

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIÉTÉ (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 34925 B1**
(43) Date de publication : **01.02.2014**
(51) Cl. internationale : **A01N 27/00; A01N 25/30;
A01N 65/30; A01N 65/20;
A01P 1/00; A01P 3/00;
A01P 21/00**

(21) N° Dépôt : **36207**
(22) Date de Dépôt : **27.08.2013**
(30) Données de Priorité : **02.02.2011 US 61/438,796**
(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/US2012/023571 02.02.2012**
(71) Demandeur(s) : **MARRONE BIO INNOVATIONS, INC, 2121 SECOND STREET, SUITE 107 DAVIS CA 95618 (US)**
(72) Inventeur(s) : **SU, Hai ; NAMNATH, James**
(74) Mandataire : **ABU-GHAZALEH INTELLECTUAL PROPERTY (TMP AGENTS)**

(54) Titre : **FORMULATIONS DE LIGNINE/PREPARATIONS CONTENANT DE L'ANTHRAQUINONE**

(57) Abrégé : La présente invention concerne une formulation comprenant (a) une préparation comprenant un ou plusieurs dérivés d'anthraquinone ayant une activité contre des phytovirus et (b) une lignine. L'invention concerne également un procédé d'obtention de la formulation et d'utilisation de la formulation pour moduler une infection phytopathogène, fongique et/ou bactérienne et/ou une infestation de phytovirus et/ou la germination de graines et/ou la croissance végétale.

ABRÉGÉ

La présente invention concerne une formulation comprenant (a) une préparation contenant un ou plusieurs dérivés d'antraquinone ayant une activité contre des phytoravageurs (b) une lignine. L'invention concerne également un procédé permettant d'obtenir une

5 formulation et permettant l'utilisation de la formulation pour moduler une infection phytopathogénique, fongique et/ou bactérienne et/ou une infestation de phytoravageurs et/ou permettant la germination d'une graine et/ou permettant la modulation de la croissance de la plante.

MOI-42020-PCT

01/01/2014

**FORMULATIONS DE LIGNINE/PRÉPARATIONS CONTENANT DE
L'ANTHRAQUINONE**

5

DOMAINE TECHNIQUE

L'invention concerne des formulations, particulièrement, des préparations de plantes contenant des dérivés de l'antraquinone et de la lignine.

10 **HISTORIQUE**

Le développement d'un autre moyen de lutte contre les maladies végétales devient urgent étant donné la propagation rapide de la résistance des populations de phytopathogènes aux fongicides synthétiques et la prise de conscience quant à la pollution environnementale générée par l'activité humaine. Le moyen le plus efficace est de renforcer les mécanismes de
15 défense de la plante par une résistance végétale induite (van Loon et al., 1998) et/ou une résistance systémique acquise (Durant et al., 2004).

La résistance induite est un état de capacité défensive améliorée développée par une plante lorsqu'elle est convenablement stimulée (Kuc et al., 2000). Une résistance végétale induite peut être déclenchée par des produits chimiques, des non pathogènes, des formes
20 avirulentes de pathogènes.

Extrait de *Reynoutria sachalinensis*

Des extraits de la renouée géante (*Reynoutria sachalinensis*) vendus sous le nom de Milsana® et de Regalia® par Marrone Bio Innovations, Inc. permettent de lutter contre l'oïdium
25 et d'autres maladies végétales de cucurbitacées et d'autres cultures, principalement en induisant une accumulation de composés phénoliques fongitoxiques dans la plante (Daayf et al., 1995; Wurms et al. 1999; Schmitt, 2002). Des extraits de renouée géante préparés ont démontré une grande efficacité dans l'induction de la résistance dans diverses cultures et phytopathogènes comprenant l'oïdium du blé (Vèchet et al., 2009). Mis à part le mode d'action ISR, il a
30 récemment été démontré que l'extrait de *R. sachalinensis* possède un effet fongistatique directe contre l'oïdium du blé (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*; Randoux et al., 2008). Il a été démontré que ces extraits contiennent divers dérivés de l'antraquinone telle que le physcion et l'émodine.

La lignine

La lignine est le principal constituant de la structure ligneuse des plantes supérieures. La lignine traitée est obtenue sous forme d'un sous-produit des réactions de dépulpage du bois. Les produits de la lignine comprennent, par exemple, les sulfonates de lignine, les lignines alcalines et les oxygénines qui peuvent être obtenus à partir des liquides usés sulfite, sulfate et
5 alcalin (Snook, 1982, Handbook for Pulp & Paper Technologists, TAPPI, Atlanta).

Il a été démontré que la lignine possède une variété d'utilisations commerciales. Par exemple, la lignine soluble dans les alcalis a été utilisée comme agent dispersant. Le brevet américain no. 3 726 850 divulgue l'utilisation d'un produit de lignine soluble dans les alcalis, et traité à l'ozone, qui ne contient presque pas de soufre lié de façon organique, comme agent
10 dispersant pour les argiles, les colorants, les pesticides, le noir de charbon et d'autres produits. Le brevet américain no. 4 666 522 divulgue l'utilisation de produits lignosulfonates dans la préparation des émulsions de cires, d'huiles, de graisses, d'asphalte, et des mélanges de ceux-ci. Il a été rapporté que l'acétate de lignine est utile pour des applications pour agir comme liant dans les compositions d'encres d'imprimeries à base d'eau. (Voir, par exemple, le brevet
15 américain No. 4 612 051). Le brevet américain no. 5 668 183 divulguent l'utilisation des produits de sulfonate de lignine pour la dispersion des substances solubles dans la graisse. En outre il existe des divulgations de liaison de complexes lignine-pesticides (voir, par exemple, le brevet américain no. 3 813 236, le brevet américain no. 3 929 453, de nouveaux émis sous Re. no. 29 238, le brevet américain no. 4 381 194, la publication de la demande de brevet américain
20 no. 20110015237, la publication de la demande de brevet américain no. 2010136132, la publication de la demande de brevet américain no. 20100278890, la publication de la demande de brevet américain no. 20080113920, la publication de la demande de brevet américain no. 2006247130, le brevet américain no. 7 867 507, WO2003/005816, le brevet américain no. 5 994 266).

25

RÉSUMÉ DE LA DIVULGATION

La présente invention concerne une formulation comprenant (a) une préparation contenant un ou plusieurs dérivés d'anthraquinone ayant une activité contre des phytoravageurs (b) une lignine. La formulation peut être une formulation sèche ou aqueuse. En particulier, la
30 préparation peut être un extrait de *Reynoutria* et la lignine peut être un sulfonate de lignine, particulièrement un sel de sulfonate de lignine.

L'invention concerne également un procédé permettant d'obtenir la formulation comprenant : le mélange (a) d'une préparation comprenant un ou plusieurs dérivés d'anthraquinone ayant une activité contre les phytoravageurs (b) une lignine, en particulier
35 obtenue sous forme d'une formulation sèche. Le procédé peut également comprendre le

mélange de la formulation sèche dans de l'eau.

L'invention concerne également un procédé permettant l'utilisation de ces formulations pour (1) moduler les infections phytopathogéniques, fongiques et/ou bactérienne et/ou une infestation de phytoravageurs et/ou (2) pour moduler la germination des graines et/ou (3) pour
5 moduler la croissance la croissance de ladite plante. Un agent d'enrobage des graines peut également éventuellement être inclus.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE LA DIVULGATION

Lorsqu'une fourchette de valeurs est donnée, il est entendu que chaque valeur qui
10 intervient, au 10e de l'unité de la limite inférieure, sauf si le contexte indique clairement le contraire, entre la limite supérieure et inférieure de cette fourchette et de tout autre valeur indiquée ou qui intervient dans cette fourchette indiquée, est comprise dans cette invention. Les limites supérieures et inférieures de ces plus petites fourchettes peuvent être comprises de façon indépendante dans les fourchettes plus petites qui sont comprises dans cette invention, sujet à
15 toute limite spécifiquement exclue dans cette fourchette indiquée. Lorsque la fourchette indiquée comprend l'une ou les deux limites, les fourchettes qui excluent ces deux limites incluses sont également comprises dans cette invention.

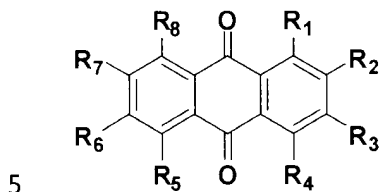
Sauf en cas de définition contraire, tous les termes techniques et scientifiques utilisés ici ont la même signification que ce qui est généralement compris par un homme de métier auquel
20 cette invention est destinée. Même si des méthodes et des produits similaires ou équivalents à ceux décrits ici peuvent être utilisés pour tester la présente invention, les produits et méthodes préférés sont décrits ici.

Il doit être noté que, comme il est décrit dans la spécification et dans les revendications annexées, les formes singulières « un », « une », « et » et « le/la » comprennent les référents
25 pluriels sauf si le contexte indique clairement le contraire. Par exemple, « un champignon » comprend « les champignons ».

Tel qu'il est défini ici, le terme « moduler » est utilisé pour décrire la modification de l'étendue de l'infection phytopathogène, bactérienne ou fongique, l'infestation des phytoravageurs ou la vitesse de propagation de l'infection phytopathogène, bactérienne ou
30 fongique ou de l'infestation par des phytoravageurs. Le terme « moduler » est également utilisé pour décrire la modification de l'étendue de la croissance et préférentiellement l'augmentation de l'étendue ou de la vitesse de la croissance ou de la germination d'une graine d'une plante.

Dérivés de l'antraquinone

Les dérivés de l'antraquinone comprennent sans limitation, le physcion, l'émodyne, le chrysophanol, le ventiloquinone, le glycoside d'émodyne, le glycoside de chrysophanol, le glycoside de physcion, le 3, 4-dihydroxy-1-méthoxy anthraquinone-2-carboxaldéhyde, le damnacanthal. Ces dérivés ont une structure similaire, qui est la suivante :



Dans laquelle R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 et R8 sont un atome d'hydrogène, l'hydroxyle, l'hydroxylalkyle, un halogène, le carboxyle, l'alkyle, l'alcoyoxyle, l'alcényle, l'alcényloxyle, l'alcynyle, l'alcynyloxyle, l'hétérocyclyle, un groupement aromatique ou aryle, des sucres tels que le glucose.

10 Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne les dérivés de l'antraquinone qui sont contenus dans les extraits obtenus à partir de familles végétales comprenant, sans limitation, les polygonacées, rhamnacées, fabacées, asphodelacées et rubiacées. Ces composés peuvent être isolés ou obtenus à partir d'une quelconque partie des plantes telles que les feuilles, le tronc, l'écorce, les racines et les fruits. Les matériaux végétaux
15 peuvent être humides ou secs, mais de préférence, des matériaux secs. Pour être répertoriés dans la liste des biopesticides biochimiques organiques, les solvants et les procédés qui sont utilisés dans l'extraction et la purification doivent satisfaire aux exigences du *National Organic Program* (NOP) (www.ams.usda.gov/AMSV1.0/nop).

Dans un mode de réalisation plus spécifique, l'extrait végétal est dérivé d'un membre de
20 la famille des polygonacées. Tel qu'il est défini ici, le terme « obtenu de » veut dire que le produit est isolé ou obtenu directement d'une source particulière ou qui possède par ailleurs des caractéristiques d'identification d'une substance ou d'un organisme isolé ou obtenu d'une source donnée. Dans un mode de réalisation particulier, l'extrait dans une telle combinaison contient au moins un dérivé de l'antraquinone tel que le physcion et éventuellement l'émodyne. Les
25 membres de la famille des polygonacées comprennent, sans limitation, *Acetosella*, *Antigonon*, *Aristocapsa*, *Bilderdykia*, *Brunnichia*, *Centrostegia*, *Chorizanthe*, *Coccoloba*, *Coccolobis*, *Coccolobo*, *Corculum*, *Dedeckera*, *Delopyrum*, *Dentoceras*, *Dodecahema*, *Emex*, *Eriogonum*, *Fafopyrum*, *Fagopyrum*, *Fallopia*, *Gilmania*, *Goodmania*, *Harfordia*, *Hollisteria*, *Koenigia*, *Lastarriaea*, *Mucronea*, *Muehlenbeckia*, *Nemacaulis*, *Oxyria*, *Oxytheca*, *Perscarioa*,
30 *Persicaria*, *Pleuropterus*, *Podopterus*, *Polygonella*, *Polygonum*, *Pterostegia*, *Rheum*, *Rumex*, *Ruprechtia*, *Stenogonum*, *Systemotheca*, *Thysanella*, *Tovara*, *Tracaulon*, *Triplaris* et dans un mode de réalisation encore plus spécifique, l'extrait peut être obtenu à partir d'une espèce de

Reynoutria (également appelé Fallopi) sp. ou de *Rheum*. Dans un mode de réalisation encore plus spécifique, l'extrait est obtenu de *Reynoutria sachalinensis*.

Les dérivés de l'antraquinone peuvent être extraits de matériaux végétaux par un quelconque solvant organique ou inorganique, l'utilisation de certains d'entre eux étant autorisée
5 par le *National Organic Programs* (www.ams.usda.gov/AMSv1.0/nop).

Par exemple, ces matériaux peuvent être moulus et ensuite extraits avec une solution basique, et ensuite acidifiés avec une solution acide et finalement extrait avec des solvants organiques tels que l'acétate d'éthyle, le butanol ; ou les matériaux moulus peuvent être extraits
10 directement avec des solvants organiques tels que l'éthanol ou l'acétate d'éthyle ; ou par une quelconque méthode et leur combinaison permettant d'extraire les dérivés de l'antraquinone à partir des matériaux végétaux. La solution d'extraction et ensuite concentrée ou séchée sous vide à une température convenable telle que 20 à 100 °C, de préférence de 30 à 70 °C.

La lignine

15 Le terme « lignine » tel qu'il est utilisé ici décrit un composé polymère complexe qu'on retrouve dans les plantes ligneuses, les arbres et les cultures agricoles. Les lignines sont généralement produites comme un coproduit de l'industrie du papier, qui est séparé des arbres par un procédé de dépulpage chimique. Cependant, toutes sources végétales (par exemple, la lignine des feuillus, la lignine des conifères, la lignine de paille et la lignine de bambou), les
20 fruits à coquille (par exemple, la coquille de la noix de pecan, la coquille de noix, la coquille d'arachide, etc. sous forme de poudre fine), les graines (par exemple, la coque de la graine de coton sous forme d'une poudre fine), et ainsi de suite peuvent être utilisées afin d'obtenir des lignines convenables pour une utilisation dans des compositions et méthodes révélées ici.

Des exemples des lignines qui peuvent être obtenues à partir des végétaux, arbres et/ou
25 cultures agricoles comprennent, sans limitation, les lignines alcalines telles que les lignines de Kraft (sulfate de lignine), les sels sodiques ou potassiques des lignines, ou la soude de lignines ; les sulfonates de lignine (sulfite de lignine) ; les oxygignines ; les chlorolignines ; les protolignines ; les liqueurs de lignine obtenus directement du procédé de dépulpage ; des sels de ceux-ci sous forme liquide ou solide ; des dérivés de ceux-ci ; et des combinaisons de ceux-ci.
30 Les lignines peuvent être obtenues à partir du procédé de dépulpage de Kraft et sont généralement insolubles dans l'eau. Les sels sodiques ou potassiques des lignines sont généralement solubles dans l'eau et peuvent même être sous forme liquide.

Dans un mode de réalisation préférée, la lignine est utilisée sous forme de sulfonate de lignine et peut également être appelée la lignosulfonate, les lignosulfonates, les
35 lignosulphonates, la lignosulfate, l'acide ligninsulfonique, l'acide lignosulfonique, l'acide

lignosulphurique ou LST 7. Les sulfonate des lignines doivent être considérés comme étant des polymères anioniques solubles à l'eau qui peuvent être formée en tant que sous-produit du procédé de dépulpage au sulfite. Les sulfonates de lignine ont généralement une large distribution de poids moléculaire, généralement d'environ 500 à environ 150.000. Les sulfonates de lignine peuvent contenir différentes ions métalliques ou d'ammonium comme des contre-cations des groupements sulfonates, par ex. le cuivre, le zinc, le calcium, le sodium, le potassium, le magnésium, l'aluminium, et ainsi de suite. Dans un mode de réalisation spécifique, les sulfonates des lignines peuvent être des syndiqués obtenus par récupération de l'extraction calcique de la lignine

10 Formulations

Les formulations peuvent être sous forme solide ou liquide. La préparation contenant des dérivés d'antraquinone peut être un extrait dérivé de, par exemple, *Reynoutria sachalinensis* et peut être sous la forme d'un concentré émulsifiable (EC), d'une concentration de suspension (SC), d'une microémulsion (ME), d'une nanoémulsion (NE), d'un liquide soluble (LS), d'une émulsion dans l'eau (EW), de prêt-à-l'emploi (RTU) et de formulations microencapsulées ou nano-encapsulées. Les formulations en poudre et en granules comprennent, sans limitation, une poudre soluble dans l'eau (WSP), les granules dispersibles dans l'eau (WDG) et les comprimés dispersibles dans l'eau (WGT). La lignine peut être, dans un mode de réalisation préféré, un sel de sulfonate de lignine sous la forme d'une poudre soluble dans l'eau ou sous forme liquide.

Dans un mode de réalisation spécifique, le pourcentage de concentration de la préparation contenant les dérivés de l'antraquinone dans les formulations décrites ici suit une fourchette entre 0,01 à 95 % (v/v). La concentration est de préférence entre environ 0,01 % à environ 10 % (v/v) et mieux encore entre environ 0,5% à environ 1% v/v. Le pourcentage de concentration de la formulation de lignine décrite ici est dans une fourchette de 10 % à environ 40 % v/v.

Dans un mode de réalisation spécifique, le rapport de (a) la préparation contenant un ou plusieurs dérivés d'antraquinone ayant une activité contre les phytoravageurs par rapport (b) à la lignine est entre environ 1:10 à environ 10:1 par poids. Dans encore un mode de réalisation spécifique, le rapport de (a) la préparation contenant un ou plusieurs dérivés d'antraquinone ayant une activité contre les phytoravageurs (b) par rapport la lignine est entre environ 1:1 à environ 1:4 par poids. En particulier, une formulation liquide contient un rapport de 1:4 de (a) la préparation comprenant un ou plusieurs d'antraquinone ayant une activité contre les phytoravageurs (b) par rapport à la lignine. Par ailleurs, une formulation liquide contient un

rapport de 1:1 de (a) la préparation comprenant un ou plusieurs d'anthraquinone ayant une activité contre les phytoravageurs par rapport (b) à la lignine.

La formulation peut être une formulation aqueuse. La formulation peut être diluée entre environ 100 à environ 2500 fois. Dans un mode de réalisation spécifique, la formulation peut être diluée entre environ 100 à environ 200 fois.

La formulation peut également comprendre un agent antimicrobien, tel quel le benzoate de sodium, un sorbate ou un parabène dans une fourchette d'environ 0,1 à 5% par volume.

La méthode préférée de l'application de la formulation est une application foliaire (pulvérisation, atomisation, poudrage, diffusion ou le versage) avec ou sans support. Le nombre d'applications et le taux d'application dépend sur le risque d'infestation par un pathogène, généralement en un intervalle de 7 à 14 jours. La formulation peut également être appliquée aux graines en imprégnant les graines avec une formulation liquide contenant l'ingrédient actif ou en les enrobant avec une formulation solide. Dans d'autres cas, d'autres types d'application sont également possibles. Celles-ci comprennent par arrosage, application par irrigation goutte-à-goutte ou traitement sélectif des graines, ou des troncs des plantes, ou les bourgeons ou les fruits.

Agent d'enrobage des graines

Les formulations décrites ci-dessus peuvent également être utilisées en association avec des agents d'enrobage de graines. De tels agents d'enrobage de graines comprennent, sans limitation, l'éthylène glycol, le polyéthylène glycol, le chitosane, le carboxyméthyle chitosane, la mousse de tourbe, les résines et les cires ou les fongicides chimiques ou bactéricides avec soit un mode d'actif à site unique ou à multi-site ou inconnu.

Agents favorisant la croissance des végétaux

Les formulations décrites ci-dessus peuvent être utilisées en association avec d'autres agents favorisant la croissance tels que les fertilisants synthétiques ou organiques (par ex., di-ammonium phosphate soit sous forme liquide ou granulaire), les purins de compostes, des extraits d'algues, les hormones de croissance végétale telles que l'IAA (acide acétique indole) utilisées dans le traitement avec des hormones favorisant le développement des racines pour les transplantations seul ou en combinaison avec des régulateurs de la croissance végétale tels que l'IBA (acide acétique indole) et la NAA (acide acétique naphthalène), et, des microbes favorisant la croissance, tel que le Bacillus spp., Pseudomonas, Rhizobia, Trichoderma.

Agents anti-phytopathogéniques

Les formulations décrites ci-dessus peuvent également être utilisées en combinaison avec des agents anti-phytopathogénique, tels que les extraits végétaux, les biopesticides, les protecteurs de cultures inorganiques (tels que le cuivre), les agents tensio-actifs (tels que les rhamnolipides ; Gandhi et al., 2007) ou les huiles naturelles telles que l'huile de paraffine et l'huile de Méléaleuca à feuilles alternes possédant des propriétés pesticides ou des fongicides chimiques ou bactéricides avec soit un mode d'actif à site unique ou à multi-site ou inconnu. Tel que défini ici, le terme « agent anti-phytopathogénique » est un agent qui module la croissance d'un pathogène végétal, particulièrement un pathogène causant des maladies transmises par le sol aux plantes ou qui par ailleurs empêche la plante d'être infecté par un phytopathogène. Un phytopathogène comprend, sans limitation, un champignon, une bactérie, un actinomycète ou un virus.

Comme indiqué ci-dessus, l'agent anti-phytopathogène peut être un agent anti-fongique à site unique, n'étant pas limité au benzimidazole, à un inhibiteur de déméthylation (DMI) (par ex., l'imidazole, la pipérazine, la pyrimidine, le triazole), la morpholine, l'hydroxypyrimidine, l'anilinopyrimidine, le phosphorothiolate, l'inhibiteur externe de la quinone, la quinoline, le dicarboximide, le carboximide, le phénylamide, l'anilinopyrimidine, le phénylpyrrole, un hydrocarbure aromatique, l'acide cinnamique, l'hydroxyanilide, un antibiotique, la polyoxine, l'acylamine, le phthalimide, le benzenoïd (xylylalanine). Dans un mode de réalisation plus spécifique, l'agent antifongique et un inhibiteur de déméthylation choisit dans le groupe composé de l'imidazole, la pipérazine, la pyrimidine et le triazole (par ex., bitertanol, myclobutanil, penconazole, propiconazole, triadimefon, bromuconazole, cyproconazole, diniconazole, fenbuconazole, hexaconazole, tebuconazole, tetraconazole). Dans un mode de réalisation encore plus spécifique, l'agent antifongique et le myclobutanil. Dans encore un autre mode de réalisation, l'agent antifongique est l'inhibiteur externe de la quinone (par ex., strobilurine). La strobilurine peut comprendre sans limitation l'azoxystrobine, le krésoxim-méthyle ou la trifloxystrobine. Dans encore un autre mode de réalisation spécifique, l'agent antifongique et une quinone, par ex., le quinoxyfène (5,7-dichloro-4-quinolyl 4-fluorophenyle éther).

Dans encore un autre mode de réalisation, le fongicide est un fongicide chimique à multi-sites et inorganique, choisis dans le groupe composé de chloronitrile, quinoxaline, sulphamide, phosphonate, phosphite, dithiocarbamate, chloralkythios, phénylpyridine-amine, cyano-acétamide oxime.

Dans encore un autre mode de réalisation, l'agent anti-phytopathogénique peut être la streptomycine, la tétracycline, l'oxytétracycline, le cuivre, la kasugamycine.

EXEMPLES

Les exemples suivants représentent d'autres illustrations de la présente invention. Les composants et les ingrédients spécifiques sont présentés comme étant typiques, et diverses modifications peuvent être apportées à la lumière de la description précédente dans la portée de l'invention.

Lesdites compositions décrites ici préviennent une infection bactérienne ou fongique des végétaux de façon plus efficace que les compositions de renouée qui n'utilisent pas le sulfonate de lignine.

10 Exemple I : Préparation de la formulation

Cet exemple illustre la préparation d'un concentré liquide d'une solution de pulvérisateur fongicide. Un mélange des ingrédients suivants est préparé : Cinq parties d'un extrait d'éthanol de renouée séché sont combinées avec 20 parties de sulfonate de lignine sodique séché et mélangées dans un cylindre mélangeur inversé pour une période ne dépassant pas cinq minutes. Le mélange séché sec est combiné avec 75 parties de l'eau désionisée sous agitation lente jusqu'à ce qu'il devienne uniforme.

Exemple II : L'efficacité de la formulation de poudre soluble dans l'eau (WSP) dans la lutte contre l'oïdium du concombre

La variété de concombre « SMR 58 » a été cultivé sous serre jusqu'au stade de l'apparition d'une ou de deux vraies feuilles et qu'il soit prêt à être utilisé dans le test. On a réalisé quatre répliques par traitement et dans chaque traitement pour chaque plante a été de pulvérisé 3 ml. Après séchage des plantes, elles ont été inoculées avec une suspension de conidie de *Sphaerotheca fuliginea* à $3,5 \times 10^5$ spores/ml. 2 ml de suspension de conidie ont été pulvérisés par plante. Les traitements ont été agencés dans un modèle de blocs complets aléatoires et les plantes traitées ont été incubées à 25-30 °C sous serre. La gravité de la maladie a été évaluée sept jours après l'inoculation. Les données ont été analysées par ANOVA et les moyennes ont été séparées par le test Tukey à un seuil de $p=0,05$. Les résultats sont illustrés dans le Tableau I.

30

Tableau I

Traitement	Gravité (% Moyenne)	Écart -type	Groupage de Tukey	% Contrôle
Contrôle composé de l'eau	100,0	0,0	a	0,0
Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine WSP 1:100	0,3	0,6	c	99,7
Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine WSP 1:200	0,3	0,6	c	99,7
Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine WSP 1:1500	38,3	49,3	bc	61,7
Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine WSP 1:3000	62,5	31,8	ab	37,5
Blanc composé de lignine 1:100	100	0,0	a	0,0
p=0,0003				

La préparation de *Reynoutria sachalinensis* avec la lignine nouvellement formulée démontre une efficacité significative en comparaison avec le contrôle composé d'eau (p=0,0003) dans la lutte contre l'oïdium du concombre, alors que la formulation « blanc » n'a démontré aucune efficacité. La préparation de lignine contenait 1 % de benzoate de sodium (agent antimicrobien).

10 **Exemple III. Comparaison de l'efficacité de la nouvelle formulation WSP extrait de *Reynoutria sachalinensis* + lignine et l'extrait de *Reynoutria sachalinensis* à 5 % ME (microémulsion) dans la lutte contre l'oïdium du concombre.**

Les plantes ont été cultivées selon la description précédente. On a réalisé quatre répliques par traitement et dans chaque traitement chaque plante a été pulvérisée avec 3 ml de formulation. Après séchage des plantes, elles ont été inoculées avec une suspension de conidie à $2,3 \times 10^5$ spores/ml. La suspension de conidie a été pulvérisée à 2 ml par plante et incubée à 25 à 30 °C sous serre.

La gravité de la maladie a été évaluée 8 jours après l'inoculation. Les données ont été analysées par ANOVA et les moyennes ont été séparées par le test Tukey à un seuil de p=0,05. Comme le démontre le Tableau II ci-dessus, cette formulation a démontré une meilleure efficacité que la formulation à 5 % ME actuelle :

Tableau II

No. de trt	Traitement	Gravité (% Moyenne)	É.T	Groupage de Tukey	% Contrôle
1	Contrôle composé de l'eau	100,0	0,0	a	0,0
2	Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine WSP 1:200	4,3	4,3	d	95,8
6	Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> à 5 % ME 1:200	2,0	2,0	d	98,0
3	Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine WSP 1:500	21,5	22,9	dc	78,5
7	Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> à 5 % ME 1:500	60,0	24,5	abc	40,0
4	Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine WSP 1:1500	41,3	13,1	bcd	58,8
8	Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> à 5 % ME 1:1500	83,8	26,3	ab	16,3
5	Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine WSP 1:2500	63,8	42,3	abc	36,3
9	Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> à 5 % ME 1:2500	91,25	8,5	a	8,8
p<0,0001					

Exemple IV. Efficacité des nouvelles formulations WSP de l'extrait de *Reynoutria sachalinensis* + lignine et les granules dispersibles dans l'eau (WDG) dans la lutte contre

5 l'oïdium de concombre

Cinq lots d'extraits de plantes provenant de différents lots d'extractions ont été utilisés pour la formulation d'une poudre soluble dans l'eau (WSP) et des granules dispersibles dans l'eau (WDG). Les plantes ont été cultivées selon la description précédente. On a réalisé 4 réplifications par traitement et dans chaque traitement chaque plante a été pulvérisée avec 3 ml du produit formulé. Après séchage des plantes, elles ont été inoculées avec une suspension de conidie à $2,9 \times 10^5$ spores/ml. La suspension de conidie a été pulvérisée à 2 ml par plante et incubée à 25 à 30 °C sous serre. La gravité de la maladie a été évaluée 10 jours après l'inoculation. Les données ont été analysées par ANOVA et les moyennes ont été séparées par le test Tukey à un seuil de $p=0,05$. Les résultats sont illustrés dans le Tableau III.

15

Tableau III

Traitement	Gravité (%)	Groupage de Tukey	% Contrôle
Contrôle composé de l'eau	100,0	a	0,0
Extrait WSP de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine, lot 90A 1,2 g/l	4,0	b	96,0
Extrait WSP de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine, lot 90B 1,2 g/l	3,3	b	96,7
Extrait WSP de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine, lot 90C 1,2 g/l	2,0	b	98,0
Extrait WSP de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine, lot 90D 1,2 g/l	1,0	b	99,0
Extrait WSP de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine, lot 90E 1,2 g/l	5,3	b	94,7
Extrait WSP de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine, lot 90F 1,2 g/l	2,0	b	98,0
Extrait WSP de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine, lot 90G 1,2 g/l	1,0	b	99,0
Extrait WSP de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine, lot 90H 1,2 g/l	0,8	b	99,2
Extrait WSP de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine, lot 90I 1,2 g/l	3,0	b	97,0
Extrait WSP de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine, lot 90J 1,2 g/l	5,3	b	94,7
p<0,0001			

L'extrait de *Reynoutria sachalinensis* nouvellement formulé avec la préparation de lignine sous forme de WSP et de WDG a démontré une efficacité significative en comparaison avec le
5 contrôle composé d'eau (p<0,0001) dans la lutte contre l'oïdium du concombre.

Exemple V. Efficacité la nouvelle formulation WSP à différentes concentrations de l'extrait de *Reynoutria sachalinensis* + lignine et le taux de marquage de la nouvelle formulation WDG dans la lutte contre l'oïdium du concombre.

10 Les trois concentrations de l'extrait de *Reynoutria sachalinensis* formulés sous forme de WSP ont été comparées à la présente formulation de l'extrait de *Reynoutria sachalinensis* à

20 % ME à la même concentration et le taux de marquage inférieur de l'extrait sous forme de WDG a également été évalué au niveau de leur efficacité dans la lutte contre l'oïdium de concombre. Les procédures de tests ont été décrites dans les Exemples II à IV. On a réalisé quatre réplifications par traitement et dans chaque traitement de 3 ml a été appliqué à chaque

5 plante. Après séchage des traitements, les plantes ont été inoculées avec une suspension de conidie de $3,6 \times 10^5$ spores/ml à 2 ml par plante. Les plantes inoculées ont été incubées à 25-30 °C sous serre. La gravité de la maladie a été évaluée 7 jours après l'inoculation. Les données ont été analysées telles que décrit dans les Exemples II à IV. Les résultats des tests sont illustrés dans le Tableau IV.

10 **Tableau IV**

Traitement	Gravité (%)	Groupage de Tukey	% Contrôle
Contrôle composé de l'eau	95,0	a	0,0
Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> à 20% ME 1:1600	42,5	bc	55,3
15 Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> à 20 % ME 1:3200	10,0	cd	89,5
Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> à 20% ME 1:6400	62,5	bc	34,2
Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine WSP 1:1600	0,0	d	100,0
Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine WSP 1:3200	2,0	d	97,9
20 Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine WSP 1:6400	57,5	bc	39,5
Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine WDG 1:800	0,0	d	100,0
p<0,0001			

L'extrait de *Reynoutria sachalinensis* formulée sous forme de WSP a démontré une meilleure efficacité ou une efficacité semblable avec moins de variation en comparaison avec le produit formulé actuel d'extrait de *Reynoutria sachalinensis* à 20 % ME. L'extrait formulé sous forme

25 de WDG présentait également une lutte contre la maladie significativement meilleure que le contrôle composé de l'eau.

Exemple VI. Efficacité des nouvelles formulations WSP et WDG de l'extrait de *Reynoutria sachalinensis* + lignine dans la lutte contre le *Phytophthora capsici* des plants de tomates

L'extrait de *Reynoutria sachalinensis* a été formulé sous forme de WSP et de WDG. L'efficacité des deux formulations a été évaluée lors de la lutte contre dépérissement foliaire Phytophthora chez la tomate. La variété « Roma » a été plantée sous serre jusqu'au stade d'apparition de 2 vraies feuilles. L'isolat de *P. capsici* a été cultivé sur un milieu de haricots de Lima (150 g de haricots de Lima ont été autoclavés dans 500 ml d'eau à 121 °C pendant 0,5 h et filtrés à travers de couches d'étamine afin d'éliminer les écorces des graines. 20 g d'agar ont été ajoutés au filtrat et le volume augmenté à 1000 ml. Le milieu a été autoclavé à 121 °C pendant 15 min) pendant 7 jours et les sporanges ont été lavés avec de l'eau stérile. La suspension de sporanges a été incubée à température ambiante (environ 25 °C) pendant 1-2 h pour libérer les zoospores. La concentration de la suspension a été ajustée à $1,0 \times 10^5$ spores/ml.

On a effectué trois réplifications uniques de plantes par traitement. Pour chaque traitement, 3 ml de traitement/plante ont été appliqués avec un pulvérisateur à main. Après séchage des traitements, ils ont été placés dans un récipient pour l'incubation, 10 ml de suspension de spores a été appliquée uniformément sur toutes les plantes. Le récipient a été fermé afin de maintenir un taux d'humidité élevé et les plantes ont été incubées à 25 °C dans l'obscurité pendant 3 jours. La maladie a été évaluée 7 jours après l'inoculation. Les résultats sont donnés dans le Tableau V. Tel que le montre le Tableau V, l'extrait de *Reynoutria sachalinensis* formulé avec la préparation de lignine démontre une efficacité semblable à la formulation ME actuelle à 20 % dans la lutte contre le dépérissement foliaire Phytophthora et a diminué la gravité de la maladie en comparaison au contrôle composé d'eau. De façon surprenante, il a été trouvé qu'un mélange d'extrait de plantes séchées provenant de *Reynoutria sachalinensis* et des extraits séchés de pulpe sulfonés (également appelés les sulfonates de lignine) forment une poudre physiquement et chimiquement stable et se mélange facilement, en plusieurs proportions, avec de l'eau pour donner une solution pulvérisable qui, lorsqu'elle est appliquée aux plantes en croissance, prévient l'infection aux champignons.

Tableau V (p=0,0485)

Traitement	Gravité (% , Moyenne)	Groupage de Tukey	% Contrôle
Contrôle composé de l'eau	56,7	a	0,0
Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> à 20 % ME 1:800	21,7	ab	61,7
Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine WSP 1:800	20,0	ab	64,7
Extrait de <i>Reynoutria sachalinensis</i> + lignine WDG 1:800	28,3	Ab	50,1

méfénoxam (Ridomil) 1,24g/l	2,3	b	95,9
-----------------------------	-----	---	------

Même si cette invention a été décrite par référence aux modifications spécifiques, les détails de ceux-ci ne doivent pas être interprétés comme étant limitant, étant donné qu'il est évident qu'on peut utiliser divers équivalents et changements, et diverses modifications tout en

5 restant dans le cadre de la présente invention.

Plusieurs références sont citées à travers toute cette spécification, chacune d'entre elles étant incorporée ici par référence dans son intégralité.

Literature Cited

- 5 Daayf, F., A. Schmitt, et al. (1995). "The effects of plant extracts of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long English cucumber." Plant Disease **79**: 577-580.
- Durrant, W. E. and X. Dong (2004). "Systemic acquired resistance." Annual Review of Phytopathology **42**: 185-209.
- 10 Kuc, J., (2000). Development and future direction of induced systemic resistance in plants, Crop Protection **19**: 859-861.
- Schmitt, A. (2002). "Induced responses by plant extracts from *Reynoutria sachalinensis*: a case study." Bull. IOBC/WPRS **25**: 83-89.
- 15 *van Loon, L.E., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, S C. M. J. (1998) "Systemic resistance induced by Rhizosphere bacteria", Annu. Rev. Phytopathol.* **36**:453–83.
- Věchet, L., L. Burketova, et al. (2009). "A comparative study of the efficiency of several sources of induced resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) in wheat under field conditions." Crop Protection **28**: 151-154.
- 20 Wurms, K., C. Labbe, et al. (1999). "Effects of Milsana and Benzothiadiazole on the ultrastructure of powdery mildew haustoria in cucumber." Phytopathology **89**: 728-736.
- 25

CE QUI EST REVENDIQUÉ :

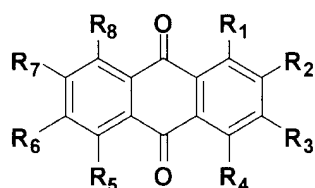
1. Formulation comprenant (a) une préparation contenant un ou plusieurs dérivés d'antraquinone ayant une activité contre des phytoravageurs et (b) une lignine.

5 2. Formulation selon la revendication 1, dans laquelle ladite préparation comprend un ou plusieurs dérivés d'antraquinone ayant une activité contre les phytoravageurs est un extrait dérivé de la famille des Polygonacées, Rhamnacées, Fabacées, Asphodelacées et Rubiacées.

3. Formulation selon la revendication 1, dans laquelle ladite préparation comprend un ou
10 plusieurs dérivés d'antraquinone ayant une activité contre les phytoravageurs est un extrait dérivé de *Reynoutria sachalinensis*.

4. Formulation selon la revendication 1, dans laquelle ledit dérivé d'antraquinone a la structure

15



dans laquelle R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 et R8 sont un atome d'hydrogène, l'hydroxyle, l'hydroxylalkyle, un halogène, le carboxyle, l'alkyle, l'alcoyoxyle, l'alcényle, l'alcényloxyle, l'alcynyle, l'alcynyloxyle, l'hétérocyclyle, un groupement aromatique ou aryle, ou des sucres.

20

5. Formulation selon la revendication 1, dans laquelle ledit dérivé d'antraquinone est choisi dans le groupe composé du phycion, de l'émodyne, du chrysophanol, du ventiloquinone, du glycoside d'émodyne, du glycoside de chrysophanol, du glycoside de phycion, du 3,4-dihydroxy-1-méthoxy anthraquinone-2-carboxaldéhyde et du damnacanthal.

25

6. Formulation selon la revendication 1, dans laquelle ladite lignine est une lignine alcaline, un lignosulphonate, une oxygignine ; une chlorolignine ; une protolignine ; une liqueur de lignine ou des sels ou des dérivés de ceux-ci.

30 7. Formulation selon la revendication 1, dans laquelle ladite lignine est un lignosulphonate ou un sel de celui-ci.

8. Formulation selon la revendication 7, dans laquelle ledit lignosulphonate est un sel de sodium, de potassium, de lithium, de calcium, de magnésium ou d'ammonium du lignosulphonate.
- 5 9. Formulation selon la revendication 1, dans laquelle le rapport de (a) la préparation contenant un ou plusieurs dérivés d'anthraquinone ayant une activité contre les phytoravageurs par rapport (b) à la lignine est entre environ 1:10 à environ 10:1 par poids.
- 10 10. Formulation selon la revendication 1, dans laquelle ladite formulation est une formulation aqueuse.
11. Formulation selon la revendication 1, dans laquelle ladite formulation est sous forme d'une granule dispersible dans l'eau ou d'une poudre soluble dans l'eau.
- 15 12. Procédé permettant de préparer la formulation de la revendication 1, comprenant le mélange (a) d'une préparation comprenant un ou plusieurs dérivés d'anthraquinone ayant une activité contre les phytoravageurs (b) une lignine et éventuellement (c) de l'eau.
- 20 13. Procédé selon la revendication 12, dans lequel environ 1 partie (a) d'une préparation comprenant un ou plusieurs dérivés d'anthraquinone ayant une activité contre les phytoravageurs est mélangé avec (b) environ 1 à environ 9 parties d'une lignine pour obtenir une formulation sèche.
- 25 14. Procédé permettant de produire une formulation aqueuse comprenant (a) une préparation comprenant un ou plusieurs dérivés d'anthraquinone ayant une activité contre les phytoravageurs et (b) une lignine comprenant le mélange d'une partie d'une formulation sèche obtenue selon le procédé de la revendication 9 avec environ 100 à environ 2500 parties d'eau.
- 30 15. Procédé permettant (1) de moduler les infections phytopathogéniques, fongiques et/ou bactérienne et/ou une infestation de phytoravageurs et/ou (2) de moduler la germination des graines et/ou (3) de moduler la croissance la croissance de ladite plante comprenant le traitement de la plante et/ou de l'infection bactérienne et/ou de l'infestation de phytoravageurs et/ou de moduler la germination des graines et/ou de moduler la croissance de ladite plante.

16. Utilisation d'une (a) préparation comprenant un ou plusieurs dérivé d'anthraquinone ayant une activité contre les phytoravageurs et (b) une lignine permettant de préparer la formulation de la revendication 1 permettant de moduler une infection phytopathogénique, fongique et/ou bactérienne et/ou une infestation de phytoravageurs et/ou permettant de la germination d'une
- 5 graine et/ou permettant de moduler la croissance de ladite plante.