

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication :
MA 60458 A1

(51) Cl. internationale :
A01N 65/40

(43) Date de publication :
29.11.2024

(21) N° Dépôt :
60458

(22) Date de Dépôt :
22.05.2023

(71) Demandeur(s) :
Université Ibn Zohr, Quartier Ryad Salam - BP : 32/S Agadir (MA)

(72) Inventeur(s) :
Zineb Khadfy ; Rachid Mamouni ; Si Mohamed Jadouali ; Hajar Atifi ; Abdelghani Tahiri ; Youssef Karra ; Redouan Qessaoui ; Nabil Saffaj

(74) Mandataire :
TOUALI Najat

(54) Titre : **Nouveau biopesticide à base des extraits des sous-produits de Crocus Sativus (Safran) pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par Clavibacter Michiganesis susp Michiganesis**

(57) Abrégé : La présente invention concerne la valorisation des sous-produits de Crocus Sativus (Safran) comme pesticide de nature biologique et son application comme agent antibactérien pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par Clavibacter Michiganesis Subsp Michiganesis. Mots clés : Bio-pesticide, Sous-produits de safran, inhibition, extrait éthanolique, chancre bactérien, Clavibacter Michiganesis Subsp Michiganesis.

Abrégé

La présente invention concerne la valorisation des sous-produits de *Crocus Sativus* (Safran) comme pesticide de nature biologique et son application comme agent antibactérien pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par *Clavibacter Michiganesis Subsp Michiganesis*.

Mots clés : Bio-pesticide, Sous-produits de safran, inhibition, extrait éthanolique, chancre bactérien, *Clavibacter Michiganesis Subsp Michiganesis*.

**Nouveau biopesticide à base des extraits des sous-produits de *Crocus Sativus* (Safran)
pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par *Clavibacter Michiganesis*
*susp Michiganesis***

Description de l'invention

Le safran (*Crocus sativus L.*), le fameux or rouge, est attribué aux filaments rouges de la plante nommées stigmates. Connu traditionnellement comme épice pour les plats Marocaines, le safran apporte une couleur jaune et une saveur caractéristique aux différents repas. Actuellement, la plante de safran est distribuée presque partout dans le Maroc, on peut citer du Nord au Sud ; Larache ; Chefchaouen ; Debdou à Oujda ; Missouri ; Azilal ; Ourika ; Chichawa ; Taliouine ; Taznakht ; Zagora ; Skoura ; Foug Zguid ; Tourjidal ; Ighrem etc. Alors que le Safran était traditionnellement cultivé dans deux régions : Taliouine et Taznakht. La production annuelle de safran au Maroc est passée de 1.500 kg en 2008 à 6.500 kg de stigmates séchés en 2019 sur 1865 ha de surface cultivée.

La plante de safran est constituée de plusieurs parties : Six à neuf feuilles vertes, six tépales violets, et un pistil prolongé composé d'un style qui se termine par trois filaments rouges appelés stigmates et trois étamines jaunes recouvertes de grains de pollen figure 3.

L'émondage des stigmates de safran est l'opération de séparation des stigmates du reste de la fleur de safran. Cela génère un ensemble des bio-résidus florales dites sous-produits. La grande quantité de ces sous-produits est non utilisée par la population locale et avec aucune valeur commerciale.

La tomate est un produit agricole fréquemment affecté par plusieurs maladies causées par différents types de microorganismes pathogènes comme les champignons, les bactéries et les virus.

Clavibacter Michiganesis subsp Michiganesis (CMM) est une bactérie gramme positive qui touche la tomate provoquant une maladie au niveau de sa tige dite : chancre bactérien. Les symptômes de cette maladie se présentent sous forme d'un flétrissement des feuilles de la tomate et la formation des trous noir sur la surface du fruit dits : Les yeux d'oiseau.

Pour la lutte contre cette maladie, les agriculteurs font appel à des pesticides de nature chimique. Néanmoins, ces pesticides ont des effets néfastes à plusieurs niveaux :

- a- Détérioration de la qualité de l'eau de surface et de souterraines ce qui provoque des risques graves sur les espèces aquatiques.

b- Détérioration de la qualité du sol ce qui provoque des risques graves sur le faune et la flore terrestres.

c- L'exposition fréquente aux pesticides chimiques affecte la sante de l'Homme, ce qui provoque l'apparition des variétés de cancer.

L'utilisation des sous-produits de safran pour la production des biopesticides peut réduire la quantité de déchets jetés et réduire les utilisations accrues des pesticides chimiques pour le traitement des maladies de plantes.

Dans cette présente innovation, nous utilisons les sous-produits de safran comme nouveaux biopesticide pour le traitement du chancre bactérien de la tomate. Pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits éthanoliques des sous-produits de safran, nous avons choisi comme méthode ; la méthode de diffusion sur puit d'agar.

Les sous-produits de safran, contenant les étamines et les pétales, ont été recueillies auprès des safranières du village Askaouen dans la région de Taliouine, Maroc.

Ces bio-résidus ont été séchés à l'aire libre puis broyer à l'aide d'un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre plus ou moins fine, et ensuite ils ont été stocker dans des flacons sombre en verre identifié comme suit : Poudre de pétales, poudre d'étamine, poudre de la fleur émondée.

La méthode de diffusion sur puits d'agar est une méthode qualitative s'appuie sur la mesure de diamètre de la zone d'inhibition. Cette méthode a été utilisée pour une première évaluation de l'activité antibactérienne des extraits éthanoliques des sous-produits du safran. En effet, après l'activation de la souche bactérienne CMM dans le milieu NBY, une suspension de CMM a été préparée dans de l'eau physiologique stérile. La densité optique de la suspension bactérienne a été ajustée à 0,7 à 610 nm ce qui est équivalent à 10^8 UFC/ml. Un volume de 100 μ l de la suspension bactérienne a été étalé sur la surface du milieu gélosé. Trois puits de 6 mm de diamètre ont été percés avec une pipette pasteur dans chaque boîte de Pétri. Chaque puits a été rempli avec les différentes concentrations des extraits préparés. Après une préincubation de 2h à 4°C, les boîtes ont été incubées à 29°C pendant 48h. De l'éthanol 70% a été utilisée comme contrôle négatif. Les zones d'inhibition autour des puits ont été mesurées avec une règle et comparées au contrôle. Les résultats de ce test sont présentés dans les images de la figure 6 et sont représentés graphiquement dans la figure 2.

La figure 2 montre que les extraits éthanoliques de tous les sous-produits de safran utilisés (fleur émondée, pétales et étamines) pour ladite invention, montre une activité antibactérienne importante contre *Clavibacter Michiganesis subsp Michiganesis*. En effet, les

extraits éthanoliques de la fleur émondée de safran ont montré une activité inhibitrice plus grande que les extraits éthanoliques des pétales et des étamines de safran. Les concentrations élevées (50mg/ml) des extraits éthanoliques des fleurs émondée de safran ont inhibé fortement la croissance de la bactérie CMM avec un diamètre de zone d'inhibition de 34,67 mm. Ainsi que les concentrations élevées (50mg/ml) des extraits éthanoliques des pétales de safran ont inhibé la croissance de la bactérie CMM avec un diamètre de zone d'inhibition de 31,67 mm. Par contre, la concentrations minimale (3mg/ml) des extraits éthanoliques des étamines de safran a inhibé légèrement la croissance de la bactérie CMM avec un diamètre de zone d'inhibition de 10 mm.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits des sous-produits de safran utilisées ont été déterminées à l'aide de la méthode de dilution en utilisant des microplaques à 96 puits. En effet, 100µl de bouillon NBY a été mis dans tous les puits de la plaque. Les puits de la première rangée verticale sont remplis par 200µl de la solution mère (SM) de chaque extrait. Les puits de la dernière rangée verticale (Numéroté 12) sont remplis par 200µl de la suspension bactérienne de 10^6 UFC/ ml comme témoin de la croissance bactérienne, et les puits de l'avant dernière rangée verticale (numéroté 11) sont remplis par 200µl de bouillon NBY comme témoin de stérilité. Une série de dilution successive a été réalisé pour avoir des concentrations finales allant de (25mg/ml à 0,0977 µg/ml). Ensuite, 100µl de la suspension bactérienne à 10^6 UFC/ ml a été ajoutée dans tous les puits sauf les puits de témoin de stérilité (11) et de croissance (12). Chaque test est réalisé en trois répétitions. A la fin, la microplaque a été incubée à 29 °C pendant 48h. Les CMI déterminées à l'aide d'un indicateur coloré TTC sont présentés dans la figure 1.

Les résultats rapportés dans la figure 1 montre que les extraits éthanoliques de la fleur émondée de safran présentent un effet antimicrobien maximal contre *Clavibacter Michiganesis subsp Michiganesis* avec une valeur de CMI égale 1,56 mg/ml. La concentration minimale inhibitrice des extraits éthanoliques des pétales de safran était 6,25 mg/ml. Par contre, la concentration minimale inhibitrice des extraits éthanoliques des étamines de safran était plus faibles par rapport aux autres extraits avec une valeur de 25 mg/ml.

Compte tenu ces résultats, les extraits éthanoliques de la fleur émondé de safran qui rassemble deux parties (étamines et pétales), inhibent la croissance de CMM avec un degré plus important que les pétales et les étamines séparés. Cela peut être expliquer par un effet synergétique entre les métabolites secondaires des pétales et des étamines. L'assemblage des composé phénoliques présent dans les pétales ainsi que les acides gras, les caroténoïdes et autres présents dans les étamines, renforce plus le pouvoir antibactérienne de la fleur émondée

de safran. On peut conclure donc que l'utilisation directe de la fleur émondée de safran généré après l'émondage des stigmates, sans faire retour à la séparation des pétales et étamines, demeure plus efficace pour avoir des résultats satisfaisant en matière d'inhibition de la croissance de l'agent causal du chancre bactérien de la tomate.

Revendications

- 1- Le nouveau biopesticide à base des extraits des sous-produits de *Crocus Sativus* (Safran) pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par *Clavibacter Michiganesis susp Michiganesis*, caractérisé en ce qu'il comprend les sous-produits de safran suivants : Pétales, Etamines et Fleurs émondées.
- 2- Le nouveau biopesticide à base des extraits des sous-produits de *Crocus Sativus* (Safran) pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par *Clavibacter Michiganesis susp Michiganesis*, selon la revendication 1, caractérisé en ce que le procédé d'extraction des sous-produits de safran s'effectue comme suit :
 - a- Séchage et broyage de la matière végétale ;
 - b- Macération conventionnelle : 1 g de la poudre végétale a été macérer dans 20 ml de l'éthanol 60% pendant 24h à l'abri de la lumière et à température ambiante ;
 - c- Filtration de l'extrait liquide par papier filtre en utilisant une pompe sous vide ;
 - d- Concentration des extraits éthanoliques par le rota vapeur pour éliminer le solvant et avoir des extraits dites brutes.
 - e- Identification et stockage à 4°C.
- 3- Le nouveau biopesticide à base des extraits des sous-produits de *Crocus Sativus* (Safran) pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par *Clavibacter Michiganesis susp Michiganesis*, selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que trois concentrations des extraits des sous-produits de safran utilisées pour le test antibactérien contre *Clavibacter Michiganesis Subsp Michiganesis* ont été préparé comme suit :
 - a- 6 mg de chaque extrait brut ont été dilués dans 2ml de l'éthanol 20% (3mg/ml).
 - b- 40 mg de chaque extrait brut ont été dilués dans 2ml de l'éthanol 20% (20mg/ml).
 - c- 100 mg de chaque extrait brut ont été dilués dans 2ml de l'éthanol 20% (50mg/ml).

- 4- Le nouveau biopesticide à base des extraits des sous-produits de *Crocus Sativus* (Safran) pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par *Clavibacter Michiganesis susp Michiganesis*, selon les revendications 1, 2 et 3, caractérisé en ce que lesdits extraits préparés à partir des sous-produits de safran se présentent sous forme d'une solution éthanolique liquide.
- 5- Le nouveau biopesticide à base des extraits des sous-produits de *Crocus Sativus* (Safran) pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par *Clavibacter Michiganesis susp Michiganesis*, selon les revendications 3 et 4, caractérisé en ce que le procédé d'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits des sous-produits de safran s'effectue selon les étapes suivantes :
 - a- Activation de la souche bactérienne par repiquage successive sur un milieu de culture spécifique qui est : NBY (Nutritional Broth Yeast)
 - b- Préparation et coulage de milieu de culture NBY dans des boîtes de pétries ;
 - c- Réalisation du test de diffusion sur puits d'agar.
- 6- Le nouveau biopesticide à base des extraits des sous-produits de *Crocus Sativus* (Safran) pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par *Clavibacter Michiganesis susp Michiganesis*, selon la revendication 5, caractérisé en ce que le procédé d'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits des sous-produits de safran s'effectue par la méthode de diffusion sur puits d'agar.
- 7- Le nouveau biopesticide à base des extraits des sous-produits de *Crocus Sativus* (Safran) pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par *Clavibacter Michiganesis susp Michiganesis*, selon la revendication 5-a, caractérisé en ce que le milieu de culture NBY contient les éléments suivants : Agar bactériologique de type A, bouillon nutritif, extrait de levure, K_2HPO_4 , H_2KPO_4 , $MgSO_4$ et cycloheximidine (un antifongique).
- 8- Le nouveau biopesticide à base des extraits des sous-produits de *Crocus Sativus* (Safran) pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par *Clavibacter Michiganesis susp Michiganesis*, selon les revendications 2, 3, 4, 5 et 6, caractérisé en ce que la concentration initiale des extraits éthanoliques des sous-produits de safran utilisé pour l'évaluation de leurs activités antibactériennes par la méthode de macro-dilution sur des microplaques à 96 puits, est de 50 mg/ml.

- 9- Le nouveau biopesticide à base des extraits des sous-produits de *Crocus Sativus* (Safran) pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par *Clavibacter Michiganesis susp Michiganesis*, selon les revendications 1, 2, 3 et 4, caractérisé en ce que l'utilisation des extraits éthanoliques des trois parties de la fleur de safran (pétales, étamines et fleur émondées) est faite comme agent antibactérien pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par *Clavibacter Michiganesis Subsp Michiganesis*.

Figures

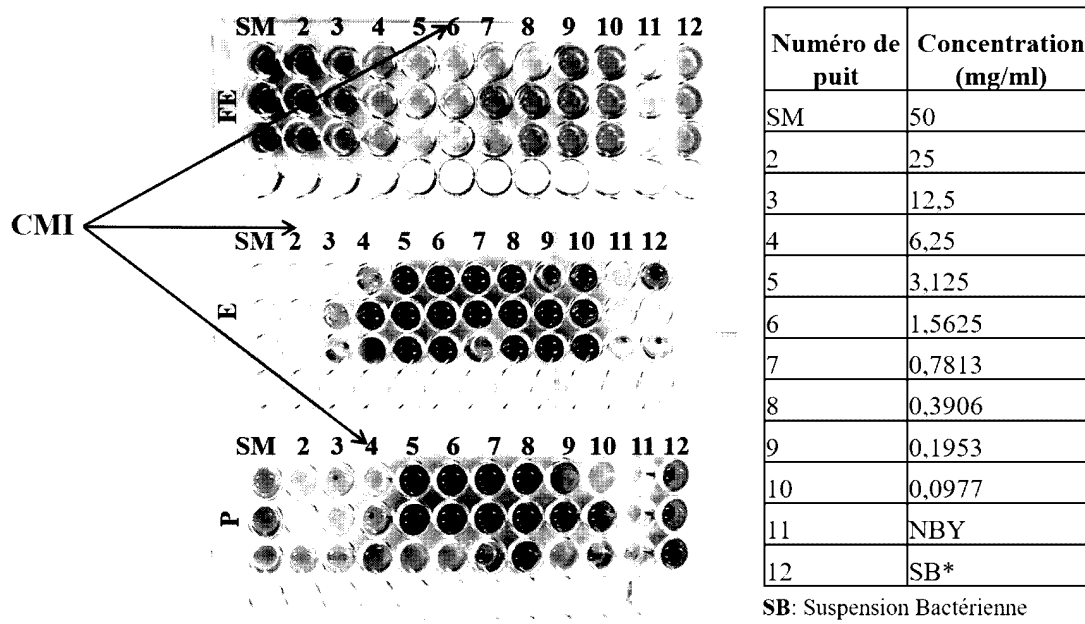


Figure 1: CMI des différents extraits préparés ; FE : Fleur émondée, P : Pétales, E : Etamines, SM : Solution Mère.

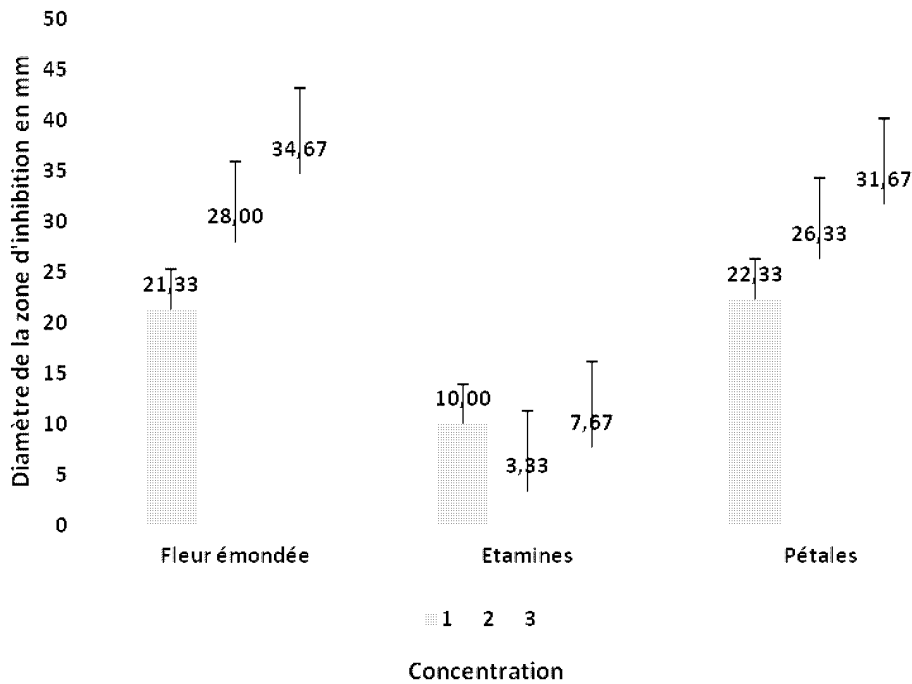


Figure 2: Diamètre des zones d'inhibition des différentes concentrations des extraits éthanoliques des sous-produit de safran : 1 (3mg/ml), 2 (20mg/ml), 3 (50mg/ml)

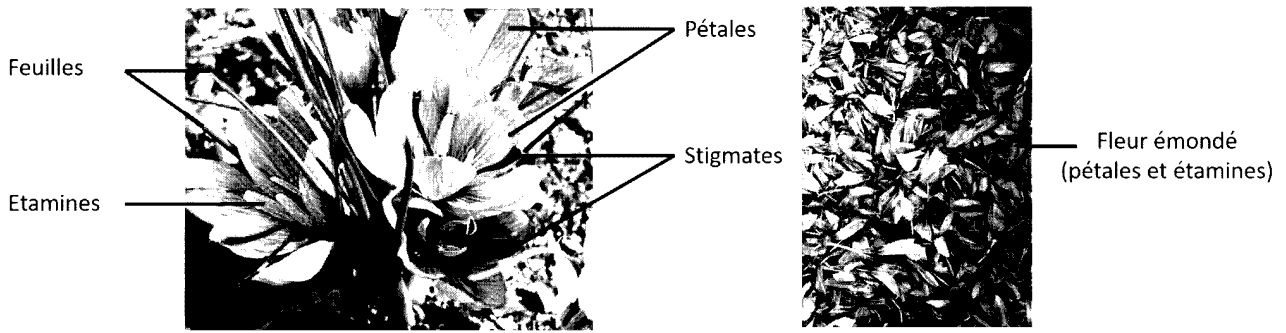


Figure 3: Différentes parties de la plante de *Crocus Sativus L.*

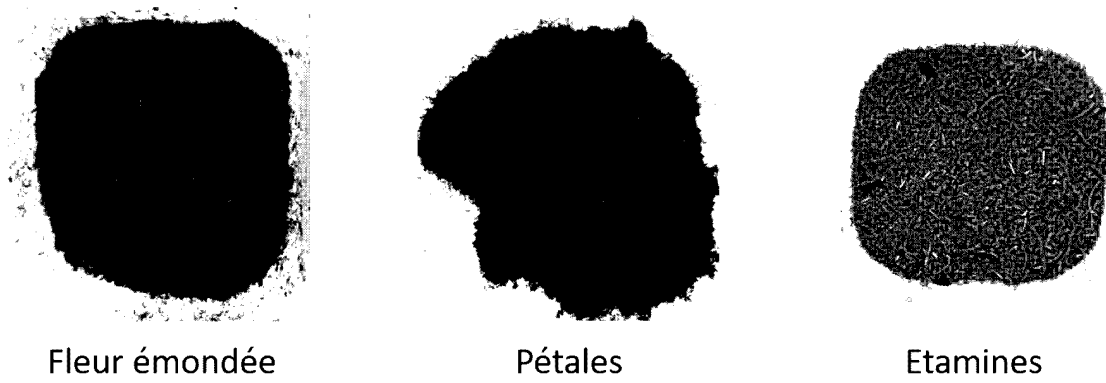


Figure 4. Sous-produits de *Crocus Sativus L.* utilisés pour le dite invention après séchage et broyage

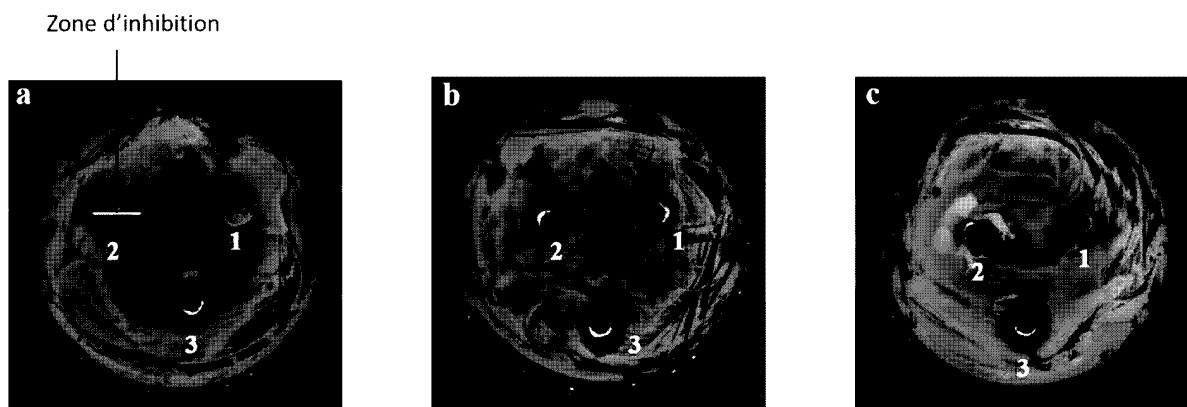
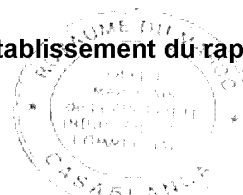


Figure 5. Diamètre de zones d'inhibition des extraits éthanoliques des pétales (a), des étamines (b) et des fleurs émondées (c) de safran contre *Clavibacter Michiganensis subsp Michiganensis* à différentes concentrations : 1 (3mg/ml), 2 (20 mg/ml) et 3 (50 mg/ml).

**RAPPORT DE RECHERCHE
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée
par la loi 23-13)

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 60458	Date de dépôt : 22/05/2023
Déposant : Université Ibn Zohr	
Intitulé de l'invention : Nouveau bio-pesticide à base des extraits des sous-produits de Crocus Sativus (Safran) pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par Clavibacter Michiganesis susp Michiganesis	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site http://worldwide.espacenet.com , et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport <input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité <input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de forme et de clarté <input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
Examineur: BRINI ABDELAZIZ	Date d'établissement du rapport : 08/09/2023
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	



Partie 1 : Considérations générales**Cadre 1 : base du présent rapport**

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description
4 Pages
- Revendications
9
- Planches de dessin
2 Pages

Partie 2 : Rapport de recherche

Classement de l'objet de la demande :

CIB : A01N65/40

CPC : A01N65/40

Plateformes et bases de données électroniques de recherche :

EPOQUENET, WPI, ScienceDirect

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
A	Sara Primavilla et al « Antibacterial Activity of Crocus sativus L. Petals Extracts against Foodborne Pathogenic and Spoilage Microorganisms, with a Special Focus on Clostridia » Life 2023, 13, 60.	1-9
A	Concepción Pintado et al « Bactericidal effect of saffron (Crocus sativus L.) on Salmonella enterica during storage » Food Control 22 (2011) 638-642	1-9
A	CN111838198A ; UNIV NANTONG [CN] ; 30-10-2020 Document en entier	1-9

***Catégories spéciales de documents cités :**

-« X » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
-« Y » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
-« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
-« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs
-« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité**Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

Nouveauté	Revendications 1-9	Oui
	Revendications aucune	Non
Activité inventive	Revendications 1-9	Oui
	Revendications aucune	Non
Application Industrielle	Revendications 1-9	Oui
	Revendications aucune	Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

- D1 : Sara Primavilla et al « Antibacterial Activity of Crocus sativus L. Petals Extracts against Foodborne Pathogenic and Spoilage Microorganisms, with a Special Focus on Clostridia »
Life 2023, 13, 60.
- D2 : Concepción Pintado et al « Bactericidal effect of saffron (Crocus sativus L.) on Salmonella enterica during storage »
Food Control 22 (2011) 638-642
- D3 : CN111838198A

1. Nouveauté

Aucun des documents susmentionnés ne divulgue les mêmes caractéristiques techniques telles que décrites dans la revendication 1-9, d'où celle-ci est nouvelle conformément à l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive

Le document D1 qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 décrit une étude des propriétés antibactériennes de deux extraits hydroalcooliques obtenus à partir de pétales de safran par macération (SPEA) et par bain à ultrasons (SPEB). L'activité antibactérienne a été étudiée par la méthode de diffusion sur puits d'agar, contre les bactéries pathogènes et d'altération d'origine alimentaire. Les deux extraits ont montré une activité principalement contre les bactéries Gram-positives, en particulier celles appartenant à la famille des Clostridiaceae (*C. perfringens*, *C. botulinum* et *C. difficile*), avec des diamètres de zones d'inhibition allant de 13 à 18 mm.

L'objet de la revendication 1 diffère de D1 en ce que le bio-pesticide à base des extraits des sous-produits de safran est utilisé pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par *Clavibacter Michiganesis* susp *Michiganesis*.

Le problème que la présente demande se propose de résoudre est la fourniture bio-pesticide à base des extraits des sous-produits de safran utile pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates.

La solution proposée n'est pas évidente pour la raison suivante :

Aucun document de l'art antérieur ne divulgue ni ne suggère l'utilisation des extraits des déchets de safran (pétales , étamines et fleurs émondées) comme bio-pesticide pour la lutte contre le chancre bactérien des tomates causé par *Clavibacter Michiganesis* susp *Michiganesis* tel que décrit dans la présente demande.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 implique une activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

La revendication indépendante 2 concerne un procédé de préparation du bio-pesticide décrit dans la revendication 1. Par la suite, le même raisonnement s'applique à la revendication 2 en impliquant une activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Les revendications dépendantes 3-9 satisfont donc en tant que telles aux exigences concernant l'activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

3. Application industrielle

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.