

(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
18 février 2010 (18.02.2010)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2010/017956 A2

(51) Classification internationale des brevets :
A01N 43/16 (2006.01) A01P 21/00 (2006.01)
A01N 65/00 (2009.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2009/005815

(22) Date de dépôt international :
11 août 2009 (11.08.2009)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
08/55529 12 août 2008 (12.08.2008) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
ALGIE PLUS [FR/FR]; Espace Entreprises, Z.A. de
Kerantour, F-22740 Pleudaniel (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : JACOB,
Bruno [FR/FR]; 56, rue de l'Armor, F-22550 Trebeurden
(FR). ROUSSET, Aurélie [FR/FR]; 7, rue Eugène
Herland, F-22500 Paimpol (FR). SASSI, Jean-François
[FR/FR]; 13A, route de Kergadou, F-22620 Ploubazlanec
(FR). LE DEIT, Hervé [FR/FR]; 10, chemin de la
Fontaine Saint-Pierre, F-22300 Lannion Servel (FR).

(74) Mandataire : MAILLET, Alain; Cabinet Le Guen
Maillet, 5, place Newquay, B.P. 70250, F-35802 Dinard
Cedex (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), eurasién (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, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))

(54) Title : USE OF OLIGO-APIOGALACTURONANS AND THE DERIVATIVES THEREOF FOR STIMULATING DEFENCE AND RESISTANCE REACTIONS OF PLANTS AGAINST BIOTIC AND ABIOTIC STRESSES

(54) Titre : UTILISATION D'OLIGOAPIOGALACTURONANES ET DE SES DERIVES POUR LA STIMULATION DES REACTIONS DE DEFENSE ET DE RESISTANCE DES PLANTES CONTRE LES STRESS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES

(57) Abstract : The invention relates to the use of oligo-apiogalacturonan compounds, particularly extracted from aquatic plants of the Lemna or Zostera genus, as an agent for stimulating the defence and resistance reactions in a plant, in particular an ornamental plant or a plant of agricultural interest, against biotic and/or abiotic stresses. The invention further relates to a method for stimulating the natural defence reactions of a plant or a portion of a plant against biotic and/or abiotic stresses that includes applying at least one oligo-apiogalacturonan compound in a liquid or solid composition on said plant or a portion of a plant or in the environment of said plant.

(57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation de composés oligoapiogalacturonanes, notamment extrait de plantes aquatiques du genre Lemna ou Zostera, comme agent de stimulation des réactions de défense et de résistance d'une plante, en particulier d'une plante ornementale ou d'intérêt agronomique, contre les stress biotique et/ou abiotique. L'invention concerne encore un procédé de stimulation des réactions des défenses naturelles d'une plante, ou partie de plante, contre un stress biotique et/ou abiotique, comprenant l'application sur ladite plante, ou partie d'une plante ou dans l'environnement de ladite plante d'au moins un composé oligoapiogalacturonane dans une composition liquide ou une composition solide.

WO 2010/017956 A2

Utilisation d'oligoapiogalacturonanes et de ses dérivés pour la stimulation des réactions de défense et de résistance des plantes contre les stress biotiques et abiotiques.

La présente invention concerne l'utilisation de composés oligoapiogalacturonanes comme agent de stimulation des réactions de défense et de résistance d'une plante, en particulier d'une plante ornementale ou d'intérêt
5 agronomique, contre les stress biotique et/ou abiotique.

Plus particulièrement, l'invention concerne l'utilisation d'oligoapiogalacturonanes extraits à partir d'au moins une plante aquatique du genre *Zostera* ou *Lemna*, préférentiellement à partir des espèces *Zostera marina*, *Zostera noltii* et *Lemna minor*, encore plus préférentiellement à partir des espèces *Zostera marina* et *Zostera noltii* comme agent de stimulation des réactions de défense et de
10 résistance d'une plante contre un stress biotique et/ou abiotique, par exemple résultant d'une attaque de pathogènes.

Les plantes sont, dans leur environnement, continuellement soumises à des stress, ou contraintes, engendrés par des facteurs extérieurs susceptibles d'affecter leur

métabolisme et d'induire chez elles des réactions de défense. Un tel stress peut être d'origine biotique ou abiotique. Un stress est dit d'origine biotique lorsqu'il provient d'organismes vivants, par exemple, des microorganismes pathogènes tels que des champignons, des bactéries, des virus, mais encore des nématodes, des insectes ou des plantes parasites. Un stress est d'origine abiotique lorsqu'il résulte du non vivant, tel un stress hydrique, un stress oxydatif, un stress chimique ou un stress thermique. Les stress biotiques et/ou abiotiques sont la cause de pertes économiques importantes pour des cultivateurs.

Pour faire face à de telles agressions, les plantes ont développé, au cours de l'évolution, leurs propres systèmes de défense.

Il existe d'une part, des mécanismes de défense dits « constitutifs », c'est-à-dire présents de façon permanente dans la plante. Ces mécanismes de protection passent par les parois des cellules, les cires et les cuticules qui constituent des barrières physiques naturelles et qui s'opposent ainsi à la pénétration de microbes dans les tissus de la plante.

D'autre part, il existe des mécanismes de défenses non-préexistants, dits « inductibles ». La mise en place de ces réactions de défense et de résistance par les plantes est en effet initiée par la perception d'un stress biotique et/ou abiotique. L'information est ensuite relayée au niveau intracellulaire par une cascade de signaux de transduction conduisant à l'induction de l'expression de gènes de défense et de résistance. Par exemple, lorsqu'une plante est attaquée par un agent pathogène, la détection de l'agent pathogène et l'induction des mécanismes de défense de la plante peuvent être initiés par la reconnaissance, par la plante, de composés chimiques soit issus de l'agent pathogène, soit issus de la plante elle-même.

Les parois des végétaux sont composées de polysaccharides pariétaux dont les plus abondants sont les pectines. Lors de l'attaque d'une plante par un agent pathogène, celui-ci sécrète des enzymes capables de dégrader des polysaccharides de la paroi végétale. Ces produits résultant de la dégradation de la paroi peuvent se comporter comme des agents de stimulation des réactions de défense de la plante et sont généralement désignés par le terme « éliciteurs ».

Lors d'une interaction plante-pathogène dite incompatible, dans laquelle le pathogène est identifié rapidement et spécifiquement par la plante selon une relation dite "gène pour gène", la réaction de défense est des plus efficaces. En effet, l'interaction entre le produit d'un gène de résistance R porté par la plante et le produit

d'un gène d'avirulence Avr correspondant (éliciteur spécifique) porté par l'agent pathogène, conduit à l'activation rapide de réponses de défenses spécifiques et efficaces. Le résultat de cette interaction se manifeste notamment par la nécrose rapide des cellules de la plante sur le site de pénétration du pathogène, réaction dite d'hypersensibilité, ce qui a pour but de confiner celui-ci sur ce site et d'enrayer sa progression dans la plante.

Lors d'une interaction plante-pathogène dite compatible, la plante et/ou le pathogène ne portent pas respectivement le gène de résistance R et le gène d'avirulence Avr correspondant. Dans ce cas, la stimulation des réactions de défense de la plante peut être provoquée par les effets des lésions causées par l'attaque du pathogène. Par exemple, lors d'une attaque fongique, les oligosaccharides produits d'une part, sous l'action des enzymes fongiques sur les parois cellulaires de la plante hôte et, d'autre part, par l'action des hydrolases de la plante sur les polysaccharides pariétaux de l'agent pathogène, peuvent agir en tant qu'éliciteurs non spécifiques, ou généraux, et activer des réactions de défense en réponse à l'attaque du pathogène. Les réactions de défense mises en œuvre sont alors tardives et/ou plus faibles que les réactions de défense lors d'une interaction plante-pathogène dite incompatible et sont non spécifiques. Les symptômes et les pertes de rendement restent modérés chez une plante tolérante, tandis que l'infestation sera sévère voire fatale chez une plante sensible à cette attaque.

Les réactions de défense de la plante les plus couramment induites ou stimulées lors d'une attaque pathogène sont la mort cellulaire programmée des cellules au site de pénétration du pathogène (réponse hypersensible), un renforcement des parois cellulaires de la plante du fait de la production de composés tels que la lignine, la callose ou des protéines de réticulation, l'accumulation de composés antimicrobiens tels que des phytoalexines, la synthèse de protéines PR (pathogenesis related) telles que des chitinases, des glucanases, des peroxydases ou des inhibiteurs d'enzymes agissant contre les enzymes hydrolytiques de l'agent pathogène.

On peut noter que les phénomènes de défense accompagnant la réaction d'hypersensibilité peuvent également être exprimés lors d'une interaction compatible.

Suite à une première activation des mécanismes de défense de la plante, des messagers chimiques peuvent véhiculer un signal de défense à l'ensemble des tissus de la plante, notamment à ceux non encore infestés et ainsi générer une résistance systémique de la plante. Ce phénomène, appelé "résistance systémique acquise"

(RSA), permet de rendre la plante plus résistante aux attaques de pathogènes ultérieures.

Ainsi, dans le but d'améliorer les méthodes de lutte contre les maladies des plantes engendrées par les pathogènes, une stratégie possible consiste à induire des réactions de défense de la plante avant que celle-ci ne soit attaquée par un pathogène, par l'application exogène de composés éliciteurs. De tels composés éliciteurs sont
5 préférentiellement recherchés pour leur origine naturelle, ceci notamment dans le souci de limiter l'utilisation de produits polluants.

On connaît ainsi des molécules capables de stimuler les mécanismes de défenses
10 des plantes en réponse à des stress et ainsi d'augmenter le niveau de résistance des plantes. Ces molécules peuvent être de nature chimique variée, par exemple des protéines, des peptides, des glycoprotéines, des lipides ou des oligosaccharides et peuvent être d'origine variée, par exemple d'origine bactérienne, telle que la harpine, d'origine végétale, telle que l'acide oligogalacturonique, d'origine algale, telle que la
15 laminarine, ou d'origine synthétique, telle que des dérivés d'acide nicotinique. Par exemple, parmi les composés d'origine algale, plusieurs oligosaccharides, tels que la laminarine, les ulvanes, les fucanes, les carraghénanes, sont connus pour leur capacité à stimuler certaines voies de défenses chez les plantes sur lesquelles ils sont appliqués.

Cependant, bon nombre de ces composés présentent l'inconvénient d'être
20 rapidement dégradés dans l'environnement de la plante, en particulier dans le sol, et nécessite d'être utilisé en application foliaire uniquement ou bien de renouveler souvent leur application.

C'est dans ce contexte et, en particulier, dans le but d'enrichir la collection de composés éliciteurs d'origine naturelle, que les recherches effectuées par la société
25 demanderesse ont permis de sélectionner des composés obtenus à partir de plantes d'origine aquatique capables de stimuler des réactions de défense et de résistance d'une plante contre un stress biotique et/ou abiotique, par exemple résultant d'une attaque de pathogènes.

Les composés identifiés peuvent être utilisés en traitement préventif pour
30 stimuler ou potentialiser des mécanismes de défenses, par exemple selon la concentration utilisée, ou encore en traitement curatif.

Les composés identifiés par la société demanderesse présentent également l'avantage d'être lentement dégradés en milieu terrestre, et notamment dans le sol, rendant ainsi possible une application de quantités moindres sur les plantes par rapport

aux composés cités. Ils présentent également l'avantage d'être particulièrement adaptés à une application sur le système racinaire, par exemple, via des solutions nutritives lors d'une culture hors sol.

La présente invention concerne ainsi l'utilisation d'au moins un
5 oligoapiogalacturonane composé de 3 à 300 unités monosaccharidiques, notamment extrait de plantes aquatiques du genre *Lemna* ou *Zostera*, en tant qu'agent de stimulation des réactions de défense et de résistance d'une plante, ou partie de plante, notamment d'une plante ornementale ou d'intérêt agronomique, contre les stress biotique et/ou abiotique.

10 Les oligoapiogalacturonane permettent l'activation de voies de signalisation intracellulaires conduisant à la stimulation de gènes de défense et de résistance et à la synthèse de composés capables de lutter contre le stress engendré par la plante.

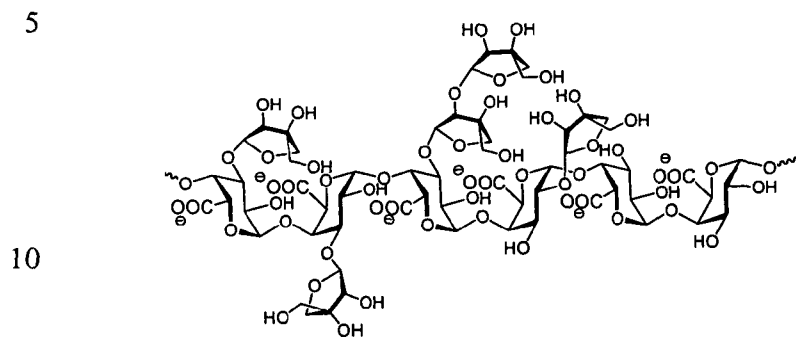
Les plantes du genre *Zostera*, les zostères, appartiennent à la famille des Zostéracées. Les zostères sont des phanérogames marines qui se développent dans les
15 sédiments sableux et sablo-vaseux des zones intertidales et infralittorales dans lesquelles elles forment des herbiers sous-marins parfois denses. Les zostères sont organisées selon une tige rampante plus ou moins souterraine appelée rhizome, sur laquelle s'insèrent des faisceaux de feuilles en forme de ruban.

Une caractéristique biochimique des plantes aquatiques du genre *Zostera* est que
20 leurs parois cellulaires contiennent des polysaccharides particuliers, des substances pectiques, ou pectines, appelées apiogalacturonanes. La formule chimique développée d'un tel composé est représentée. Les apiogalacturonanes des plantes du genre *Zostera* sont connues sous le nom de zostérines ou zostéranes.

Les plantes aquatiques du genre *Lemna*, ou lentilles d'eau, contiennent
25 également des apiogalacturonanes dans leurs parois cellulaires. Les apiogalacturonanes de plantes du genre *Lemna* sont connues sous le nom de lemnanes.

Ces substances pectiques particulières sont des macromolécules de nature glucidique composées essentiellement d'acide galacturonique. Le squelette de ces
30 molécules est formé par l'enchaînement linéaire d'un motif monomère identique, l'acide α D-galacturonique. Les motifs sont liés entre eux par des liaisons α [1-4]. La particularité de ces pectines réside dans la substitution de certains groupes de la chaîne principale d'acides α D-galacturonique par des motifs monomères ou dimères de D-apiose. L'apirose (3-C-(hydroxyméthyl)-D-glycero-tetrose), un sucre rare, est

un pentose à chaîne branchée. La chaîne saccharidique principale est également substituée par du galactose, du rhamnose, du xylose et de l'arabinose.



zostérine

15 La société demanderesse, au cours de ses recherches, a constaté que la présence de motifs apiose conférait aux oligoapiogalacturonanes une résistance accrue face aux enzymes pectinolytiques sécrétées par les microorganismes et ainsi une durée de vie prolongée en milieu terrestre.

L'utilisation de composés oligoapiogalacturonanes, ainsi protégés durablement des dégradations par leurs motifs apiose, permet d'optimiser leur efficacité de stimulation des réactions de défense et de résistance d'une plante contre un stress biotique et/ou abiotique.

20 Sans préjuger d'un quelconque mécanisme d'action, la présence des motifs apiose confère ainsi aux oligoapiogalacturonanes une activité biologique renforcée et adaptée à une application sur des plantes en vue de stimuler ses réactions de défense et de résistance. Ainsi, la résistance accrue de ces composés aux biodégradations permet de limiter les quantités de produits à appliquer et par là même d'optimiser l'efficacité du traitement des plantes. De tels composés sont notamment adaptés à une application sur le système racinaire des plantes cibles.

30 Selon un mode de réalisation de l'invention, ledit ou lesdits oligoapiogalacturonanes sont obtenus à partir d'au moins une plante aquatique du genre *Zostera* ou *Lemna*, préférentiellement à partir des espèces *Zostera marina*, *Zostera noltii* et *Lemna minor*, encore plus préférentiellement à partir des espèces *Zostera marina* et *Zostera noltii*.

Les composés selon l'invention peuvent être obtenus par un procédé d'extraction comportant les étapes suivantes: une étape de lavage des feuilles et/ou des rhizomes de la plante, une étape de broyage, une étape d'extraction aqueuse de type solide-liquide, laquelle peut être suivie d'une étape de fractionnement et de concentration de l'extrait obtenu.

Selon un mode de réalisation de l'invention, lesdits oligoapiogalacturonanes sont obtenus par hydrolyse enzymatique et/ou chimique d'un composé apiogalacturonane.

Préférentiellement, lesdits oligoapiogalacturonanes sont composés de 3 à 100 et encore plus préférentiellement de 3 à 30 unités monosaccharidiques.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, lesdits oligapiogalacturonanes sont obtenus par greffage de motifs apiose sur des composés oligogalacturonanes.

Avantageusement, chaque oligoapiogalacturonanes comprend au moins 5 % de motifs apiose, préférentiellement entre 10 et 80 %, plus préférentiellement entre 20 et 70 % de motifs apiose.

Les apiogalacturonanes obtenus à partir des plantes appartenant à l'espèce *Lemna minor* contiennent 64% d'acide α D-galacturonique et 25 % de D-apiose. Ce sont donc des composés de choix au sens de l'invention pour l'obtention des oligoapiogalacturonanes utilisés dans la présente invention.

Selon une caractéristique de l'invention, ledit ou lesdits oligoapiogalacturonanes sont apportés à ladite plante, ou partie de plante, en une quantité comprise entre 0,01 et 100 g/L sous une forme liquide *via* le système foliaire, le système racinaire, la graine de ladite plante ou l'environnement de ladite plante, notamment dans une solution nutritive destinée à une culture de type hydroponique, ou en une quantité comprise entre 0,01 et 100 g/Kg sous une forme solide dans l'environnement de ladite plante, avant ou après la plantation ou la récolte de ladite plante.

L'apport aux plantes peut ainsi être réalisé par l'intermédiaire d'une composition solide, telle qu'un bâtonnet ou une granule pouvant, par exemple, être placé dans le sol dans laquelle la plante est mise en terre. L'apport peut également être réalisé par pulvérisation sur la plante ou sur une partie de la plante, ou encore par arrosage au pied de la plante d'une solution comprenant les composés d'intérêt. En outre, l'apport peut également être réalisé sur la plante après la récolte.

Dans le cas d'une culture de type hydroponique, l'apport peut être réalisé par l'intermédiaire d'une solution nutritive prévue à cet effet.

Selon l'invention, le terme "plante" désigne tout végétal, en particulier tout végétal de type gymnosperme ou angiosperme monocotylédone ou dicotylédone, en particulier toute plante d'intérêt ornemental ou agronomique, quelque soit son stade de développement.

5 Par "partie de plante" on entend tout fragment d'une plante contenant au moins une cellule de plante, par exemple un organe de plante, tel qu'une feuille, un bourgeon, une fleur, une racine, un fruit, ou une graine, un tissu de plante, tel qu'un méristème, un cal végétal ou encore une cellule de plante.

10 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, l'utilisation des oligoapiogalacturonanes réside en la stimulation des réactions de défense contre des pathogènes.

L'invention concerne encore un procédé de stimulation des réactions des défenses naturelles et de résistance d'une plante, ou partie de plante, contre un stress biotique et/ou abiotique, qui se caractérise en ce qu'il comprend l'application sur ladite
15 plante, ou ladite partie d'une plante ou dans l'environnement de la plante d'au moins un oligoapiogalacturonanes, comportant de 3 à 300 unités monosaccharidiques, sous une forme liquide ou sous une forme solide.

Avantageusement, la quantité d'oligoapiogalacturonanes est comprise entre 0,01 et 100 g/L dans une composition liquide et entre 0,01 et 100 g/kg dans une
20 composition solide.

L'invention concerne encore un produit pour la stimulation des réactions des défenses naturelles et de résistance d'une plante, ou partie de plante, contre un stress biotique et/ou abiotique, qui se caractérise en ce qu'il est composé d'au moins un oligoapiogalacturonanes comportant de 3 à 300 unités monosaccharidiques.

25 Selon un mode de réalisation, ledit ou lesdits oligoapiogalacturonanes sont extraits à partir d'au moins une plante aquatique du genre *Zostera* et/ou *Lemna*, préférentiellement à partir des espèces *Zostera marina*, *Zostera noltii*, *Lemna minor*, encore plus préférentiellement à partir des espèces *Zostera marina* et *Zostera noltii*.

30 Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, un tel produit comprend, en outre, de l'acide p-sulfoxy cinnamique, ou acide zostérique.

Ce mode de réalisation est particulièrement avantageux puisque l'acide zostérique permet d'empêcher l'adhésion de microorganismes à la surface des végétaux.

Le produit selon l'invention peut se présenter sous la forme d'une solution, d'une émulsion, d'une poudre, d'une granule ou d'une solution d'enrobage, notamment d'enrobage de graines.

Avantageusement, le produit selon l'invention comprend entre 0,01 et 100 g/L d'au moins un oligoapiogalacturonane, lorsque ledit produit se présente sous une forme liquide ou entre 0,01 et 100 g/Kg d'au moins un composé apiogalacturonane et/ou dérivés de composé apiogalacturonane, lorsque ledit produit se présente sous une forme solide.

Selon un autre mode de réalisation, le produit selon l'invention comprend, en outre, au moins une matière fertilisante.

Selon un autre mode de réalisation, le produit selon l'invention comprend, en outre, au moins un produit phytosanitaire et, préférentiellement, au moins un produit éliciteur.

Des matières fertilisantes susceptibles d'être utilisées dans un produit selon l'invention peuvent être choisies parmi l'urée, le sulfate d'ammonium, le nitrate 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, l'acide borique, des engrais de type NP, PK, NPK.

Les caractéristiques de l'invention mentionnées ci-dessus, ainsi que d'autres, apparaîtront plus clairement à la lecture de la description suivante d'un exemple de réalisation de l'invention.

Procédé de préparation d'un extrait de composés apiogalacturonanes à partir d'une plante de la famille des Zostéracées.

25

Récolte et broyage du matériel végétal : Des zostères échouées appartenant à l'espèce *Zostera noltii* ont été récoltées en Août 2003 dans le Bassin d'Arcachon dans le secteur d'Andernos (Gironde – France). Le matériel végétal a été préalablement séché à l'air libre sur le site d'épandage puis lavé à l'eau douce et enfin séché à 50°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante. Le matériel a ensuite été réduit en poudre de granulométrie de l'ordre de 100 µm.

Lixiviation de la zostère : Dans un ballon de 250 mL, la zostère précédemment nettoyée (8 g) est ajoutée à 72 mL d'eau distillée. Le pH est ajusté à 4 par l'ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 3N. Le milieu est maintenu sous agitation pendant 3

heures à une température de 50°C. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré sur verre fritté (porosité de 15 à 50 µm). Le filtrat est alors dialysé pendant une nuit au moyen d'une membrane de cellulose afin d'éliminer les anions chlorures en vue de son analyse. Le retentat est directement utilisé lors de l'étape suivante.

Extraction de la zostérine (apiogalacturonane de zostère) : Dans un ballon de 250 mL, la zostère lixiviée précédemment obtenue est ajoutée à 80 mL d'une solution aqueuse d'oxalate d'ammonium à 1 %. Le milieu est agité et maintenu à une température de 70°C pendant 4 heures. Après retour à température ambiante, les phases sont séparées par centrifugation (20 min ; 15°C ; 15000 g). La phase liquide est conservée et la phase solide subit une deuxième extraction à l'oxalate d'ammonium (200 mL). Après séparation, les phases liquides sont rassemblées. Le volume est diminué à l'évaporateur rotatif jusqu'à la précipitation des premières molécules de zostérine. Le milieu est alors transféré dans un bécher de 500 mL dans lequel la zostérine est précipitée par ajout de 200 mL (3 volumes) d'éthanol. La zostérine est récupérée après centrifugation (20 min ; 15°C ; 3000 g). La zostérine est ensuite solubilisée dans de l'eau, dialysée sur une membrane de 10 KD, puis lyophilisée. On isole ainsi 1,2 g de zostérine ce qui correspond à un rendement d'extraction de 15 % par rapport à la zostère extraite.

Cette méthode permet d'obtenir de la zostérine dite LJ1. Celle-ci est de couleur marron car elle contient 2,7 % de polyphénols.

La zostérine LJ1 peut ensuite être purifiée par l'emploi d'une résine hydrophobe, telle que la résine hydrophobe Amberlite™ XAD™ 16 (commercialisée par la société Rohm and Haas) avec un rendement de 63 %. On obtient ainsi la zostérine dite LJ 2 de couleur blanche et dont la teneur en monosaccharide s'élève à 31 %. Cette zostérine ne contient plus que 0,5 % de polyphénols.

Purification de la zostérine sur résine : Dans un erlenmeyer de 250 mL, la zostérine (400 mg) est solubilisée dans 74 mL d'eau à 50°C. Une fois solubilisée, la résine Amberlite™ XAD™ 16 (30 g) est ajoutée dans le milieu. Celui-ci est alors agité et maintenu à une température de 50°C pendant une nuit. La résine est enlevée par filtration sur verre fritté sous pression atmosphérique. Le filtrat est concentré jusqu'au début de la précipitation. La zostérine précipite en ajoutant trois volumes d'éthanol. La zostérine est alors filtrée sur Büchner, dialysée sur une membrane de 10 KD, puis lyophilisée.

La composition en oses neutres des deux zostérines LJ1 et LJ2 est donnée dans la Fig. 1 illustrant la composition en oses neutres des zostérines LJ1 et LJ2 extraite de *Zostera noltii* exprimée en pourcentage.

Sur la Fig. 1, Rha: Rhamnose; Fuc: fucose; Ara: arabinose; ; Api: apiose; Xyl: xylose; Man: manose; Gal: galactose; Glc: glucose;

Des procédés d'extraction par voie enzymatique ou acide des composés apiogalacturonanes sont également envisageables.

10 Préparation des oligoapiogalacturonanes

Les zostérines LJ1 et LJ2 sont hydrolysées par voie enzymatique de manière à obtenir des oligoapiogalacturonanes comportant entre 3 et 300 unités saccharidiques, respectivement LJ'1 et LJ'2.

Pour ce faire, 54 mg d'apiogalacturonane extraits selon l'exemple précédent sont solubilisés dans 4g d'eau déminéralisée. Le pH est ajusté à 5 à l'aide d'un tampon acétate de sodium / acide acétique. 1 ml d'eau déminéralisée contenant 5,4 mg de pectinase issus d'*Aspergillus niger* à 1,8 U/mg (fournisseur = Fluka) est ajouté et le milieu est homogénéisé par agitation, puis maintenu en incubation à 40°C sous agitation pendant 3h30. La masse réactionnelle est ensuite portée à ébullition pour inactiver l'enzyme. Une fois dénaturée, l'enzyme précipite et est séparée par centrifugation. Le surnageant de centrifugation est collecté et dessalé par dialyse sur une membrane de seuil de coupure 1000 Da. Le rétentat de dialyse est congelé et

séché par lyophilisation. Le degré de polymérisation moyen en nombre de l'oligoapiogalacturonane obtenu est de 27.

Des procédés de préparation d'oligoapiogalacturonanes à partir d'autres
5 enzymes et/ou d'auxiliaires chimiques sont également envisageables.

Préparation de produits pour la stimulation des réactions de défense d'une plante
ou partie de plante, contre un stress biotique et/ou abiotique:

10 Différents produits ont été préparés à partir d'un extrait tel qu'obtenu précédemment. Dans cet exemple, l'extrait utilisé est purifié sur résine et correspond à LJ'2. L'utilisation de LJ'1 n'est pas exclue.

Des compositions liquides ont été préparées en mélangeant un extrait obtenu par un procédé tel que décrit précédemment et de l'acide zostérique. Les compositions
15 liquides comprennent entre 0,2 et 2 g/L de composés apiogalacturonanes et 10 g/L d'acide zostérique. De telles solutions peuvent être pulvérisées directement sur les feuilles de plantes.

D'autres compositions liquides ont été préparées en ajoutant un extrait obtenu par un procédé tel que décrit précédemment à une solution d'engrais de type NPK. Les
20 solutions comprennent 0,2 et 2 g/L de composés apiogalacturonanes. De telles solutions peuvent être apportées aux systèmes racinaires des plantes par arrosage.

Des compositions d'enrobage de graines de plantes ont été préparées en incorporant 2 g/L d'un extrait obtenu par un procédé tel que décrit précédemment à une composition d'enrobage connue de l'homme du métier, par exemple une
25 composition d'enrobage à base d'hémicellulose. Des graines de plantes peuvent ainsi être enrobées par une telle composition.

REVENDICATIONS

1) Utilisation d'au moins un oligoapiogalacturonane composé de 3 à 300 unités monosaccharidiques en tant qu'agent de stimulation des réactions de défense et de résistance d'une plante ou partie de plante, notamment d'une plante ornementale ou d'intérêt agronomique, contre les stress biotique et/ou abiotique.

2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit ou lesdits oligoapiogalacturonanes sont extraits des feuilles et/ou des rhizomes d'au moins une plante aquatique du genre *Zostera* ou *Lemna*, préférentiellement à partir des espèces *Zostera marina*, *Zostera noltii*, *Lemna minor*, encore plus préférentiellement à partir des espèces *Zostera marina* et *Zostera noltii*.

3) Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit ou lesdits oligoapiogalacturonanes sont composés de 3 à 100 unités monosaccharidiques, préférentiellement de 3 à 30 unités monosaccharidiques.

4) Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit ou lesdits oligoapiogalacturonanes sont obtenus par hydrolyse enzymatique et/ou chimique d'un composé apiogalacturonane.

5) Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que chaque composé oligoapiogalacturonane comprend au moins 5 % de motifs D-apiose, préférentiellement entre 10 et 80 %, plus préférentiellement entre 20 et 70 % de motifs D-apiose.

6) Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit ou lesdits oligoapiogalacturonanes sont apportés à ladite plante, ou partie de plante, en une quantité comprise entre 0,01 et 100 g/L sous une forme liquide *via* le système foliaire, le système racinaire, la graine de ladite plante ou l'environnement de ladite plante, notamment dans une solution nutritive destinée à une culture de type hydroponique, ou en une quantité comprise entre 0,01 et 100 g/Kg sous une forme solide dans l'environnement de ladite plante, avant ou après la plantation ou la récolte de ladite plante.

7) Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle réside en la stimulation des réactions de défense contre des pathogènes.

8) Procédé de stimulation des réactions des défenses naturelles d'une plante, ou partie de plante, contre un stress biotique et/ou abiotique, caractérisé en ce qu'il comprend l'application sur ladite plante, ou partie d'une plante ou dans

l'environnement de ladite plante d'au moins un composé oligoapiogalacturonane composé de 3 à 300, préférentiellement de 3 à 100, plus préférentiellement de 3 à 30 unités monosaccharidiques, dans une composition liquide ou une composition solide.

5 9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la quantité de composé oligoapiogalacturonane est comprise entre 0,01 et 100 g/L dans une composition liquide et entre 0,01 et 100 g/Kg dans une composition solide.

10) Produit pour la stimulation des réactions des défenses et de résistance naturelles d'une plante, ou partie de plante, contre un stress biotique et/ou abiotique, caractérisé en ce qu'il comprend moins un composé oligoapiogalacturonane composé
10 de 3 à 300, préférentiellement de 3 à 100, plus préférentiellement de 3 à 30 unités monosaccharidiques.

11) Produit selon la revendication 10, caractérisé en ce que ledit ou lesdits oligoapiogalacturonanes sont extraits à partir d'au moins une plante aquatique du genre *Zostera* ou *Lemna*, préférentiellement à partir des espèces *Zostera marina*,
15 *Zostera noltii*, *Lemna minor*, encore plus préférentiellement à partir des espèces *Zostera marina* et *Zostera noltii*

12) Produit selon l'une des revendications 10 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend, de plus, de l'acide p-sulfoxy cinnamique.

13) Produit selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce qu'il se
20 présente sous la forme d'une solution, d'une émulsion, d'une poudre, d'une granule, d'un bâtonnet ou d'une composition d'enrobage.

14) Produit selon l'une des revendications 10 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend entre 0,01 et 100 g/L d'au moins un composé oligoapiogalacturonane, lorsque ledit produit se présente sous une forme liquide ou entre 0,01 et 100 g/Kg d'au
25 moins un composé oligoapiogalacturonane, lorsque ledit produit se présente sous une forme solide.

15) Produit selon l'une des revendications 10 à 14, caractérisé en ce qu'il comprend, de plus, une ou plusieurs matières fertilisantes, un ou plusieurs produits phytosanitaire, préférentiellement un ou plusieurs produits éliciteurs, ou un mélange.

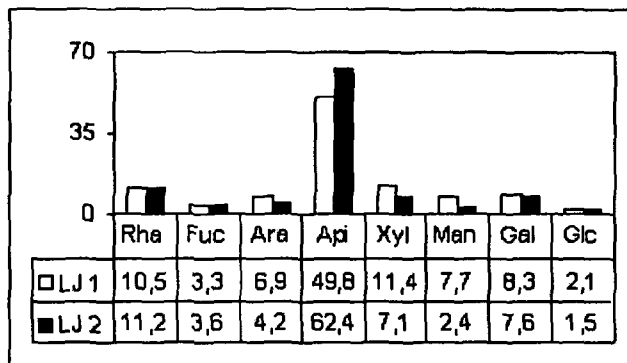


Fig. 1