selon un mode de réalisation préféré, l'extrait est obtenu à partir de propolis de Dalbergia, qui permet d'obtenir un mélange de polyphénols et une concentration en polyphénols totaux particulièrement efficace pour les effets recherchés dans la prévention et/ou la lutte contre les phytopathogènes.

Selon une variante, l'extrait peut être obtenu à partir d'au moins la propolis de Peuplier, la propolis de Baccharis et la propolis de Dalbergia.

L'extrait selon l'invention peut éventuellement être obtenu à partir d'au moins une autre propolis en plus de la propolis de Peuplier et/ou de la propolis de Baccharis et/ou de la propolis de Dalbergia.

L'extrait selon l'invention présente préférentiellement un pH compris entre 6 et 9, encore plus préférentiellement entre 6,5 et 8.

L'extrait se présente sous forme liquide. Cette forme liquide prête à l'emploi permet une utilisation par trempage et/ou par pulvérisation qui s'adapte à tous types de végétaux encore sur tige ou tous types de fruits et légumes en post-récolte.

L'extrait selon l'invention peut être obtenu par tout procédé permettant d'obtenir ses caractéristiques.

Préférentiellement, il est obtenu par un procédé spécifique qui constitue un objet de l'invention. Ledit procédé comprend les étapes suivantes :

- 10 - de la propolis brute, préférentiellement réduite en poudre à froid, est dissoute dans une solution hydroalcoolique, préférentiellement une solution entre 50 à 75° d'alcool ; cette étape est de façon préférée réalisée dans les conditions suivantes :
 - le ratio propolis brute / solvant hydroalcoolique est compris entre 10 et 250 g de propolis pour entre 25 et 2500 ml de solvant, et/ou
 - 15 ○ macération sous agitation permanente à température ambiante plusieurs jours ou macération par ultra sons à température < à 40°C ;
 - éventuellement filtration, préférentiellement par centrifugation ou filtration gravitaire sur filtre $\leq 5 \mu\text{m}$, de façon à éliminer la phase solide non extraite et la séparer de la phase liquide,
- 20 - une solution tamponnée, présentant un pH préférentiellement compris entre 6 et 8,5 par exemple un tampon phosphate, est ajouté à la solution hydro alcoolique, préférentiellement à raison d'un volume de tampon phosphate pour un volume de solution hydroalcoolique,
 - éventuellement une solution aqueuse de lécithine de soja, préférentiellement une
 - 25 solution de lécithine de soja compris entre 0.5 et 2.5% est ajoutée, la lécithine améliorant l'adhésion des actifs sur le fruit,
 - puis, préférentiellement, l'ensemble est agité de façon préférée à température ambiante pendant entre 20 minutes et 24 heures,
 - une filtration par centrifugation est effectuée, de façon préférée entre 5000
 - 30 et 10000rpm et préférentiellement entre 5 et 25 minutes,
 - l'alcool est évaporé, préférentiellement sous vide à une température comprise entre 35 et 45°C jusqu'à obtention d'une solution hydrosoluble sans alcool.

La mise en œuvre du procédé permet d'obtenir un extrait hydrosoluble selon l'invention. Avantageusement, l'utilisation d'une solution tamponnée permet d'extraire une quantité suffisante de principes actifs initialement insolubles dans l'eau (polyphénols) pour atteindre le niveau minimum requis pour l'efficacité recherchée.

- 5 L'extrait selon l'invention présente une efficacité importante contre les organismes phytopathogènes.

L'invention vise par conséquent l'utilisation d'un extrait de propolis selon l'invention pour la prévention ou le traitement des maladies des végétaux, en particulier pour prévenir ou traiter les maladies des végétaux causées par au moins un phytopathogène.

- 10 L'extrait peut être utilisé directement et éventuellement dans une composition avec d'autres constituants.

L'extrait selon l'invention peut selon un premier aspect être utilisé pour la prévention et/ou le traitement de maladies de plantes en cultures comme par exemple l'une des maladies suivantes : le mildiou de la vigne, l'anthracnose (mangue, papaye, banane), la pourriture de couronne (banane), la pourriture grise (tomate, vigne, fraise), la fusariose (blé).

- 15 Selon un autre aspect, l'extrait selon l'invention peut être utilisé pour le traitement post-récolte des plantes, en particulier des fruits et/ou des légumes et de façon préférée au moins un des fruits ou légumes suivants : mangue, banane, ananas, litchi, papaye, citron, fraise, kiwi, pomme, prune, abricot, tomate, asperge, carotte, salade, pomme de terre et
20 avocat.

Il peut notamment être utilisé pour prévenir ou lutter contre les maladies des fruits et/ou légumes causées par au moins un phytopathogène. Il est capable d'inhiber et/ou de retarder la croissance des phytopathogènes fongiques sur les plantes, notamment sur les fruits et/ou légumes en post-récolte.

- 25 L'invention vise en particulier l'utilisation de l'extrait de propolis pour prévenir ou lutter contre l'apparition de taches noires, l'apparition de taches brunes, la pourriture des fruits ou légumes, la pourriture des feuilles, la pourriture noire, l'apparition de moisissures noires, la pourriture brune, la pourriture grise, l'anthracnose, la pourriture « œil de bœuf » des pommes et des poires, la curvulariose, la maladie du bout noir, la pourriture de la couronne
30 de la banane, la fusariose, la pourriture sèche, la moniliose sur fruits, l'attaque des fruits à pépins, la maladie des raies noires, la maladie de Sigatoka, l'apparition de tâches blanchâtres

poudreuses, la moisissure bleue-verdâtre, la pourriture verte des agrumes, la pourriture bleue, la pourriture bleuâtre, la maladie mucoromycosis.

L'extrait de propolis selon l'invention est particulièrement efficace pour prévenir ou lutter contre les désordres causés sur les fruits et/ou les légumes par au moins un phytopathogène

5 choisi parmi : *Dothiorella dominicana*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium pallidoroseum*, *Botryodiplodia theobromae*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus nigrigans*, *Rhizopus stolonifer*, *Gloeosporium sp.* *Monilia fructicola*, *Fusarium oxysporum*, *Stemphylium*
10 *vesicarium*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Glomus mosseae*, *Phomopsis sp.*

L'extrait selon l'invention, lorsqu'il est utilisé sur des plantes en culture est pulvérisé, préférentiellement à raison de 0,1 à 2g/kg de fruits ou légumes ou plantes à traiter, encore plus préférentiellement entre 0,4 et 1,15 g/kg.

L'extrait selon l'invention lorsqu'il est utilisé sur des végétaux en post-récolte, notamment
15 des fruits et/ou des légumes, est préférentiellement appliqué :

- Par pulvérisation, de façon préférée au moins trois fois avec un intervalle de temps compris entre 30 secondes et cinq minutes, notamment entre 45 secondes et 2 minutes entre deux pulvérisations successives, et/ou
- Par trempage, de façon préférée entre 1 et 5 minutes, notamment entre 1
20 minutes et 3 minutes.

L'activité de l'extrait, de par sa composition en polyphénols, influence sur la germination des spores et limite la croissance mycélienne du pathogène.

L'invention est à présent illustrée par un exemple d'extrait et d'utilisation et par des résultats d'essais réalisés in vitro et in vivo sur des fruits.

25

EXEMPLES D'EXTRAITS

Préparation de l'extrait éthanolique de propolis

Les composés polyphénoliques sont extraits par macération de 10 g de poudre de propolis brute dans 50 ml d'éthanol à 70 % pendant 1 h, à 25°C sous une agitation magnétique, à
30 l'abri de la lumière. La solution est filtrée sur papier (papier filtre standard plissé 150 mm – Legallais, Montferrier-sur-Lez, France). Le filtrat est mis de côté. Le résidu est repris dans 50 ml d'éthanol à 70 %, les conditions d'extraction restant inchangées. Les filtrats sont enfin

rassemblés et le volume de solution ajusté à 100 ml avec de l'éthanol à 70 % (ratio d'extrait final de 1/10, m/v). L'extrait ainsi obtenu est appelé Extrait Ethanolique de Propolis (EEP).

Préparation d'extraits hydrosolubles de propolis (extraits selon l'invention)

- 5 10 ml de solution de tampon phosphate (pH 7.5) sont ajoutés à 10 ml de solution aqueuse de lécithine de soja bio (0.8 %) sous agitation magnétique à 25°C. Cette solution est ensuite ajoutée à une solution d'EEP avec un ratio volume/volume de 1/1. La solution est maintenue sous agitation pendant 1 h puis centrifugée 15 min à 25°C (7000 rpm). Le surnageant est récupéré et l'éthanol est évaporé sous vide à 35°C. L'extrait ainsi obtenu est appelé extrait
- 10 hydrosoluble de propolis (EAP).

Plusieurs origines de propolis ont été utilisées :

EAP 1 : Propolis de Peupliers : *Populus balsamifera* L , *Populus nigra*

EAP 5 : Propolis de *Baccharis dracunculifolia* DC

EAP 6 : Propolis de *Dalbergia ecastophyllum*

15

ESSAIS DEMONTRANT L'EFFICACITE DE L'EXTRAIT SELON L'INVENTION

ESSAIS IN VITRO

- Essai comparatif in vitro entre différents extraits selon l'invention issus de propolis
d'origine botanique différente, et un extrait éthanolique de propolis (détermination
 20 du pouvoir antifongique des extraits)

- Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est déterminé par la méthode de dilution en milieu gélosé. Pour ce faire, 1ml d'extrait de propolis est ajouté à 19ml de milieu de culture (PDA) stérilisé au préalable et encore liquide (~50°C). Le mélange est homogénéisé par Vortex. 20 ml sont immédiatement coulés à l'aide d'une pipette stérile
- 25 dans des boîtes de Petri. Trois témoins négatifs sont réalisés : le premier contenant uniquement le milieu nutritif en présence d'éthanol à 70 % (19/1 : v/v), le second en présence de tampon phosphate et lécithine de soja et le troisième avec de l'eau distillée stérile (19/1 : v/v). 10 µl d'inoculum de *C. musae* à une concentration de 10⁶ conidies.ml⁻¹ sont ensuite déposés au centre de chaque boîte de Pétri, et incubé à 25°C pendant 7 jours.
- 30 Tous les essais ont été réalisés en triplicata.

La mesure des 2 diamètres perpendiculaires de croissance des colonies est effectuée au bout de 7 jours. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est ainsi déterminé par la formule suivante :

$$I_{cm} = \frac{D_0 - D_{\text{extrait}}}{D_0} \times 100$$

- 5 I_{cm} représente l'inhibition de la croissance mycélienne (%), D_0 représente le diamètre moyen de croissance de *C. musae* mesuré du témoin négatif (en présence d'éthanol à 70 %) (mm) et D_{extrait} représente le diamètre moyen de croissance de *C. musae* mesuré en présence d'extrait de propolis (mm).

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 1 :

Extrait de propolis	Inhibition de la croissance mycélienne (%)
EEP	100
EAP1	33 ± 1,2
EAP5	51 ± 0,6
EAP6	100 ± 0

10 Tableau 1

ESSAIS IN VIVO : EFFICACITE D'UN EXTRAIT SELON L'INVENTION SUR LES MALADIES DE CONSERVATION DE LA

BANANE

L'essai a été effectué sur l'île de la Réunion.

- 15 Le but était d'étudier l'efficacité de l'extrait hydrosoluble selon l'invention. Pour ce faire, les 3 maladies de conservation de la banane ont été étudiées : l'anthracnose de blessure, l'anthracnose de quiescence et la pourriture de couronne, toutes les 3 causées par le *Colletotrichum musae*.

- 20 Une première récolte a été effectuée afin de réaliser un prétest pour mettre au point les conditions opératoires de l'essai *in vivo* (teneur en principes actifs et mode d'application de l'extrait sur la banane). Une fois les différents paramètres optimisés, l'essai a donc pu être mené.

- 25 Pour cette étude, tous les fruits ont été récoltés au stade vert chez un producteur local. Pour chaque traitement, 15 bananes (étude de l'anthracnose) et 15 bouquets de 3 bananes (étude de la pourriture de couronne) provenant de 15 régimes différents (chaque régime est considéré comme une répétition) ont été utilisés. Pour chacun des 15 régimes, uniquement la troisième main a été prélevée. Les 2 fruits extérieurs de chaque main ont été enlevés pour l'étude. Un bouquet de 3 bananes ainsi qu'un fruit ont été découpés puis trempés dans un

bac d'eau afin d'éliminer le latex de la couronne fraîchement découpée. Les fruits ont ensuite été stockés à 21°C jusqu'à l'inoculation contrôlée.

Protocole 1 : Anthracnose de quiescence

- 5 25µl d'une suspension de spores de *Colletotrichum musae*, calibrée à une concentration de 10^6 conidies/ml ont été déposés sur une des faces de la banane. Une pastille de papier stérile ainsi qu'un coton imbibé d'eau distillée stérile sont déposés sur chaque gouttelette de chaque fruit. Les bananes sont enfin recouvertes de papier aluminium puis stockées pendant 48h dans une enceinte à 21°C jusqu'au traitement antifongique. Au bout de 48h, les bananes
- 10 sont trempées 2 minutes dans un bac contenant la solution aqueuse de propolis EAP6 (10gEAG/l) puis restockées pendant 10 jours à 13°C (simulation de transport par cargo). Les bananes témoins inoculées sont trempées dans une solution d'eau distillée. Au terme des 10 jours de stockage, les fruits sont traités à l'éthylène pendant 24h dans une enceinte régulée à 19°C. Les fruits sont enfin stockés à 20°C.

15

Au bout de 10 jours de stockage, la nécrose naissante présente une forme elliptique. La longueur (L) et la largeur (l) sont alors mesurées. La valeur de la surface nécrosée est alors calculée par la formule suivante : $L \times l \times \pi/4$. Les mesures sont ensuite réalisées tous les 3 jours jusqu'à ce que les bananes soient mures.

- 20 Pour une meilleure visualisation de l'efficacité des traitements effectués, les résultats ont été regroupés par catégorie d'évolution de la surface de nécrose (exemple : nombre de bananes ayant une surface de nécrose comprise entre 1 et 200mm²).

Un résumé des résultats obtenus est présenté dans le Tableau 2 :

	1 jour après gazage					3 jours après gazage					5 jours après gazage					8 jours après gazage				
	pas de nécrose	1- 100	101- 200	201- 500	>500	pas de nécrose	1- 100	101- 200	201- 500	>500	pas de nécrose	1- 100	101- 200	201- 500	>500	pas de nécrose	1- 100	101- 200	201- 500	>500
Témoin inoculé non traité	6	8	1	0	0	6	8	1	0	0	4	10	0	1	0	2	5	4	3	1
Extrait aqueux de propolis	15	0	0	0	0	15	0	0	0	0	12	3	0	0	0	9	5	0	0	1

Tableau 2 : Anthracnose de quiescence : nombre de bananes répertoriées par surface de nécrose (mm)

25

On constate de manière très nette l'efficacité de l'extrait hydrosoluble de propolis selon l'invention par rapport aux témoins non traités. Aucune nécrose n'est apparue sur les bananes traitées jusqu'au 5^{ème} jour après gazage. A partir du 5^{ème} jour, 12 bananes traitées

par la propolis sur les 15 (soit 80%) ne présentent encore aucune nécrose, contrairement aux témoins où seulement 4 fruits sur 15 (soit 26%) sont sans nécroses.

Protocole 2 : Anthracnose de blessure

25µl d'une suspension de spores de *Colletotrichum musae*, calibrée à une concentration de 10⁶ conidies/ml ont été déposés sur une des faces de la banane. Une pastille de papier stérile ainsi qu'un coton imbibé d'eau distillée stérile sont déposés sur chaque gouttelette de chaque fruit. Les bananes sont enfin recouvertes de papier aluminium puis stockées pendant 48h dans une enceinte à 21°C.

Au bout de 48h, les fruits sont blessés au niveau de la zone inoculée à l'aide d'un texturomètre TA-XT2. Une compression de 4s avec une vitesse de 5mm.s⁻¹ est réalisée à l'aide d'un piston à bout arrondi de 1cm de diamètre, exerçant une déformation de 5mm sur la peau de la banane. Les fruits sont ensuite trempés 2 minutes dans un bac contenant la solution aqueuse de propolis EAP6 (10gEAG/l) et enfin restockées pendant 10 jours à 13°C (simulation de transport par cargo). Les bananes témoins inoculées sont trempées dans une solution d'eau distillée. Au terme des 10 jours de stockage, les fruits sont traités à l'éthylène pendant 24h dans une enceinte régulée à 19°C. Les fruits sont enfin stockés à 20°C.

Au bout de 10 jours de stockage, la nécrose naissante présente une forme elliptique. La longueur (L) et la largeur (l) sont alors mesurées. La valeur de la surface nécrosée est alors calculée par la formule suivante : $L \times l \times \pi/4$. Les mesures sont ensuite réalisées tous les 3 jours jusqu'à ce que les bananes soient mures.

Pour une meilleure visualisation de l'efficacité des traitements effectués, les résultats ont été regroupés par catégorie d'évolution de la surface de nécrose (exemple : nombre de bananes ayant une surface de nécrose comprise entre 1 et 200mm²).

Un résumé des résultats obtenus est présenté dans le Tableau 3 :

	1 jour après gazage					3 jours après gazage					5 jours après gazage					8 jours après gazage				
	1-100	101-200	201-500	501-1000	>1000	1-100	101-200	201-500	501-1000	>1000	1-100	101-200	201-500	501-1000	>1000	1-100	101-200	201-500	501-1000	>1000
Témoin inoculé non traité	7	7	1	0	0	6	4	4	1	0	4	3	6	2	0	0	0	0	9	6
Extrait aqueux de propolis	11	3	1	0	0	11	3	1	0	0	11	0	4	0	0	6	0	7	0	2

Tableau 3 : Anthracnose de blessure : nombre de bananes répertoriées par surface de nécrose (mm)

On constate également de manière très nette l'efficacité de l'extrait hydrosoluble de propolis selon l'invention par rapport aux témoins non traités. Jusqu'au 8^{ème} jour après le

gazage des bananes, encore 11 fruits traités sur 15 ne présentent aucune nécrose de blessure en comparaison aux bananes témoins. D'un point de vue commercial, le traitement des bananes par l'extrait selon l'invention est très intéressant.

5 Protocole 3 : Pourriture de couronne

50µl d'une suspension de spores de *Colletotrichum musae*, calibrée à une concentration de 10^4 conidies/ml ont été déposés sur chaque couronne. Les bouquets ont été stockés pendant 4h à température ambiante puis traités par trempage 2 minutes dans un bac contenant la solution hydrosoluble de propolis EAP6 (10gEAG/l) et enfin restockées pendant 10 jours à 13°C (simulation de transport par cargo). Les bananes témoins inoculées sont trempées dans une solution d'eau distillée. Au terme des 10 jours de stockage, les fruits sont traités à l'éthylène pendant 24h dans une enceinte régulée à 19°C. Les fruits sont enfin stockés à 20°C.

15 Au bout de 10 jours de stockage, le développement externe des lésions de la couronne (SEL) est déterminé. Soit aucune nécrose (apparition d'un duvet cotonneux blanc) ne s'est développée, soit la nécrose est inférieure à 25% de la surface de la couronne, soit comprise entre 25 et 50%, soit entre 50 et 75%, soit supérieure à 75% de la surface. Cette évaluation reste qualitative.

20 Après quelques jours de stockage, une nécrose partant de la couronne de la banane progresse un à peu le long du pédoncule. Cette nécrose est ainsi mesurée sur chacune des 3 bananes pour chaque couronne. La longueur moyenne est ainsi déterminée.

Un résumé des résultats obtenus est présenté dans le Tableau 4 :

	Surface nécrosée de la couronne de la banane (%)														
	2 jours après gazage					5 jours après gazage					8 jours après gazage				
	0	< 25	25 à 50	50 à 75	> 75	0	< 25	25 à 50	50 à 75	> 75	0	< 25	25 à 50	50 à 75	> 75
Témoin non traité	0	6	3	2	4	0	2	5	0	8	0	2	3	2	8
Extrait de propolis	10	5	0	0	0	9	6	0	0	0	9	6	0	0	0

Tableau 4 : Pourriture de la couronne : nombre de bananes répertoriées par surface de nécrose

25

Ces résultats sur la pourriture de couronne de la banane sont en adéquation avec les résultats obtenus sur les 2 autres maladies de conservation. Le premier diagramme montre

encore l'efficacité de l'extrait hydrosoluble de propolis par rapport aux témoins non traités. 8 jours après le gazage des fruits, 9 bananes traitées sur 15 ne présentent aucune nécrose naissante au niveau de la couronne. Les 6 autres fruits traités ne présentent quant à eux, qu'une surface de nécroses inférieure à 25%. A l'inverse, toutes les bananes témoins
5 présentent des nécroses, dont 13 fruits sur 15 où la surface nécrosée de la couronne de la banane est supérieure à 25%.

ESSAIS COMPARATIF SUR DEUX MODES D'EXTRACTION

Le but de cet étude est de comparer une extraction à l'eau avec une extraction avec de
10 l'éthanol, suivie de l'ajout d'une solution tamponnée et de l'élimination de l'alcool.

L'extraction aqueuse sans tampon phosphate est réalisée selon le protocole suivant :

Les composés polyphénoliques sont extraits par macération de 10 g de poudre de propolis brute de dalbergia dans 50 ml d'eau pendant 1 h, à 25°C sous une agitation magnétique, à
15 l'abri de la lumière. La solution est filtrée sur papier (papier filtre standard plissé 150 mm – Legallais, Montferrier-sur-Lez, France). Le filtrat est mis de côté. Le résidu est repris dans 50 ml d'eau, les conditions d'extraction restant inchangées. Les filtrats sont enfin rassemblés et le volume de solution ajusté à 100 ml avec de l'eau (ratio d'extrait final de 1/10, m/v).

20 L'extraction hydrosoluble est réalisée selon le protocole suivant :

Les composés polyphénoliques sont extraits par macération de 10 g de poudre de propolis brute de Dalbergia dans 50 ml d'éthanol à 70 % pendant 1 h, à 25°C sous une agitation magnétique, à l'abri de la lumière. La solution est filtrée sur papier (papier filtre standard plissé 150 mm – Legallais, Montferrier-sur-Lez, France). Le filtrat est mis de côté. Le résidu
25 est repris dans 50 ml d'éthanol à 70 %, les conditions d'extraction restant inchangées. Les filtrats sont enfin rassemblés et le volume de solution ajusté à 100 ml avec de l'éthanol à 70 % (ratio d'extrait final de 1/10, m/v). 10 ml de solution de tampon phosphate (pH 7.5) sont ajoutés à 10 ml de solution aqueuse de lécithine de soja bio (0.8 %) sous agitation magnétique à 25°C. Cette solution est ensuite ajoutée à une solution contenant de l'éthanol
30 avec un ratio volume/volume de 1/1. La solution est maintenue sous agitation pendant 1 h puis centrifugée 15 min à 25°C (7000 rpm). Le surnageant est récupéré et l'éthanol est évaporé sous vide à 35°C.

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 5 :

Extraction réalisée	Teneur en polyphénols totaux	Inhibition de la croissance mycélienne %)
Extraction H ₂ O	0,19 ± 0,02	< 1%
Extraction solution tamponnée	10 ± 0,31	100%

Tableau 5

- 5 On constate qu'une simple extraction aqueuse ne permet pas d'obtenir un extrait présentant l'effet recherché.

REVENDEICATIONS

1. Extrait liquide hydrosoluble ne contenant pas d'alcool, comprenant au moins 5g de polyphénols totaux par litre d'extrait, et obtenu à partir d'au moins une propolis choisie parmi la propolis de Peuplier, la propolis de Baccharis et la propolis de Dalbergia.

5 2. Extrait selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il comprend entre 5 et 50g de polyphénols totaux par litre d'extrait.

3. Extrait selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un des polyphénols suivants : Apigénine, Artepèlline C, Biochanine A, chrysine, CAPE, Drupamine, galangine, Liquiritigénine, Medicarpine, Néovestitol, Pinocembrine, vestitol.

10 4. Extrait selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il présente un pH compris entre 6 et 9.

5. Procédé d'obtention d'un extrait selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- De la propolis brute est dissoute dans une solution hydroalcoolique,
- 15 - Une solution tamponnée est ajoutée à la solution hydro alcoolique, puis l'ensemble est agité,
- Une centrifugation est effectuée,
- L'alcool est évaporé jusqu'à obtention d'une solution aqueuse sans alcool.

20 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le ratio propolis brute / solvant hydroalcoolique est entre 10 et 250 g de propolis pour entre 25 et 2500 ml de solvant.

7. Procédé selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que le tampon phosphate est ajouté à raison d'un volume pour un volume de solution hydro alcoolique.

25 8. Procédé selon l'une des revendications 5 à 7, caractérisé en ce que le tampon phosphate et la solution hydroalcoolique, sont agités à température ambiante pendant entre 20 et 24 heures.

9. Procédé selon l'une des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que la centrifugation est effectuée durant entre 5 et 25 minutes.

10. Utilisation d'un extrait de propolis selon l'une des revendications 1 à 4, pour la prévention ou le traitement des maladies des végétaux.

11. Utilisation selon la précédente revendication, pour prévenir ou traiter les maladies des végétaux causées par au moins un phytopathogène.

5 12. Utilisation selon l'une des revendications 10 ou 11 pour prévenir ou traiter une des maladies suivantes : le mildiou de la vigne, l'anthracnose, la pourriture de couronne, la pourriture grise, la fusariose.

13. Utilisation selon la revendication 10 ou 11, pour le traitement post-récolte des fruits et/ou des légumes.

10 14. Utilisation selon la précédente revendication, pour prévenir ou lutter contre les maladies des fruits et/ou légumes causées par au moins un phytopathogène.

15. Utilisation selon l'une des revendications 13 ou 14, pour prévenir ou lutter contre l'apparition de taches noires, l'apparition de taches brunes, la pourriture des fruits ou légumes, la pourriture des feuilles, la pourriture noire, l'apparition de moisissures noires, la 15 pourriture brune, la pourriture grise, l'anthracnose, la pourriture « œil de bœuf » des pommes et des poires, la curvulariose, la maladie du bout noir, la pourriture de la couronne de la banane, la fusariose, la pourriture sèche, la moniliose sur fruits, l'attaque des fruits à pépins, la maladie des raies noires, la maladie de Sigatoka, l'apparition de tâches blanchâtres poudreuses, la moisissure bleue-verdâtre, la pourriture verte des agrumes, la pourriture 20 bleue, la pourriture bleuâtre, la maladie mucoromycosis.

16. Utilisation selon l'une des revendications 13 à 15, pour prévenir ou lutter contre les désordres causés sur les fruits et/ou les légumes par au moins un phytopathogène choisi parmi : *Dothiorella dominicana*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium pallidoroseum*, 25 *Botryodiplodia theobromae*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus nigrigans*, *Rhizopus stolonifer*, *Gloeosporium sp.* *Monilia fructicola*, *Fusarium oxysporum*, *Stemphylium vesicarium*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Glomus mosseae*, *Phomopsis sp.*

17. Utilisation selon l'une des revendications 13 à 16, sur au moins un des fruits 30 ou légumes suivants : mangue, banane, ananas, litchi, papaye, citron, fraise, kiwi, pomme, prune, abricot, tomate, asperge, carotte, salade, pomme de terre et avocat.

18. Utilisation selon l'une des revendications 13 à 17, pour inhiber et/ou retarder la croissances des phytopathogènes fongiques sur les fruits et/ou légumes en post-récolte.

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 843106
FR 1770794

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		
X	BRUNO ALVES ROCHA ET AL: "Evaluation of a Propolis Water Extract Using a Reliable RP-HPLC Methodology and In Vitro and In Vivo Efficacy and Safety Characterisation", EVIDENCE-BASED COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE, vol. 2013, 31 décembre 2013 (2013-12-31), pages 1-11, XP055442047, ISSN: 1741-427X, DOI: 10.1155/2013/670451	1-9	A01N65/06 A01N65/00 A01N31/08
Y	* alinéa [02.1]; tableau 3 *	10-18	
X	LORETA KUBILIENE ET AL: "Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities", BMC COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE, BIOMED CENTRAL LTD., LONDON, GB, vol. 15, no. 1, 27 mai 2015 (2015-05-27), page 156, XP021222812, ISSN: 1472-6882, DOI: 10.1186/S12906-015-0677-5	1-4	
Y	* tableaux 1-2 *	10-18	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A01N
X	BEATRIZ C. B. S. MELLO ET AL: "Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values", INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY., vol. 47, no. 12, 13 août 2012 (2012-08-13), pages 2510-2518, XP055442526, GB ISSN: 0950-5423, DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.03129.x	1-4	
Y	* tableau 1 *	10-18	
----- -/-			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
30 janvier 2018		Lorusso, Patrizia	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS 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 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			

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 843106
FR 1770794

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		
X	GATEA FLORENTINA ET AL: "Capillary Electrophoresis Method for 20 Polyphenols Separation in Propolis and Plant Extracts", FOOD ANALYTICAL METHODS, SPRINGER NEW YORK LLC, US, vol. 8, no. 5, 26 septembre 2014 (2014-09-26), pages 1197-1206, XP035480233, ISSN: 1936-9751, DOI: 10.1007/S12161-014-0006-5 [extrait le 2014-09-26]	1-4	
Y	* tableaux 1,3,6 *	10-18	
Y	MATTIUZ BEN-HUR ET AL: "Effect of propolis on postharvest control of anthracnose and quality parameters of 'Kent', SCIENTIA HORTICULTURAE, vol. 184, 23 janvier 2015 (2015-01-23), pages 160-168, XP029198053, ISSN: 0304-4238, DOI: 10.1016/J.SCIENTA.2014.12.035 * alinéas [0001], [02.1] *	10-18	
Y	Barbosa, M. S. and others: "In vitro biological activity of propolis and essential oils on the fungus Colletotrichum musae isolated from banana Musa spp", 30 juin 2015 (2015-06-30), XP055442744, Extrait de l'Internet: URL:http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722015000200254 [extrait le 2018-01-19] * tableau 1 *	10-18	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
30 janvier 2018		Lorusso, Patrizia	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS 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 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			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 843106
FR 1770794

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	Musa Özcan: "Short Paper Antifungal properties of propolis", Fase, 1 janvier 1999 (1999-01-01), pages 395-398, XP055442770, Extrait de l'Internet: URL: http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/download/685/696 [extrait le 2018-01-25] * le document en entier *	10-18	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Y	Obasa: "Efficacy of Bee-Propolis in the Control of Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. and Magn.) Briosi and Cav. in vitro", 31 décembre 2007 (2007-12-31), XP055444739, Extrait de l'Internet: URL: http://docsdrive.com/pdfs/academicjournals/jm/2007/175-179.pdf [extrait le 2018-01-25] * le document en entier *	10-18	
Y	Auriane Dudoit Verhaeghe: "Evaluation et compréhension des propriétés antifongiques des propolis", 7 mars 2017 (2017-03-07), XP055445123, ISBN: 978-0-494-60701-5 Extrait de l'Internet: URL: https://cosaq.cirad.fr/content/download/4340/32289/version/1/file/Auriane_Dudoit.pdf [extrait le 2018-01-25] * le document en entier *	10-18	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
30 janvier 2018		Lorusso, Patrizia	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS 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 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			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 843106
FR 1770794

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		
A	Silva-Carvalho: "Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities that Can Be Explored for Drug Development", 31 décembre 2015 (2015-12-31), XP055444612, Extrait de l'Internet: URL: https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/206439/ [extrait le 2018-01-25] * tableau 1 * -----	1-10	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
30 janvier 2018		Lorusso, Patrizia	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS 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 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			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)