



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1998/03/19
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1998/09/24
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2008/06/10
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 1999/09/17
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1998/000555
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1998/041091
(30) Priorité/Priority: 1997/03/19 (FR97/03386)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *A01N 43/16* (2006.01),
A01P 21/00 (2006.01), *A01P 3/00* (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
YVIN, JEAN-CLAUDE, FR;
LEVASSEUR, FLORENCE, FR;
TRAN THANH, KIEM-NGOC, FR;
BUI, VAN, FR

(73) Propriétaire/Owner:
LABORATOIRES GOEMAR S.A., FR

(74) Agent: GOUDREAU GAGE DUBUC

(54) Titre : COMPOSITION ET PROCEDE POUR LA STIMULATION DE LA GERMINATION DES GRAINS DE POLLEN
(54) Title: COMPOSITION AND METHOD FOR STIMULATING POLLEN GERMINATION

(57) **Abrégé/Abstract:**

Composition pour application notamment foliaire comprenant un véhicule, les constituants classiques des compositions pour application notamment foliaire et une substance active, caractérisée par le fait que la substance active est constituée par au moins un produit phytosanitaire propre à stimuler la germination des grains de pollen, choisi dans le groupe comprenant: les oligosaccharides ayant un degré de polymérisation pouvant aller jusqu'à 10 et comportant jusqu'à 10, de préférence jusqu'à 5 et, plus préférentiellement encore, deux unités glucidiques liées par des liaisons β 1-3, β 1-4 et α 1-3, notamment ceux du groupe comprenant le laminaribiose, le cellobiose, le nigerose, le laminaritriose, le laminaritétraose et le laminaripentaose; les dérivés des oligosaccharides précédents substitués sur l'atome de carbone anomérique libre ou sur l'ensemble des carbones porteurs d'un hydroxyde libre par un radical choisi dans le groupe comprenant: les radicaux alkyle en C₁ à C₅, de préférence le radical méthyle; les radicaux acyle en C₁ à C₅, de préférence le radical acétyle; les radicaux aryle, de préférence ceux de type pyridylamino; les radicaux cycloalkyle en C_x à C_y; les amines; le radical N-acétyle; et les radicaux sulfate et phosphate.



PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A01N 43/16	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/41091 (43) Date de publication internationale: 24 septembre 1998 (24.09.98)
--	-----------	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00555

(22) Date de dépôt international: 19 mars 1998 (19.03.98)

(30) Données relatives à la priorité:
97/03386 19 mars 1997 (19.03.97) FR(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LABORA-
TOIRES GOËMAR S.A. [FR/FR]; ZAC de la Madeleine,
F-35400 Saint Malo (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): YVIN, Jean-Claude
[FR/FR]; 3, rue Gabriel Desgrés, F-35400 Saint Malo
(FR). LEVASSEUR, Florence [FR/FR]; 7, rue de la Loutre,
F-35400 Saint Malo (FR). TRAN THANH, Kiem-Ngoc
[FR/FR]; 104, avenue du Général Leclerc, F-91190 Gif sur
Yvette (FR). BUI, Van, Le [VN/FR]; 9, chemin Desmoulin,
F-91190 Gif sur Yvette (FR).(74) Mandataire: KOCH, Gustave; Cabinet Plasseraud, 84, rue
d'Amsterdam, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE,
GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet
ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**Publiée***Avec rapport de recherche internationale.*

(54) Title: COMPOSITION AND METHOD FOR STIMULATING POLLEN GERMINATION

(54) Titre: COMPOSITION ET PROCÉDE POUR LA STIMULATION DE LA GERMINATION DES GRAINS DE POLLEN

(57) Abstract

The invention concerns a composition for in particular foliar application comprising a vehicle, standard constituents for application in particular foliar and an active substance, characterised in that the active substance consists of at least a plant protectant capable of stimulating pollen germination, selected among the group comprising: oligosaccharides with a degree of polymerisation up to 10 and comprising up to 10, preferably up to 5 and, more preferably still, two carbohydrate units bound by β 1-3, β 1-4, and α 1-3 bonds, particularly those of the group comprising laminaribiose, cellobiose, nigerose, laminaritriose, laminaritetraose, and laminaripentaose; the derivatives of the above oligosaccharides substituted on the free anomeric carbon atom or on the whole set of carbons bearing a free hydroxide by a radical selected in the group comprising: C₁ to C₅ alkyl radicals, preferably methyl radical; C₁ to C₅ acyl radicals, preferably acetyl radical; aryl radicals, preferably those of the pyridylamino type; C_x to C_y cycloalkyl radicals; amines; N-acetyl radical; and sulphate and phosphate radicals.

(57) Abrégé

Composition pour application notamment foliaire comprenant un véhicule, les constituants classiques des compositions pour application notamment foliaire et une substance active, caractérisée par le fait que la substance active est constituée par au moins un produit phytosanitaire propre à stimuler la germination des grains de pollen, choisi dans le groupe comprenant: les oligosaccharides ayant un degré de polymérisation pouvant aller jusqu'à 10 et comportant jusqu'à 10, de préférence jusqu'à 5 et, plus préférentiellement encore, deux unités glucidiques liées par des liaisons β 1-3, β 1-4 et α 1-3, notamment ceux du groupe comprenant le laminaribiose, le cellobiose, le nigerose, le laminaritriose, le laminaritetraose et le laminaripentaose; les dérivés des oligosaccharides précédents substitués sur l'atome de carbone anomérique libre ou sur l'ensemble des carbones porteurs d'un hydroxyde libre par un radical choisi dans le groupe comprenant: les radicaux alkyle en C₁ à C₅, de préférence le radical méthyle; les radicaux acyle en C₁ à C₅, de préférence le radical acétyle; les radicaux aryle, de préférence ceux de type pyridylamino; les radicaux cycloalkyle en C_x à C_y; les amines; le radical N-acétyle; et les radicaux sulfate et phosphate.

**COMPOSITION ET PROCEDE POUR LA STIMULATION DE LA
GERMINATION DES GRAINS DE POLLEN**

5 L'invention a pour objet une composition comprenant en tant que substance active au moins un produit phytosanitaire du genre de ceux qui sont propres à stimuler la germination des grains de pollen.

10 Elle vise également un procédé de traitement des plantes pour la stimulation de la germination des grains de pollen par application notamment foliaire de la susdite composition.

15 Elle vise enfin, et ce à titre de produits industriels nouveaux, pour autant qu'il s'agit de leur utilisation en vue de la stimulation en question, les produits phytosanitaires qui constituent la substance active de la susdite composition.

20 La germination des grains de pollen se produit après la pollinisation au cours de laquelle les grains de pollen sont transportés sur les fleurs et retenus à la surface réceptrice du stigmate; elle permet la fécondation proprement dite et la constitution de l'embryon grâce à la formation à partir du grain de pollen d'un organe appelé tube pollinique; celui-ci s'enfonce dans le stigmate, puis dans le style et enfin pénètre jusqu'au sac embryonnaire dans lequel se produit la fécondation.

25 Il est bien connu (voir par exemple la page 405 de l'ouvrage BIOLOGIE VÉGÉTALE, "Croissance Morphogenèse Reproduction" par P. Champagnat, P. Ozenda et L. Baillaud, paru chez Masson et Cie, Editeurs, édition 1969) que la longévité du grain de pollen, une fois la pollinisation réalisée, est faible et ne dépasse généralement pas une durée de 24 heures.

30 Et lorsque la germination d'un grain de pollen donné n'a pas lieu pendant cette courte durée, la fécondation qu'il aurait pu assurer ne se produit pas et

35

l'un des descendants possibles de la plante est perdu.

L'homme du métier a donc cherché des moyens susceptibles de favoriser la germination des grains de pollen et par là augmenter le rendement des cultures.

5 C'est ainsi qu'il a déjà été proposé de stimuler la germination des grains de pollen en appliquant aux cultures des solutions boratées.

Il se trouve que les résultats enregistrés ne sont pas considérés comme satisfaisants par les utilisateurs.

10 Il a par ailleurs été constaté que le saccharose qui est le sucre le plus abondant dans les plantes exerçait une certaine stimulation sur la germination des grains de pollen; compte tenu des résultats peu encourageants, les travaux qui ont conduit à cette
15 constatation n'ont jamais dépassé le stade du laboratoire.

L'invention a donc pour but, surtout, de remédier à cette situation et de fournir des produits phytosanitaires du genre en question qui répondent, de façon satisfaisante et en tout cas mieux que le saccharose et les solutions
20 boratées, aux divers desiderata de la pratique.

Et la Société Demanderesse a trouvé, à l'issue de recherches approfondies, que de façon surprenante et inattendue, ce but pouvait être atteint dès lors qu'il est fait recours, à titre de produits phytosanitaires du genre
25 en question, à ceux d'un groupe comprenant certains oligosaccharides dont la structure, qui est différente de celle du saccharose, permettait d'autant moins de prévoir qu'ils possédaient la faculté stimulatrice recherchée que certains oligosaccharides de structure très proche de
30 celle des représentants dudit groupe ont une activité nulle sur la germination des grains de pollen.

Il s'ensuit que la composition pour application notamment foliaire conforme à l'invention qui comporte un véhicule, les constituants classiques des compositions
35 pour application notamment foliaire et une substance

active, est caractérisée par le fait que la substance active est constituée par au moins un produit phytosanitaire propre à stimuler la germination des grains de pollen, choisi dans le groupe comprenant:

5 - les oligosaccharides ayant un degré de polymérisation pouvant aller jusqu'à 10 et comportant jusqu'à 10, de préférence jusqu'à 5 et, plus préférentiellement encore, deux unités glucidiques liées par des liaisons β 1-3, β 1-4 et α 1-3, notamment ceux du
10 groupe comprenant le laminaribiose, le cellobiose, le nigerose, le laminaritriose, le laminaritétraose et le laminaripentaose,

 - les dérivés des oligosaccharides précédents substitués sur l'atome de carbone anomérique libre ou sur
15 l'ensemble des carbones porteurs d'un hydroxyde libre par un radical choisi dans le groupe comprenant:

 - les radicaux alkyle en C_1 à C_5 , de préférence le radical méthyle,

20 - les radicaux acyle en C_1 à C_5 , de préférence le radical acétyle,

 - les radicaux aryle, de préférence ceux de type pyridylamino,

 - les radicaux cycloalkyle en C_x à C_y ,

 - les amines,

25 - le radical N-acétyle et

 - les radicaux sulfate et phosphate.

 Le procédé de traitement des plantes pour la stimulation de la germination des grains de pollen est caractérisé par le fait qu'il comprend l'application
30 notamment foliaire de la composition conforme à l'invention.

 Selon un mode de réalisation avantageux de la composition conforme à l'invention, celle-ci comprend, en combinaison avec la substance constituée par le produit
35 phytosanitaire propre à stimuler la germination des grains

de pollen, au moins autre produit phytosanitaire, notamment un agent fongicide.

La présente invention concerne un procédé de traitement des plantes pour la stimulation de la germination
5 des grains de pollen, comprenant l'application foliaire d'une composition comprenant un excipient et un ingrédient actif capable de stimuler la germination de grains de pollen, ledit ingrédient actif étant choisi parmi le groupe comprenant le laminaribiose, le cellobiose, le nigerose, le
10 laminaritriose et des combinaisons de ceux-ci.

L'invention pourra être bien comprise à l'aide du complément de description qui suit et des exemples non limitatifs qui sont donnés en rapport avec des modes de réalisation avantageux.

15 Se proposant, par conséquent, de stimuler la germination des grains de pollen, on s'y prend comme suit ou de façon équivalente.

On traite les plantes dont il s'agit de stimuler la germination des grains de pollen à l'aide d'une
20 composition pour application notamment foliaire comprenant, outre les véhicules et constituants classiques de ce genre de compositions, au moins un des produits phytosanitaires propres à stimuler la germination desdits grains de pollen et choisis parmi ceux du groupe défini
25 plus haut.

Ce traitement est réalisé au moment de la floraison et plus précisément au moment de la pollinisation.

Il est mis en oeuvre, de préférence, avant ou au moment de l'ouverture des anthères.

30 Il peut être effectué par pulvérisation de la composition conforme à l'invention.

4a

Il est possible d'avoir recours à une seule pulvérisation; toutefois, il peut être avantageux de la renouveler au moins une fois; dans ce cas, la première pulvérisation est avantageusement effectuée deux jours
5 avant l'ouverture des anthères et la deuxième le jour même de cette ouverture.

Le moment précis sera choisi en fonction de la plante traitée.

Celle-ci pourra être constituée par toute plante
10 d'intérêt agronomique ou ornemental pour laquelle la fécondation fait appel soit à un mécanisme de pollinisation croisée (désignée par le terme

allopollinisation), soit à un mécanisme de pollinisation directe (désignée par le terme autopolinisation) dans lesquels le pollen et le stigmate intéressés appartiennent à un même individu. Les plantes qui ne sont pas visées par la présente invention sont celles dont les enveloppes externes des fleurs ne s'ouvrent pas et dans lesquelles la pollinisation s'effectue en quelque sorte à huis clos, le pollen n'étant pas mis en liberté et germant directement dans l'anthère; c'est le cas des fleurs cléistogames.

De bons résultats ont été obtenus avec des plantes aussi diverses que

- le tabac,
- les plantes légumières telles que les carottes, tomates, choux-fleurs et pommes de terre,
- des arbres fruitiers tels que le pommier, le cerisier et le prunier,
- les plantes oléagineuses telles que le soja, le tournesol et le colza,
- des céréales telles que le maïs,
- des fleurs telles que le liliun.

La concentration en matière active des compositions pour application foliaire selon l'invention est de 1 à 20% en poids, de préférence de 1,5 à 10% et plus préférentiellement encore de 2 à 8% en poids.

La quantité de composition appliquée à l'hectare est telle qu'elle apporte à l'hectare de 10 à 1000 g de matière active, de préférence de 20 à 500 g et plus préférentiellement encore de 50 à 250 g.

Lorsque la composition est liquide, le véhicule est généralement l'eau.

Il est toutefois possible d'avoir recours, en lieu et place de l'eau, à un véhicule choisi dans le groupe comprenant les huiles minérales, les huiles végétales, tous corps gras liquides et les alcools dont notamment le propylèneglycol ou la glycérine.

Les constituants classiques essentiels des compositions selon l'invention sont fonction de la matière active et des plantes traitées; ils sont choisis généralement dans le groupe comprenant des charges solides, des solvants, des agents tensio-actifs, des agents dispersants et des agents émulsifiants.

Lorsque les compositions selon l'invention sont sous forme de poudre, le véhicule est avantageusement constitué par une charge notamment minérale.

Cette charge peut être choisie dans le groupe comprenant le kaolin, l'argile finement dispersée et le talc.

Dans le cas des compositions sous forme de poudre, les constituants classiques sont généralement choisis dans le groupe comprenant les dextrans.

Il est à noter que les compositions sous forme de poudre sont diluées, au moment de l'emploi, dans un véhicule constitué notamment par l'eau.

Les compositions visées par l'invention peuvent se présenter sous forme d'engrais liquides à base d'au moins un des produits phytosanitaires du groupe défini plus haut en combinaison éventuellement avec un ou plusieurs oligo-éléments correcteurs de carence qui peuvent être choisis dans le groupe comprenant les sels de molybdène et de manganèse.

On indique ci-après quelques exemples de compositions conformes à l'invention.

EXEMPLE 1

Composition à usage agricole à base de laminaribiose.

Dans cette composition, le laminaribiose se trouve associé à des oligo-éléments sous forme d'engrais liquide.

Pour 1 kg en poids/poids, cette composition est constituée de

WO 98/41091

PCT/FR98/00555

7

5	- sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0,3010 kg
	- sulfate de manganèse, 1H ₂ O	0,0510 kg
	- sulfate de zinc, 7H ₂ O	0,1060 kg
	- laminaribiose	0,0350 kg
	- Tween 80	0,0050 kg
	- eau	0,5020 kg
		1,0000 kg

10 Cette composition peut être utilisée à la dose de 3 litres/ha au stade floraison sur des arbres fruitiers.

EXEMPLE 2

Composition à usage agricole à base de cellobiose et nigerose.

15 Cette composition se présente sous forme d'engrais liquide contenant les matières actives en association avec du bore et du molybdène.

Pour 1 kg en poids/poids, cette composition est constituée de

20	- acide borique	0,150 kg
	- molybdate de sodium	0,005 kg
	- cellobiose	0,030 kg
	- nigerose	0,030 kg
	- eau	0,780 kg
25	- méthyl paraben sodé	0,005 kg
		1,000 kg

30 Cette composition peut être utilisée à la dose de 3 litres/ha au moment de la pollinisation sur le pommier.

EXEMPLE 3

Composition à usage agricole à base de laminaribiose.

35 Cette composition soluble se présente sous forme de poudre contenant la matière active en association avec du bore et du molybdène.

Pour 1 kg en poids/poids, cette composition est constituée de

8

5	- acide borique	0,300 kg
	- molybdate de sodium	0,010 kg
	- laminaribiose	0,170 kg
	- kaolin	0,520 kg
		1,000 kg

10 Cette composition pourra être utilisée après dissolution dans l'eau à raison de 10 g/l à la dose de 1 kg/ha au moment de la floraison sur les plantes légumières.

EXEMPLE 4

Composition à usage agricole à base de nigerose et d'un fongicide.

15 On dissout 1 g de nigerose dans 699 g d'eau.

Dans cette solution, on met en suspension 300 g de fongicide de marque Manganil 80 commercialisé par la Société Bourgeois sous le N° APV 7000073; ce fongicide contient 80% de matière active constituée par du manèbe.

20 La suspension ainsi obtenue a une teneur en nigerose de 0,1% et en manèbe de 24%.

Elle peut être appliquée à la surface des feuilles par pulvérisation après dissolution dans l'eau à une concentration comprise entre 0,1 et 50 ml/l.

25 La quantité appliquée est de 5 l/ha.

Cette composition exerce une action de stimulation de la fécondation en même temps qu'une protection fongicide.

30 Elle est avantageusement utilisée contre le mildiou de la vigne et des tomates.

Pour une plus grande commodité de transport et de stockage, on prépare avantageusement des concentrés qui, au moment de l'emploi, sont dilués avec la quantité appropriée de véhicule pour fournir la composition prête à être utilisée.

Les concentrés comportent tous les constituants des

5 compositions conformes à l'invention et ce dans les rapports pondéraux de ces constituants dans les compositions telles que mises en oeuvre; au contraire, le véhicule est présent seulement en une quantité compatible avec le mode de pulvérisation.

On peut également avoir recours à des compositions pulvérisables à base d'huile ou à des concentrés émulsifiables notamment dans le cas de mélanges avec des substances additionnelles non solubles dans l'eau.

10 Dans la mesure où on ne les trouve pas dans le commerce, les matières actives mises en oeuvre dans les compositions conformes à l'invention sont accessibles, par des réactions connues de dégradation enzymatique ou acide de substrats les contenant.

15 A titre d'exemple, on décrit ci-après la préparation de cellobiose, de laminaribiose et de nigerose.

20 **EXEMPLE 5**

Préparation du cellobiose (β 1-4-diglucose).

La matière première utilisée est la cellulose.

25 On soumet 100 g de cellulose commerciale, à savoir celle commercialisée par la Société Fluka sous la désignation "cellulose powder", après dissolution dans 1000 ml d'H₂O à l'action d'une β (1-4)-glucanohydrolase ou cellulase commerciale, à savoir celle commercialisée par Sigma Chimie sous la désignation EC 3.2.1.4.

30 La quantité d'enzyme ajoutée est de 1 g, soit 300 unités.

Les conditions d'hydrolyse sont les suivantes:

- pH : 5
- température : 37°C
- temps d'hydrolyse : 5 heures.

35 Après ces 5 heures d'incubation, l'enzyme est

inhibée par chauffage à 100°C pendant 15 minutes.

La solution ainsi obtenue est soumise à une ultrafiltration tangentielle sur un système commercialisé sous la marque PELLICON par la Société Millipore; ce système est équipé d'une cassette de porosité de 1000 Daltons associée à une pompe commercialisée sous la marque PROCON par la Société Millipore.

Le filtrat obtenu est concentré par évaporation sous vide puis lyophilisé; on obtient 50 g de poudre correspondant au cellobiose pur; la pureté de ce cellobiose est contrôlée par chromatographie liquide haute pression, plus particulièrement par chromatographie ionique couplée à l'ampérométrie en utilisant la résine échangeuse d'ions commercialisée par la Société Dionex Chemical Corp., filiale de Dow, sous la marque DIONEX.

EXEMPLE 6

Préparation de laminaribiose (β 1-3-diglucose).

La matière première est du curdlan, à savoir un polymère extrait d'*Alcaligenes faecalis*.

On soumet 100 g de curdlan commercialisé sous la référence C7821 par Sigma Chimie, après dissolution dans 1000 ml d'eau, à l'action d'une β -1-3-endoglucanase EC 3.2.1.2.1 commercialisée sous la référence C4511 par Sigma Chimie.

La quantité d'enzyme mise en oeuvre est de 1 g, soit 60 unités.

Les conditions d'hydrolyse sont les suivantes:

- pH : 6
- température : 40°C
- temps d'hydrolyse : 6 heures.

Après 6 heures d'incubation, la réaction enzymatique est stoppée par chauffage à 100°C pendant 15 minutes.

La solution ainsi obtenue est soumise à une

5 ultrafiltration tangentielle sur un système de marque PELLICON commercialisé par la Société Millipore; ce système est équipé d'une cassette de porosité de 1000 Daltons associée à une pompe de marque PROCON également commercialisée par la Société Millipore.

Le filtrat est ensuite concentré par osmose inverse puis lyophilisé et l'on obtient 70 g de poudre constituée de glucose et de laminaribiose dans les proportions 50/50.

10 On isole le laminaribiose par addition dans le mélange, d'une levure obtenue à partir de la souche *Shizosaccharomyces pombe* IFO 0358 qui métabolise spécifiquement le glucose sans aucune dégradation du laminaribiose.

15 On obtient ainsi, après élimination des cellules de levure, du laminaribiose d'une pureté de 90%.

EXEMPLE 7

Préparation du nigerose (α -1-3-diglucose).

20 La matière première est le nigeran commercial.

On soumet 100 g de nigeran commercialisé sous la référence N2888 par Sigma Chimie à l'action d'une solution d'acide sulfurique 0,1 M à une température d'environ 80°C pendant une durée de 6 heures.

25 Cette hydrolyse est suivie d'une étape de neutralisation par addition d'une base forte telle que la soude jusqu'à obtention d'un pH compris entre 6 et 8, puis d'une étape de dessalage par passage du produit ainsi neutralisé sur une résine échangeuse d'ions et enfin une étape de réduction en poudre par atomisation.

30 On obtient ainsi 70 g de poudre comportant environ 35 g de nigerose en mélange avec 35 g de glucose.

35 On isole le nigerose par passage du mélange nigerose + glucose sur une colonne de chromatographie remplie de résine commercialisée par la Société Pharmacia sous la marque SEPHADEX G10.

On obtient ainsi deux fractions séparées en fonction de leur poids moléculaire, à savoir, d'une part, le glucose et, d'autre part, le nigerose d'une pureté de 90%.

5

Les autres oligosaccharides préférés, à savoir le laminaritriose, le laminaritétraose et le laminaripentaose peuvent être préparés par application de la méthode de dégradation enzymatique des β -1-3 glucans suivie de purification, illustrées à l'exemple 6.

10

C'est à l'issue d'un travail approfondi de sélection, rendu possible grâce à des tests de laboratoire mis au point dans le cadre de ses travaux et qui vont être décrits ci-après, que la Société Demanderesse a pu identifier les produits phytosanitaires qui sont utilisés conformément à l'invention dans les compositions définies plus haut.

15

Ces tests ont également permis de déterminer les concentrations optimales en substance active desdites compositions.

20

Les résultats obtenus ont été confirmés par des essais en plein champ.

Le principe des tests dont il vient d'être question et qui sont en eux-mêmes originaux, consiste à faire germer des grains de pollen d'une plante donnée au sein d'une solution aqueuse de la substance phytosanitaire que l'on teste du point de vue de ses activités stimulatrices de la germination.

25

Il est important de veiller à ce que l'eau dans laquelle sont effectuées les expériences soit d'une très grande pureté; le degré de pureté minimum peut être caractérisé par une résistivité supérieure à 10 mega- Ω x cm.

30

On décrit ci-après lesdits tests dans leur application à une plante donnée, à savoir le tabac.

35

On récolte les grains de pollen de *Nicotiana*

tabacum à partir des anthères juste déhiscentes sur des fleurs bien épanouies; chaque fleur possède cinq anthères.

5 Pour cette récolte, on détache les anthères de leurs filaments; quatre anthères sont identiques au point de vue longueur de filament; la cinquième qui a un filament plus court n'est pas utilisée par souci d'homogénéité.

10 On travaille dans le champ de vision d'une loupe binoculaire, ce qui permet d'effectuer plus facilement les manipulations; on enlève, après les avoir disposées dans un verre de montre rempli d'une eau répondant aux susdites conditions de pureté, les parois des anthères pour libérer les grains de pollen.

15 On nettoie les grains de pollen par trois ou quatre lavages à l'aide de la même eau pure.

On laisse décanter et on élimine ceux des grains qui flottent.

20 On élimine l'excès d'eau et on obtient une suspension de grains de pollen désignée par "SP" contenant environ 100 grains de pollen par ml d'eau.

25 On prépare par ailleurs des solutions aqueuses de concentrations croissantes des produits devant être testés du point de vue de leurs éventuelles activités stimulatrices de la germination des grains de pollen; ces concentrations croissantes sont de 5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2000 µg/ml, 2500 µg/ml, 3000 µg/ml, 4000 µg/ml, 5000 µg/ml, 6000 µg/ml.

30 Du point de vue pratique, on utilise des plaques de titration comportant par exemple 6 rangées de 4 puits ayant un diamètre de 1 cm et une profondeur de 1 cm.

A la place des plaques de titration on peut utiliser des boîtes de Pétri.

35 On introduit dans chaque puits un volume de 100 µl d'une solution qui comporte un des produits à tester à

l'une des susdites concentrations.

On ajoute également dans chaque puits un volume de 100 µl de la suspension "SP".

Le mélange est homogénéisé.

5 C'est à l'intérieur des puits des plaques de titration que se produit la germination des grains de pollen et que l'on étudie l'activité stimulatrice des produits phytosanitaires.

10 Chaque expérience est réalisée au moins cinq fois et chaque fois on procède à deux répétitions pour le même produit.

Avantageusement, on teste, dans une première approche, des concentrations intermédiaires de 500 à 1000 µg/ml et, en fonction des résultats obtenus, on élargit le champ des expériences vers des concentrations supérieures ou vers des concentrations inférieures.

En même temps, on réalise deux expériences témoin.

20 Une première expérience témoin est effectuée dans l'eau répondant aux susdites conditions de pureté, c'est-à-dire directement sur la suspension "SP".

Une deuxième expérience témoin est effectuée en utilisant un tampon de germination comportant dans de l'eau

25 - du saccharose à raison de 12% en poids,
- de l'acide borique à raison de 0,01% en poids,
- du chlorure de calcium dihydrate à raison de 0,03% en poids.

30 Dans ce tampon, le saccharose est présent à raison de 12%; c'est à cette dose que le saccharose était utilisé antérieurement dans les expériences de laboratoire connues; le tampon contient par ailleurs l'ion bore à une concentration correspondant à celles auxquelles il est mis en oeuvre dans les compositions au bore connues pour la stimulation de la germination des grains de pollen.

35 Les plaques de titration sont ensuite maintenues à

l'obscurité pendant une durée de 24 à 48 heures à une température de 22°C à 24°C.

5 Une première observation est faite sous la loupe binoculaire 5 à 6 heures, une deuxième 24 heures et une troisième 36 heures après le début de l'expérience.

A chacune des observations, on apprécie un certain nombre de paramètres, à savoir:

- la densité des grains de pollen en train de germer,
- la longueur du tube pollinique, cette appréciation
- 10 étant facilitée par l'utilisation d'une loupe binoculaire comportant un étalon interne,
- l'intensité de l'agglutination des grains de pollen,
- et
- la lyse de ces grains.

15 Il se trouve que ces paramètres sont difficilement quantifiables, même pour ce qui est de la longueur des tubes polliniques étant donné que ceux-ci ne sont pas toujours rectilignes.

20 On considère qu'une stimulation se produit lorsque le nombre de tubes polliniques développés dans les puits traités est supérieur au nombre de tubes développés dans les puits contenant le témoin.

Pour traduire l'intensité de la stimulation constatée pour un produit testé, il est convenu que

25 - lorsqu'il n'y a aucune stimulation, l'activité est considérée comme étant de 0%,

- lorsque la stimulation se traduit par germination totale et complète des grains de pollen, l'activité est considérée comme étant de 100%,

30 - les valeurs intermédiaires de l'activité, exprimées en %, correspondent à des stimulations qui se traduisent par une germination d'une partie des grains de pollen.

35 Dans le cas du tabac, les activités trouvées pour les produits phytosanitaires mis en oeuvre dans les

compositions conformes à l'invention et appartenant au groupe préférentiel défini plus haut, ainsi que les concentrations optimales déterminées pour ces produits, sont réunies dans le tableau A dans lequel on a également
5 indiqué la constitution chimique de chacun des produits en question.

TABLEAU A

10

Produit phytosanitaire	Monosaccharides le constituant	Liaison entre monosaccharides	Activité	Concentration optimale (en µg/ml)
Laminaribiose	glucose-glucose	β 1-3	80%	2000
Cellobiose	glucose-glucose	β 1-4	20%	3000
Nigerose	glucose-glucose	α 1-3	80%	1000
Laminaritriose	glucose-glucose-glucose	β 1-3	20%	2000
15 Laminaritetraose	(glucose)4	β 1-3	10%	2500
Laminaripentaose	(glucose)5	β 1-3	5%	3000

20

Les mêmes tests, appliqués à des monosaccharides du groupe comprenant le galactose, le mannose et le fucose, ont montré que les activités de ces produits ne dépassent pas 5% et que leur concentration optimale est de l'ordre de 3000 µg/ml.

25

Au vu des résultats réunis dans le tableau A, la laminaribiose et le nigerose sont particulièrement préférés.

30

L'essai témoin dans l'eau conduit à une activité nulle; l'essai témoin à l'aide du tampon de germination conduit à une activité de 5% et une concentration optimale de 3500 µg/ml.

Le fait que les concentrations optimales mentionnées dans le susdit tableau se situent au voisinage de la limite inférieure des fourchettes de concentration proposées plus haut, n'est pas surprenant compte tenu des

conditions de mise en oeuvre très particulières retenues pour les expériences en laboratoire.

5 L'invention est d'autant plus surprenante et inattendue que des activités nulles ont été enregistrées pour des produits de structure proche de celle des produits sélectionnés, à savoir:

- le maltose (glucose-glucose, α 1-4)
- le maltotriose (glucose-glucose-glucose, α 1-4)
- le α -tréhalose (glucose-glucose, α 1-1)
- 10 - le β -tréhalose (glucose-glucose, β 1-1)
- le sophorose (glucose-glucose, β 1-2)
- le galactobiose (galactose-galactose, β 1-6)
- le turanose (glucose-fructose, α 1-3)
- le maltitol (glucose-sorbitol, α 1-4)
- 15 - le raffinose (galactose-glucose-fructose, α 1-6, α 1-2).

On a également déterminé les concentrations optimales de laminaribiose pour la stimulation des grains de pollen

- du liliun,
- 20 - du pommier et
- du cerisier.

Pour ce faire, le laminaribiose a été mis en oeuvre sous la forme d'une composition pulvérulente à 80% en poids d'une pureté répondant aux susdites conditions.

25 Cette composition a été testée après dissolution dans l'eau à des concentrations allant de 1 $\mu\text{g/ml}$ à 300 $\mu\text{g/ml}$.

30 Une activité de 80% a été trouvée pour des concentrations de laminaribiose de 100 à 300 $\mu\text{g/ml}$ dans le cas du liliun, pour des concentrations de 200 à 300 $\mu\text{g/ml}$ dans le cas du pommier et une activité de 50% pour des concentrations de 50 à 300 $\mu\text{g/ml}$ dans le cas du cerisier.

35 L'activité stimulatrice de la germination des grains de pollen exercée par les produits phytosanitaires

mis en oeuvre dans le procédé et les compositions conformes à l'invention a été confirmée par des essais en plein champ.

5 **EXEMPLE 8**

Traitement du maïs en plein champ.

Cette expérience en plein champ a consisté à traiter une culture de maïs par application d'une composition formulée à 80% en poids de laminaribiose constituée comme suit:

10

- laminaribiose	80%
- humidité	5%
- matières minérales	10%
- mannitol	5%

15

100%

Cette composition se présente sous forme d'une poudre soluble dans l'eau.

20

Pour l'application sur les plants de maïs, on a préparé, à partir de la susdite composition pulvérulente, des solutions dans l'eau à des concentrations permettant l'application de doses de laminaribiose à l'hectare allant de 2,5 à 100 g.

25

Ces solutions ont été mises en oeuvre sur deux lignées A et B de maïs de qualités différentes; la lignée A faisait peu de pollen alors que la lignée B faisait du pollen en quantité importante.

30

Pour chacune des deux lignées A et B, l'expérience a été conduite sur une parcelle comportant deux fois huit rangs de plants de maïs. Chaque modalité de traitement était composée d'un rang de 20 plantes mâles et d'un rang de 20 plantes femelles, les deux rangs étant disposés côte à côte.

35

Les deux premiers rangs qui constituaient la première modalité de traitement, étaient des rangs témoins.

Les paires de rangs des modalités de traitement 2 à 4 ont été traitées par la susdite composition respectivement aux doses de laminaribiose de 2,5 g/ha, 5 g/ha et 10 g/ha.

5 La cinquième modalité de traitement comprenait de nouveau deux rangs témoins.

10 Les paires de rangs des modalités de traitement 6 à 8 ont été traitées respectivement par la susdite composition aux doses de laminaribiose de 50 g/ha, 75 g/ha et 100 g/ha.

Dans chaque cas, on a relevé le pourcentage G de grains germés.

On a effectué l'expérience à différents stades de la floraison.

15 Les meilleurs résultats ont été enregistrés en effectuant l'application à l'ouverture des anthères.

20 Ces derniers résultats, obtenus avec les lignées A et B, ont été reportés sur deux histogrammes I et II représentés sur la figure unique et montrant le pourcentage G de grains germés en fonction de la dose L (en g/ha) de laminaribiose.

25 De l'examen des histogrammes I et II, il apparaît que des activités supérieures à 40% dans le cas de la lignée A et supérieures à 35% dans le cas de la lignée B sont obtenues pour des doses de laminaribiose de 50 g/ha à 100 g/ha.

EXEMPLE 9

Traitement d'une variété de prunier en plein champ.

30 Cette expérience en plein champ a consisté à traiter un verger de pruniers d'Ente (clone P2733) âgés de 15 ans.

On a utilisé une composition à 65% en poids de laminaribiose constituée comme suit:

20

- laminaribiose	65%
- humidité	7%
- matières minérales	15%
- mannitol	13%

5

100%

Cette composition se présente sous la forme d'une poudre soluble dans l'eau.

10 Pour l'application sur les pruniers, on a préparé une solution dans l'eau de cette composition à une concentration permettant d'administrer 65 g de laminaribiose par hectare.

Une parcelle témoin a été traitée à l'eau pure.

15 L'application a été effectuée à la pleine floraison.

Des rameaux ont été prélevés sur des pruniers représentatifs à la pleine floraison sur la parcelle traitée et sur la parcelle témoin.

20 Les anthères ont été récupérées, par grattage, dans une boîte de Pétri que l'on a placée dans un dessiccateur durant 24 heures pour activer leur déhiscence. Une fois que les anthères étaient "mures", le pollen a été mis dans des tubes à essai placés au réfrigérateur.

25 Le taux de germination du pollen a été contrôlé après ensemencement sur milieu gélosé (1% de gélose et 15% de saccharose). L'ensemencement en pollen a été réalisé à l'aide d'un pinceau sec.

30 Deux ensembles de 10 boîtes de Pétri ont été ensemencées respectivement avec le pollen de la parcelle témoin et avec celui de la parcelle traitée.

Les boîtes de Pétri ont ensuite été mises à l'étuve à 22-23° et les observations, c'est-à-dire les comptages, ont été effectuées 24 heures après l'ensemencement.

35 Les observations sont faites à l'aide d'une loupe binoculaire.

21

10 observations de 20 grains de pollen (correspondant au champ de la loupe binoculaire) ont été effectuées par boîte de Pétri; 2000 grains ont donc été observés pour la parcelle traitée et 2000 pour la parcelle témoin.

Au cours des 100 observations effectuées en rapport avec les 10 boîtes de Pétri concernant la parcelle témoin, d'une part, et des 100 observations effectuées avec les 10 boîtes de Pétri concernant la parcelle traitée, d'autre part, on a dénombré:

- les grains non germés,
- les ébauches de tubes polliniques
- les tubes polliniques d'une longueur égale à 1 à 3 fois le diamètre des grains de pollen,
- les tubes polliniques d'une longueur supérieure à 3 fois le diamètre des grains de pollen,
- le pourcentage de grains germés.

Sur le tableau B ci-après, on a reporté les résultats de ces observations ainsi que les pourcentages de variation entre les résultats trouvés pour la parcelle témoin et ceux trouvés pour la parcelle traitée par la composition; ces pourcentages de variation traduisent les effets du traitement.

TABLEAU B

24 heures après ensemencement (milieu gélosé)	Pollen issu de la parcelle témoin	Pollen issu de la parcelle traitée	Effet du traitement (en %)
Grains non germés	1627	1264	- 22,3
Ebauches de tubes polliniques	6	9	+ 50
Tubes polliniques d'une longueur de 1 à 3 fois le diamètre des grains de pollen	139	216	+ 55,3
Tubes polliniques d'une longueur > 3 fois le diamètre des grains de pollen	211	479	+ 127
% de grains germés	17,8	35,2	+97,7

REVENDICATIONS

1. Procédé de traitement des plantes pour la stimulation de la germination des grains de pollen, comprenant l'application foliaire d'une composition comprenant un excipient et un ingrédient actif capable de stimuler la germination de grains de pollen, ledit ingrédient actif étant choisi parmi le groupe comprenant le laminaribiose, le cellobiose, le nigerose, le laminaritriose et des combinaisons de ceux-ci.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la composition comprend en surcroît un fongicide.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'excipient est choisi parmi le groupe comprenant les solutions aqueuses, l'eau, les huiles minérales, les huiles végétales, les gras liquides ou liquéfiés et l'alcool et les combinaisons de ceux-ci lorsque miscibles.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la composition comprend en surcroît un élément choisi parmi le groupe comprenant un diluant, un solvant, un agent tensio-actif, un agent de dispersion, un émulsifiant et des combinaisons de ceux-ci.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'ingrédient actif est présent dans la composition dans une concentration de 1 à 20% en poids.

6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'ingrédient actif est présent dans la composition dans une concentration de 1,5 à 10% en poids.

7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'ingrédient actif est présent dans la composition dans une concentration de 2 à 8% en poids.

8. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la composition est appliquée en quantité d'environ 10 à 1000g d'ingrédient actif par hectare.

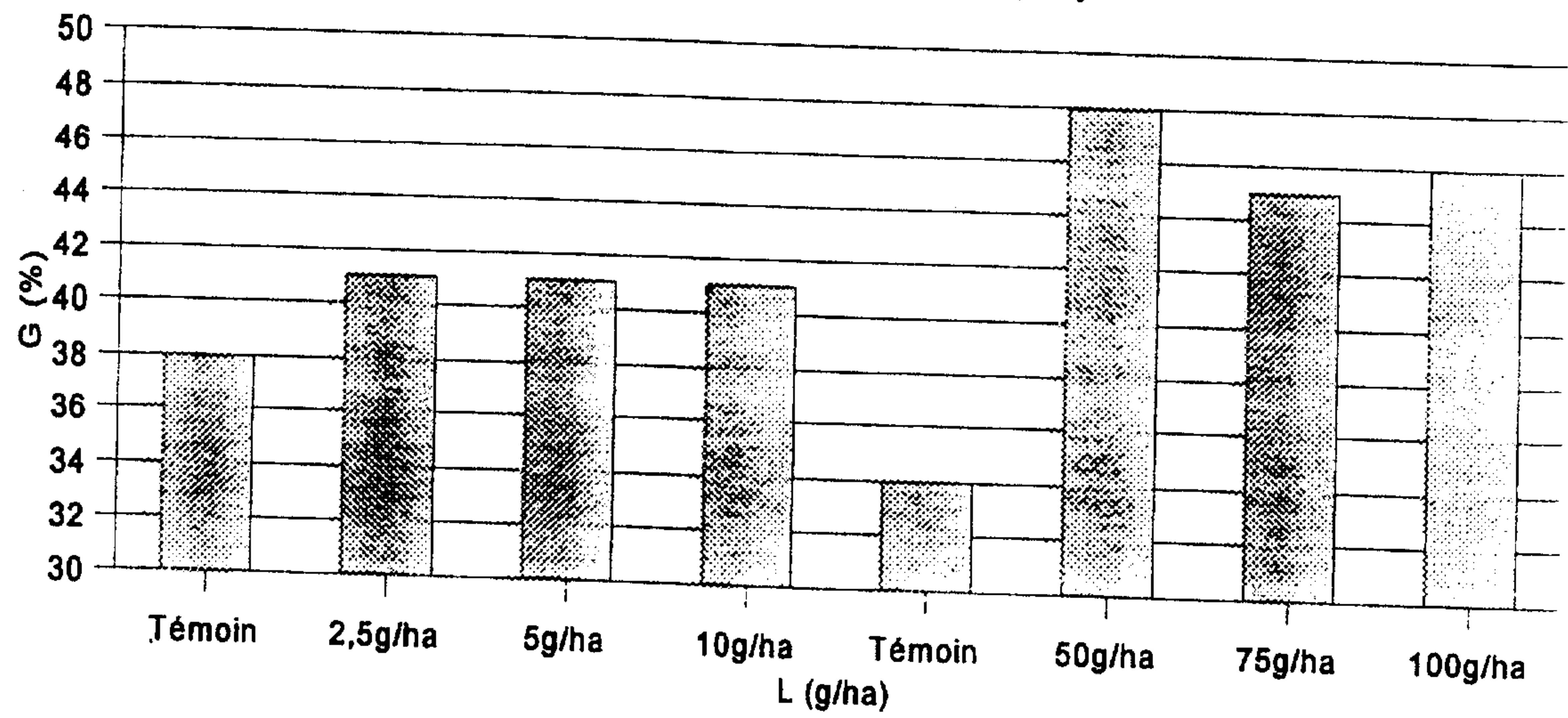
9. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la composition est appliquée en quantité d'environ 20 à 500g d'ingrédient actif par hectare.

10. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la composition est appliquée en quantité d'environ 50 à 250g d'ingrédient actif par hectare.

11. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'application foliaire est accomplie par atomisation et ce à une ou plus des périodes suivantes : lors de la floraison, lors de la pollinisation, avant l'ouverture des anthères ou suite à l'ouverture des anthères.

1/1

HISTOGRAMME I



HISTOGRAMME II

