

ROYAUME DU MAROC  
-----  
OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)  
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE  
-----



المملكة المغربية  
-----  
المكتب المغربي  
للملكية الصناعية والتجارية  
-----

## (12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 26114 A1** (51) Cl. internationale : **A01N 65/00**

(43) Date de publication :  
**01.04.2004**

---

(21) N° Dépôt :  
**27442**

(22) Date de Dépôt :  
**15.12.2003**

(30) Données de Priorité :  
**15.06.2001 FR 0107898**

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT:  
**PCT/FR02/02056 14.06.2002**

(71) Demandeur(s) :  
• **VALORAGRI S.A., 3 QUAI VICTOR HUGO F-11100 NARBONNE (FR)**  
• **UNIVERSITE MONTPELLIER II, PLACE EUGENE BATAILLON F-34095 MONTPELLIER CEDEX (FR)**  
• **S.O.F.T. SARL, 227, RUE ANDRE CITROEN PARC D'ACTIVITES DU CANALET F-11210 PORT LA NOUVELLE (FR)**

(72) Inventeur(s) :  
**DELRIEUX MICHEL ; CASSAN HENRI ; MARTINEZ CHRISTELLE ; DELPECH LUCIEN ; BACCOU JEAN CLAUDE**

(74) Mandataire :  
**M. MEHDI SALMOUNI-ZERHOUNI**

---

(54) Titre : **ELICITEUR PROVENANT D'EXTRAITS DE GRAINES DE TRIGONELLA FOENUM GRAECUM ET SON UTILISATION DANS UN PROCEDE DE LUTTE CONTRE LES AGENTS PATHOGENES DE PLANTES.**

(57) Abrégé : La lutte contre les agents pathogènes dans les plantes agronomiquement utiles comprend l'application d'un inducteur de résistance obtenu à partir d'extraits de graines de fenugrec *Trigonella Foenum graecum*. Une revendication indépendante est également incluse pour la préparation de l'inducteur qui consiste à broyer les graines de fenugrec, à séparer le cotylédon et l'endosperme du tégument et de la gomme, à mélanger le cotylédon et l'endosperme avec de l'eau, extraire la matière active avec de l'eau sous agitation.

**MEMOIRE DESCRIPTIF**

joint à l'appui d'une demande de brevet d'invention ayant pour titre :

« Eliciteur provenant d'extraits de graines de *Trigonella foenum graecum* et son utilisation dans un procédé de lutte contre les agents pathogènes de plantes »

**Déposants**

1° VALORAGRI S.A.  
3 quai Victor Hugo  
F-11100 NARBONNE  
FRANCE

2° S.O.F.T. SARL  
227 rue André Citroën  
Parc d'activités du Canalet  
F-11210 PORT LA NOUVELLE  
FRANCE

3° UNIVERSITE MONTPELLIER II  
Place Eugène Bataillon  
F-34095 MONTPELLIER CEDEX  
FRANCE

**Inventeurs**

1° MARTINEZ Christelle  
227 rue André Citroën  
Parc d'activités du Canalet  
F-11210 PORT LA NOUVELLE  
FRANCE

2° BACCOU Jean Claude  
Place Eugène Bataillon  
F-34095 MONTPELLIER CEDEX  
FRANCE

3° DELPECH Lucien  
227 rue André Citroën  
Parc d'activités du Canalet  
F-11210 PORT LA NOUVELLE  
FRANCE

26114

01 AVE 2004

4° DELRIEUX Michel  
227 rue André Citroën  
Parc d'activités du Canalet  
F-11210 PORT LA NOUVELLE  
FRANCE

5° CASSAN Henri  
23 avenue de Bordeaux  
F-11100 NARBONNE  
FRANCE

*Mandataire*

M. Mehdi SALMOUNI-ZERHOUNI  
Forum International Bldg  
62 Boulevard d'Anfa  
20000 CASABLANCA MAROC

\*\*\*\*\*

**Procédé de lutte contre des agents pathogènes de plantes  
agronomiquement utiles à l'aide d'un nouvel éliciteur et composition  
pour la mise en œuvre de ce procédé**

5 **Domaine de l'invention**

La présente invention concerne un procédé de lutte contre des agents pathogènes et toutes sortes de parasites de plantes (champignon, bactéries, virus, insectes...etc...) à l'aide d'un nouveau stimulateur des défenses naturelles des plantes ou éliciteur et composition pour la mise  
10 en œuvre de ce procédé. La nouvelle composition est active à titre préventif et curatif et comprend un extrait de graines de fenugrec ou *Trigonella foenum graecum*.

**Technique antérieure**

15 Les plantes subissent en permanence une pression parasitaire de la part de nombreux agents pathogènes comme des virus, des bactéries, des champignons ou des insectes. La résistance de la plante à un agent pathogène résulte soit de la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante (relation gène pour gène), soit de la stimulation des défenses sous l'effet de blessures causées par le parasite.

20 Dans le premier cas, la résistance résulte de la reconnaissance de l'agent pathogène porteur d'un gène particulier appelé "gène d'avirulence" par la plante dotée d'un "gène de résistance" correspondant. Dans ce cas, il existe une véritable relation interactive génétiquement programmée entre plante et parasite. Après reconnaissance des deux protagonistes,  
25 des mécanismes spécifiques sont alors développés par la plante (cascade d'événements métaboliques, synthèse de signaux messagers de la résistance), lui conférant le caractère de résistance tandis que l'invasion des tissus hôtes par l'agent pathogène reste très localisée.

30 Dans le second cas, les mécanismes de défense sont induits, lors d'attaques fongiques par exemple, par les oligosaccharides émanant d'une part de la dégradation des parois du champignon sous l'action des

hydrolases de l'hôte, et d'autres part des parois des cellules hydrolysées par les enzymes du champignon. Ces débris de parois servent également de messagers de la résistance.

5 Suite à un premier déclenchement des mécanismes de résistance, les végétaux peuvent développer une résistance accrue face à de nouvelles attaques de parasites, notamment dans les parties non infectées de la plante, et ceci à nouveau grâce à certains «messagers chimiques naturels». Ce mécanisme est appelé «Résistance Systémique Acquise».

10 Lorsqu'une plante est sensible à un agent pathogène, celle-ci est incapable de reconnaître son agresseur, soit par la relation gène pour gène, soit par l'effet «blessure». Celle-ci est alors incapable d'activer de façon efficace ses gènes de défense. Il est alors possible de stimuler les défenses naturelles des plantes en leur fournissant de façon exogène ces  
15 «signaux chimiques naturels» de la résistance qu'elles sont incapables de produire dans certains cas vis à vis de certains agents pathogènes.

Lorsqu'il y a reconnaissance entre la plante et l'agent pathogène, des mécanismes particuliers sont développés par la plante. Souvent la plante répond par une apparition de nécrose cellulaire sur le site de  
20 l'attaque par l'agent pathogène et bloque ainsi sa progression. Cette réaction de défense est presque toujours associée à la mise en œuvre de mécanismes tels que la biosynthèse de phytalexines (molécules antifongiques), d'enzymes de défense comme les peroxydases ou des protéines en liaison avec la pathogénèse (protéines PR) comme les  
25 chitinases ou les  $\beta$ -1,4-endoglucanases. Ces enzymes sont capables de lyser les parois fongiques et bactériennes. Lorsqu'il y a résistance, les plantes sont capables de renforcer les parois cellulaires (synthèse de lignine) pour bloquer l'agent pathogène sur son site de pénétration.

On connaît un procédé pour la stimulation des défenses  
30 naturelles de plantes agronomiquement utiles qui comprend l'application auxdites plantes d'un agent éliciteur ou sensibilisateur qui est capable au

contact des plantes de provoquer préventivement dans celles-ci l'activation des gènes de défense sur le site d'application du produit ainsi qu'une résistance systémique acquise. Un tel procédé est plus particulièrement décrit dans la demande de brevet français déposée le 18  
5 juillet 1997 sous le No. 2 766 059 déposée par les Laboratoires GOEMAR. Ce procédé utilise une quantité efficace d'un oligo  $\beta$  1-3-glucane. Celui-ci est préparé à partir de  $\beta$  1-3-glucanes d'origine diverses qui sont hydrolysés en oligo  $\beta$  1-3-glucanes. Les  $\beta$  1-3-glucanes proviennent de bactéries, notamment d'*Alcaligenes faecalis*, de  
10 champignons, notamment de *Schizophyllum* et de *Sclerotium glaucinum*, de levures, notamment de *Saccharomyces cerevisiae*, d'algues et de céréales.

Cependant, ce procédé ne permet pas de provoquer une résistance plusieurs fois de suite du même plant. Une seule pulvérisation  
15 est possible. Ce procédé est donc essentiellement préventif et limité dans le temps.

On a décrit dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique délivré le 2 novembre 1999 à EDEN Bioscience sous le No. 5 977 060, un procédé de lutte contre les insectes sur des plantes. Dans ce brevet, on cite de  
20 nombreuses références concernant les éliciteurs pour des systèmes défensifs des plantes contre les insectes auxquelles on peut se reporter. Ce procédé est un procédé de lutte contre les insectes pour les plantes qui consiste à appliquer un éliciteur polypeptide ou protéine à une plante ou une graine dans des conditions efficaces pour lutter contre les  
25 insectes. L'éliciteur (polypeptide, ou protéine) causant la réponse hypersensible, correspond à celui obtenu à partir d'un agent pathogène choisis dans le groupe constitué par *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Phytophthora* et leurs mélanges. Dans un mode de réalisation l'éliciteur peut être appliqué aux plantes en appliquant une  
30 bactérie contenant des gènes capables de sécréter ou d'exporter le polypeptide ou la protéine. La bactérie ne provoque pas la maladie et a

été transformée (par exemple de manière recombinante) par des gènes encodant un polypeptide ou une protéine éliciteur de réponse hypersensible. Ce document décrit donc un procédé de lutte contre les insectes et non contre les agents pathogènes dans leur ensemble. Par ailleurs, ce document fait référence à des manipulations génétiques qui sont très mal perçues par le public.

On connaît par ailleurs des graines de fenugrec qui sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire comme épice et dans l'industrie pharmaceutique. Le fenugrec ou Trigonelle foenum graecum ou encore Sénégré est une légumineuse de la famille des papilionacées. Le fenugrec contient une huile essentielle constituée de 40 composés différents dont la 3-hydroxy-4,5-diméthyl-oxolane-2-one semble être le composant aromatique le plus important. Parmi les composants non volatils qu'il contient, on a identifié des furostanol glycosides et des stérol et des saponines stéroïdiques (ayant un intérêt potentiel pour l'industrie pharmaceutique).

On a décrit dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique délivré le 7 décembre 1999 à la société Emerald Seed Products Ltd. sous le No. 5 997 877, un procédé d'extraction de fractions valables commercialement de graines de fenugrec. Les graines de fenugrec contiennent un noyau central jaune, qui est le cotylédon et le germe entouré de l'endosperme blanc et semi-transparent et du tégument. Cet endosperme contient des gommes de galatomannane et est entouré d'une écorce brun foncé. Le procédé de récupération des gommes ou oléorésines consiste à humidifier les graines de fenugrec dans une plage de 14% à 20% d'humidité ; à broyer les graines de fenugrec ; à mélanger les graines broyées avec un solvant pendant une période de contact à une certaine température de manière que certains composants des graines soient absorbés par le solvant ; à séparer l'extrait du solvant. Ce procédé a pour inconvénient d'utiliser un solvant qui est un alcool polaire. Un autre procédé est décrit dans ce brevet U.S. No. 5 997 877 qui consiste à

5 récupérer les fibres solubles. A cet effet, on broie les graines, on les tamise et on récupère la partie lourde constituée du tégument et du mucilage (enveloppe). Cette partie lourde est ensuite traitée par de l'eau chaude., ce qui permet de récupérer les fibres solubles. Les gommés se trouvant dans la partie légère sont ensuite récupérés à, l'aide d'un solvant.

Des éléments de l'état de la technique connue tels que les brevets DE 197 266, EP 0 493 670 ou les références DATABASE n° 1994-84121, XP 002194376 ou Chiminal Abstract, volume 119, n° 11 (1993-9-13), 10 KRASTA, font tous référence à l'utilisation de la trigonéline seule, la molécule ayant été isolée et purifiée avec des produits solvants susceptibles d'être toxiques.

#### Résumé de l'invention

15 La présente invention a pour objet de lutter contre des agents pathogènes et toutes sortes de parasites de plantes (champignons, virus, bactéries, insectes...etc...) à l'aide d'un nouveau produit éliciteur, ce dernier permettant une action préventive et également curative.

La présente invention concerne en outre un nouvel éliciteur qui peut comporter plusieurs molécules éliciteur.

20 Encore un autre objet de la présente invention est de fournir un procédé de préparation d'un nouvel éliciteur, ce procédé étant non agressif vis-à-vis de l'environnement.

25 Les inventeurs de la présente demande ont découvert après des essais en laboratoire, que des extraits issus de fenugrec avaient la propriété de stimuler fortement différentes activités enzymatiques impliquées dans les mécanismes de défense des végétaux contre les agents pathogènes et toutes sortes de parasites de plantes (champignon, bactéries, virus, insectes...et...).

30 La présente invention concerne donc un procédé utilisant comme éliciteur une ou plusieurs molécules provenant d'extraits de graine de *Trigonella foenum graecum*, ces molécules n'ayant subi aucun processus



purification et d'isolation et aucun traitement par des solvants, ce qui peut induire des effets toxiques pour les plantes à traiter.

A cet effet, le procédé selon l'invention de lutte contre les agents pathogènes de plantes agronomiquement utiles avec utilisation d'un produit éliciteur se caractérise essentiellement en ce que le produit éliciteur comprend une molécule éliciteur provenant d'extraits de graines de *Trigonella foenum graecum*

Le procédé selon l'invention est en outre caractérisé en ce que l'application est effectuée aux stades végétatifs précoces et/ou aux stades végétatifs adultes.

Une autre caractéristique du procédé selon l'invention est que l'application est réalisée aussi souvent que nécessaire avec par exemple une fréquence d'application de 10 jours ou 15 jours comme c'est réalisé couramment en agriculture. Les plantes supportent la répétition des traitements par l'éliciteur et les mécanismes de défense de la plante sont stimulés à chaque traitement.

L'extrait de graines de *Trigonella foenum graecum* est obtenu par un procédé consistant à broyer les graines, à séparer la fraction cotylédon et germe, de la fraction tégument et mucilage, à mélanger la fraction cotylédon et germe avec de l'eau, et à effectuer l'extraction des composants de l'éliciteur actif avec de l'eau à une température modérée, sous agitation.

L'extraction est effectuée de préférence dans une composition contenant 10% en poids de fraction cotylédon et germe et 90% en poids d'eau. La température d'extraction est de préférence dans la plage de la température ambiante (environ 25°C) à environ 100°C.

Les essais effectués ont démontré que le produit éliciteur devrait comporter au moins deux molécules éliciteur de taille différente. Il a été constaté qu'une seule molécule de taille supérieure à 30.000 Dalton ou de taille inférieure à 30.000 Dalton avait des effets très réduits et que l'association des deux molécules dont une supérieure à 30.000

Dalton et une inférieure à cette dimension donnait des résultats très intéressants.

La présente invention sera maintenant décrite plus en détail à l'aide des exemples suivants, qui ne sont en aucun cas destinés à limiter le cadre de la présente invention.

### Exemples

#### Exemple 1 – Procédé d'extraction du nouvel éliciteur

On utilise des graines de fenugrec qui sont broyées de façon à obtenir une poudre. On sépare la fraction de cotylédon et de germe de la fraction tégument et mucilage par un procédé de densitométrie. On mélange 100 grammes de la fraction cotylédon et germe avec 1000 ml d'eau, et on effectue l'extraction à une température comprise entre la température ambiante et 100°C, en agitant lentement. On filtre ensuite le produit avec un filtre ayant des pores ayant une dimension entre de préférence 2 µm et 500 µm.

Après ces phases de séparation mécanique de la fraction cotylédon et germe et de traitement aqueux avec filtration, il est apparu intéressant d'introduire une phase de déshydratation par tout procédé et moyens connus (atomisation, lyophilisation, ou évaporation par exemple) qui aura pour effet d'éviter que le produit initialement humide ne se dégrade ou d'éviter le recours à des produits stabilisateurs ou conservateurs.

#### Exemple 2 – Traitement de plantes maraîchères et ornementales par l'extrait de fenugrec

On pulvérise l'extrait préparé dans l'exemple 1 ci-dessus sur les plantes suivantes, et on teste la résistance de différentes plantes à différents parasites. A titre d'exemple, on a obtenu des effets très significatifs lors de traitements préventifs et curatifs sur : melon / oïdium ; melon / bactériose ; melon / Thrips ; melon / aleurodes ; vigne / oïdium ; vigne / mildiou...etc...

- On compare ces plantes traitées avec des plantes non traitées. Dans le cas de traitement préventifs, les plants traités sont peu ou pas attaqués par les parasites (contrairement aux plants non traités), à condition de renouveler le traitement régulièrement. Dans le cas de
- 5 traitement curatifs, les plantes traitées voient les symptômes des infections diminuer au bout de quelques jours dès le premier traitement avec l'extrait de fenugrec. Le traitement peut avoir lieu sur jeunes plantes, sur boutures, ou sur plantes adultes, en fait quelque soit le stade végétatif des plantes.
- 10 Il a été également constaté un effet anti-insecte du traitement selon l'invention.

**Revendications :**

1. Procédé de lutte contre les agents pathogènes des plantes agronomiquement utiles avec utilisation d'un produit éliciteur caractérisé en ce que le produit éliciteur comprend au moins deux molécules éliciteur provenant d'extraits de graines de *Trigonella foenum graecum*.
2. Procédé de lutte selon la revendication 1 contre les agents pathogènes des plantes agronomiquement utiles avec utilisation d'un produit éliciteur caractérisé en ce que le produit éliciteur comprend au moins deux molécules éliciteur provenant d'extraits de graines de *Trigonella foenum graecum* obtenues par extraction à l'eau et filtration.
3. Procédé selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'application est effectuée aux stades végétatifs précoces et/ou aux stades végétatifs adultes.
4. Procédé selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'extrait éliciteur a un effet de lutte contre les agents pathogènes et toutes sortes de parasites des plantes lorsqu'il est utilisé préventivement à l'infection par les plantes, et de façon curative.
5. Procédé selon les revendications 1, 2, 3 et 4 caractérisé en ce que l'application est effectuée à des intervalles de temps répétés, aussi souvent que nécessaire, par exemple tous les 10 jours ou 15 jours. Les plantes supportent la répétition des traitements par l'éliciteur et les mécanismes de défense sont stimulés à chaque traitement.
6. Nouvel éliciteur pour la mise en œuvre du procédé selon les revendications 2, 3, 4 et 5 caractérisé en ce qu'il comprend au moins une molécule éliciteur provenant d'extraits de graines de *Trigonella foenum graecum*.

10

7. Nouvel éliciteur selon la revendication 6 caractérisé en ce qu'il est constitué d'un extrait de graines de *Trigonella foenum graecum* comprenant au moins deux  
5 molécules éliciteur dont une supérieure à 30.000 Dalton et l'autre inférieure à 30.000 Dalton.

8. Procédé de préparation du nouvel éliciteur selon la revendication 7, consistant à broyer les graines, à séparer la fraction cotylédon et germe, de la fraction  
10 tégument et mucilage, à mélanger la fraction cotylédon et germe avec de l'eau, et à effectuer l'extraction des composants de l'éliciteur actif avec de l'eau à une température modérée, sous agitation.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'extraction est  
15 effectuée de préférence dans une composition contenant 10% en poids de fraction cotylédon et endosperme et 90% en poids d'eau. La température d'extraction est de préférence dans la plage de la température ambiante (environ 25°C) à environ 100°C.

20 10. Procédé selon les revendications 8 caractérisé en ce que après la phase de séparation de la fraction cotylédon et germe, son traitement aqueux et l'extraction, le produit éliciteur est déshydraté.