

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
29 juin 2006 (29.06.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale

WO 2006/067318 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A01N 63/02 (2006.01) A01P 3/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/003177

(22) Date de dépôt international :
16 décembre 2005 (16.12.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0413484 17 décembre 2004 (17.12.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : B2B
SARL [FR/FR]; Tour de l'Horloge, 4, place Louis Armand,
F-75012 Paris (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : BESNARD,
Olivier [FR/FR]; 69, avenue de Castelnau, F-34090 Mont-
pellier (FR).

(74) Mandataire : BES, Claude; Cabinet Claude BES, 2, Bis
Rue de Verdun, F-34000 Montpellier (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasienn (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avec revendications modifiées et déclaration

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL USE OF BACILLUS SPHAERICUS AND BACILLUS THURINGIENSIS SPORES, PROTEINS OR ENDO-
TOXINS IN THE FORM OF PLANT NATURAL DEFENCE STIMULATORS

(54) Titre : NOUVELLE UTILISATION DE SPORES , DE PROTEINES OU D ' ENDOTOXINES DE BACILLUS SPHAERI-
CUS ET DE BACILLUS THURINGIENSIS COMME STIMULATEURS DES DEFENSES NATURELLES DES PLANTES

(57) Abstract: The invention relates to the novel use of spores, proteins or delta-endotoxins produced from clones of Bacillus
thuringiensis var kurstaki de Barjac et Lemille (serotypes 3a and 3b) deposited in the ATCC under the N° 33679, clones of Bacillus
thuringiensis var israelensis de Barjac (serotype H 14) deposited in the ATCC under the N° 35646, clones of Bacillus sphaericus
deposited in the ATCC under the N° 10208 in the form of a natural defence stimulator for entire plants by a foliar or root application
or by injection against pathogens of fungal and/or bacterial and/or viral cultures.

(57) Abrégé : L'invention concerne une nouvelle utilisation de spores, de protéines ou de delta- endotoxines issues : - de clones de
Bacillus thu[®]ngiensis var kurstaki de Barjac et Lemille (sérototype 3a et 3b) déposé à l'ATCC sous le N0 33679 ; - de clones de Bacillus
thuringiensis var israelensis de Barjac (sérototype H 14) déposé à l'ATCC sous le N0 35646 ; - de clones de Bacillus sphaericus déposé
à l'ATCC sous le N° 10208 ; comme stimulateur des défenses naturelles des plantes entières par application foliaire, racinaire ou par
injection, contre les pathogènes des cultures des types fongiques et/ou bactériens et/ou viraux.



WO 2006/067318 A1

NOUVELLE UTILISATION DE SPORES, DE PROTEINES OU D'ENDOTOXINES DE BACILLUS SPHAERICUS ET DE BACILLUS THURINGIENSIS COMME STIMULATEURS DES DEFENSES NATURELLES DES PLANTES

DESCRIPTION

La présente invention concerne une nouvelle utilisation de spores, de protéines ou de delta-endotoxines issues de clones de *Bacillus sp*, comme stimulateur des défenses naturelles des plantes entières par application foliaire, racinaire ou par injection, contre les pathogènes des cultures des types fongiques et/ou bactériens et/ou viraux.

Elle concerne également l'obtention desdits composants et la composition qui les incorpore.

Les plantes ont développé au cours de leur évolution divers mécanismes de défense efficaces contre de nombreux agents pathogènes comme les champignons, les bactéries, les virus et les insectes. Si certains mécanismes de défense sont constitutifs, d'autres sont induits lorsque la plante a reconnu soit l'un des composants du microorganisme, soit un éliciteur externe (reconnaissance non spécifique).

Le recoupement de nombreuses études liées aux modifications métaboliques associées à la résistance induite a mis en évidence des similarités importantes dans les réponses de différentes espèces végétales. Nous citerons à titre d'exemple trois catégories de variations métaboliques :

- une intense stimulation des enzymes clés Peroxydase et Phenylalanine ammonia-lyase aboutissant, par activation de la voie des phénylpropanoïde, au renforcement de la barrière mécanique naturelle des cellules végétales (lignine, subérine...), à la synthèse de phytoalexines, de composés phénoliques et de l'acide salicylique ;
- l'activation de la lipoxygénase (voie des octanoïdes) intervenant dans la production de l'acide jasmonique
- la production d'une large gamme de peptides et de protéines de défense (protéines PR ou Pathogenesis-related proteins) parmi lesquelles, la chitinase, la β -1,3-glucanase, des inhibiteurs de protéases et de polygalacturonase.

Il a été démontré que plusieurs substances de natures et de structures chimiques diverses possèdent la propriété de stimuler les défenses naturelles des plantes. Outre les oligosaccharides, certaines protéines et oligopeptides se sont révélés efficaces et les effets des éliciteurs peptidiques et glycoprotéiques sur les plantes supérieures sont bien documentés (Ricci *et al*, 1989 ; Nürnberger *et al*, 1994 ; Pugin *et al*, 1997 ; Ebel et Mithöfer, 1998 ; Martinez *et al*, 1999 ; Picard *et al*, 2000,

Martinez *et al*, 2001). D'autres molécules telles que les phosphonates (Bonomelli *et al*, 2002), l'acide β -aminobutyrique (Daire *et al*, 2002 ; Zimmerli *et al.*, 2001 ; Cohen *et al.*, 1999 ; Reuveni *et al*, 1999) se sont également avérées actives en tant qu'éliciteurs.

5 Les brevets FR2821241 (Biophytech) et FR2832409 (CNRS et Biophytech) font aussi état des propriétés élicitrices d'oligopeptides constitués de 3 à 20 acides aminés et dont la caractéristique principale est une structure en hélice alpha. Dans le premier cas, les éliciteurs décrits sont des peptaibols issus du champignon filamentueux *Trichoderma harzianum*. Ces peptaibols sont de petits oligopeptides
10 linéaires, hydrophobes, dont la masse est comprise entre 1 et 2 kiloDaltons. Ils contiennent des aminoacides peu classiques comme l'acide aminoisobutyrique (Aib) ou l'Isovaline (Ival). Dans le second cas, il s'agit d'une série de composés polymères d'acides aminés permettant aux plantes de lutter contre divers pathogènes.

15 Les bactéries de l'espèce *Bacillus thuringiensis* (Bt) sont maintenant bien connues pour les toxines insecticides qu'elles produisent et leurs utilisations. Jusqu'à présent l'intérêt des nombreuses formulations commercialisées à base de *Bacillus thuringiensis* réside d'une part dans leur spécificité d'action vis-à-vis d'un ou plusieurs ordres d'insectes et d'autre part dans leur innocuité vis-à-vis des
20 organismes non cibles et de l'environnement. Les principales composantes de cette activité sont attribuées aux inclusions cristallines produites pendant la sporulation de Bt et contenant les delta-endotoxines suivantes : les protéines du cristal (Cry), selon lesquelles différents types de Bt sont classifiés et les toxines cytolytiques (Cyt) qui augmentent l'action des protéines Cry en rehaussant leur efficacité contre les
25 insectes (activité hémolytique). Les δ -endotoxines sont produites abondamment durant la sporulation et s'accumulent sous forme d'inclusions cytoplasmiques parasporales pouvant représenter jusqu'à 25% du poids sec des cellules sporulées. C'est grâce à ces composantes essentielles que les propriétés de *Bacillus thuringiensis* sont employées en protection des cultures contre les insectes
30 ravageurs, en tant que solution alternative aux insecticides chimiques.

Cependant, une activité antifongique directe de certaines souches de *Bacillus thuringiensis* a également été mise en évidence et ceci vis-à-vis de divers pathogènes et au niveau de différentes cultures. A ce titre, nous pouvons citer les études réalisées par Moar William J (brevet US628072) sur une souche productrice

de chitinase (AU634) permettant de lutter contre des champignons tels que le *Botrytis cinerea* ou *Alternaria solani*. Wigley, P. (brevet US6077506) propose une nouvelle souche (AQ52) utilisable en tant qu'agent de contrôle d'un grand nombre de pathogènes comme *Phytophthora infestans*, *Uncinula necator*, *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinerea*, *Monilia fructigena*... D'autre part, des activités nématocide (Brevet US5378460) et de stimulation de la croissance des plantes (Brevet CA2422343) ont déjà été revendiquées.

D'autres espèces de *Bacillus* tels que *pumilis* et *mycooides* (Jacobsen, et al – Montana State Univ), *subtilis* (Gu, Zhen-rong, Shangai Acad of Agric Science), et *licheniformis* (Argento, US Patent 5665354), ont également des action directes contre les pathogènes.

La particularité de l'invention réside à la fois dans le mode et le mécanisme d'action de la souche de *Bacillus thuringiensis* ou *sphaericus* et / ou de protéines issues de la bactérie ainsi que dans leur activité. En effet, selon l'invention, il ne s'agit plus ici d'utiliser les spores, les protéines ou les endotoxines de *Bacillus thuringiensis* ou *sphaericus* pour leurs propriétés insecticides ou fongicides mais pour leur capacité à stimuler les défenses naturelles des plantes entières. Ces nouveaux types d'éliciteurs sont donc capables de stimuler différentes activités enzymatiques largement impliquées dans les mécanismes de résistance induite contre les parasites des végétaux.

La spécificité de l'invention repose donc sur l'utilisation :

- d'une part des spores, des protéines ou des delta-endotoxines issus d'un clone de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* de Barjac et Lemille -sérotypé 3a et 3b déposée à l'ATCC (American Type Culture Collection)-sous le numéro 33679,
- d'autre part des spores, des protéines ou des delta-endotoxines issus du clone *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* de Barjac, déposé à l'ATCC sous le numéro 35646,
- et enfin des spores, des protéines ou des delta-endotoxines d'un clone de *Bacillus sphaericus* Meyer and Neide (*thuringiensis* var *medellin*), déposé à l'ATCC sous le numéro 10208.

Dans le cas des protéines Cyt de *Bacillus thuringiensis*, la formation des pores s'effectue différemment ; ces protéines sont composées d'un seul domaine constitué de 4 hélices alpha externes entourant plusieurs brins β . Le mécanisme de formation des pores par ces δ -endotoxines Cyt impliquerait l'oligomérisation de

plusieurs brins β dans la membrane pour former un « tonneau β » laissant les hélices α exposées sur la surface membranaire (Li *et al*, 2001).

La présente invention a donc pour objet un procédé de lutte contre des agents pathogènes (Champignons et / ou bactéries et / ou virus et / ou insectes) de plantes agronomiquement utiles caractérisé en ce qu'il comprend l'application auxdites
5 plantes de nouveaux éliciteurs.

Selon l'invention, l'utilisation de ces composés est essentiellement destinée à la viticulture, à l'arboriculture et au maraîchage.

L'invention concerne donc la production des bactéries et de leurs δ -endotoxines Cry et Cyt comme stimulateurs des défenses naturelles des plantes, ces derniers
10 permettant une action principalement préventive mais aussi curative. Les structures hélicoïdales et / ou en feuillet β se logent à l'intérieur des membranes cellulaires et forment un canal ionique ou pore qui modifie la perméabilité membranaire (dépolari-
sation), constituant un signal précoce pour le déclenchement de la cascade
15 d'événements métaboliques amenant la résistance de la plante face à ses agresseurs.

Le procédé selon l'invention est en outre caractérisé en ce que :

- les spores, les protéines ou les delta-endotoxines sont incorporées à un véhicule autorisé en agriculture de type mouillant et pénétrant ;
- 20 - la composition se présente sous la forme liquide, notamment sous la forme de solution aqueuse ;
- la composition se présente sous la forme solide, notamment sous la forme de poudres, granulés ou en enrobage de semences.

Il se caractérise également en ce que la composition est utilisée pour réduire :

- 25 - lorsqu'elle est appliquée aux céréales, notamment le blé, le maïs et le riz, l'attaque des oïdiums, des septorioses, des rouilles, des fusarioses, des pyricularioses et des maladies bactériennes et virales ;
- lorsqu'elle est appliquée aux arbres fruitiers, notamment le poirier et le pommier, l'attaque des oïdiums, des tavelures, des monilioses, des maladies bactériennes et
30 virales telles que la "Sharka" ;
- lorsqu'elle est appliquée à la vigne, l'attaque de l'oïdium, du mildiou, du *Botrytis*, des maladies du bois, des maladies telluriques et virales telles que le "Court-Noué" ;
- lorsqu'elle est appliquée aux gazons et en horticulture, les attaques des pythiacés, champignons à sclérotés, fusarioses, oïdiums, maladies bactériennes et virales ;

- lorsqu'elle est appliquée aux oléagineux, notamment le soja, le tournesol, les melons, les carottes, le chou-fleur et les pommes de terre, l'attaque des oïdiums, des mildious des pythiacées (*Phytophthora*, *Pythium*), des champignons à sclérotés (*Rhizoctonia*, *Sclerotinia Pyrenochaeta*), des champignons vasculaires (*Fusarium*,
5 *Verticillium*), des maladies bactériennes et virales.

Le procédé selon l'invention est également caractérisé en ce que l'application desdits composés est réalisée avec une fréquence de 10 à 15 jours, cas le plus courant en agriculture. Les mécanismes de défense sont stimulés à chaque nouveau traitement.

10 Le choix du marqueur biochimique s'est ici porté sur la mesure de l'activité peroxydasique. Ces enzymes sont impliquées dans les réponses précoces à une stimulation des défenses. Ce sont donc des marqueurs du déclenchement d'une réaction de défense comme :

- Le renforcement des parois cellulaires et la constitution de barrières pariétales qui
15 bloquent la progression du pathogène à l'intérieur des cellules de l'hôte.

- La production de composés toxiques intervenant dans les mécanismes de défense.

Les peroxydases catalysent l'oxydation de nombreux substrats par le peroxyde d'hydrogène : Le dosage de cette enzyme se fait par spectrophotométrie en utilisant
20 le guaïacol comme substrat. Incolore au départ, il prend rapidement une teinte brune orangée lorsqu'il est oxydé. Cette propriété rend possible l'étude de la cinétique enzymatique par spectrophotométrie. On peut suivre la réaction en mesurant la variation d'absorbance au cours du temps à 470 nm

La préparation de l'extrait végétal pour l'extraction de ces protéines solubles est
25 réalisée par broyage des feuilles fraîches dans un tampon acétate de sodium, 50 mM, pH 6 contenant du PolyVinylPyrolidone et en présence de sable de fontainebleau. L'extrait est alors centrifugé à 10 000 g pendant 5 min à 4°C. La cinétique est suivie après addition de guaïacol et de peroxyde d'hydrogène au surnageant.

30 Une description plus détaillée de l'invention est présentée à l'aide des exemples suivants. Ces exemples ne sont en aucun cas destinés à limiter le cadre de cette invention.

Exemple 1 : Obtention des spores de *Bacillus thuringiensis* et des protéines

Le procédé d'obtention des spores et des protéines de *Bacillus thuringiensis* selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- une phase de culture bactérienne

- 5 Le milieu de culture est le milieu usuel glucosé (UG) dont la composition est la suivante : KH_2PO_4 (6,8 g/l) – $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (1,123 g/l) – $\text{MnSO}_4, 4\text{H}_2\text{O}$ (2 mg/l) – $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (0,014 g/l) – $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$ (0,020 g/l) – $\text{CaCl}_2, 4 \text{H}_2\text{O}$ (0,183 g/l). A cette solution saline standard sont ajoutés 0,75% (p/v) de peptone pancréatique et 1% (p/v) de glucose. Le pH est alors ajusté à 7,4. Ce milieu est stérilisé par autoclavage
- 10 à 120°C pendant 20 minutes. La mise en culture est réalisée en ensemençant une préculture de spores en milieu UG pendant 15 heures à 30°C sous agitation. Les fioles contenant les bactéries en cultures sont ensuite placées à 30°C sous agitation rotative douce (200 rpm) jusqu'à la lyse complète des bactéries (de 48 à 72 heures).
- une phase de séparation des spores et des cristaux – analyse des protéines. Cette
- 15 phase est réalisée à 4°C. Le contenu de chaque fiole est centrifugé à 4500 rpm pendant 30 minutes. Le culot est ensuite repris dans NaCl 1M, lavé deux fois à l'eau distillée contenant 1 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride et 10 mM EDTA puis resuspendu dans un volume d'eau déminéralisée. La partie protéique est ensuite purifiée sur un gradient discontinu de sucrose selon la méthode de Thomas et Ellar
- 20 (1983) [ultracentrifugation à 25 000 rpm et 48°C pendant 16 heures]. La concentration en protéines est déterminée par la méthode de Bradford après solubilisation alcaline de l'extrait et une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) est réalisée pour la détection des protéines selon la méthode déjà décrites par Thomas et Ellar (1983).

- 25 Exemple 2 : Effet physiologique et agronomique de *Bacillus thuringiensis var kurstaki* (sérotypage 3a et 3b).

- Cas de la tomate : de jeunes plants de tomates en pots ont été traités par pulvérisation foliaire puis un prélèvement de feuilles pour le dosage des peroxydases a été effectué 24 heures et 7 jours après le traitement. La modalité de
- 30 traitement par le *Bacillus thuringiensis* selon l'invention a été comparée à l'activité peroxydasique générée par un extrait protéique, un extrait d'algue ainsi qu'à un témoin eau. Chaque expérience a été répétée 4 fois pour chacune des modalités. Les résultats des dosages sont exprimés $\Delta\text{DO} / \text{minute} / \text{gramme}$ de matière fraîche et sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

- 7 -

| Modalité testée | Activité peroxydasique (Δ DO/min/g MF) | | % d'augmentation par rapport au témoin | |
|-------------------------------|--|---------------------|--|------|
| | Prélèvement 24 h | Prélèvement 7 jours | 24 h | 7 j |
| Témoin eau | 54,85 \pm 8,9 | 68,18 \pm 8,6 | | |
| Extrait protéique | 61,91 \pm 9,8 | 68,54 \pm 5,84 | 12,9 | 0,52 |
| Extrait d'algue | 57,24 \pm 10,2 | 80,72 \pm 10,39 | 4,35 | 18,4 |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | 72,39 \pm 4,55 | 91,7 \pm 9,6 | 32 | 34,5 |

Dans le cas des deux prélèvements (24 heures et 7 jours), l'activité peroxydasique décelée dans les plants traités par le *Bacillus thuringiensis* selon l'invention est largement supérieure au témoin (plus de 30%) ainsi qu'aux autres extraits testés pour leur activité révélée comme élicitrice dans plusieurs travaux.

5

Exemple 3 : Effet physiologique et agronomique des protéines Cyt 2 Ba (*Bacillus thuringiensis var israelensis*) et Cyt 2 Bc (*Bacillus thuringiensis var medellin*)

- Cas de la vigne : les essais sont réalisés sur vigne en place (cépage syrah). Les traitements sont effectués par aspersion de l'éliciteur. La parcelle est divisée en 3 modalités comprenant les protéines Cyt 2 Ba et Cyt 2 Bc ainsi qu'un témoin eau. La concentration des deux protéines Cyt utilisée dans cet essai est de 250 μ g/ml. Les feuilles adultes sont prélevées au cours d'une cinétique d'élicitation au temps t = 0, 9 heures, 5 jours et 15 jours. Une fois le matériel végétal broyé dans le tampon adéquat, on procède à un dosage des peroxydases. Les résultats dosages sont exprimés Δ DO / minute / gramme de matière fraîche et sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

15

| Modalité testée | Activité peroxydasique (Δ DO/min/g MF) | | % d'augmentation par rapport au témoin | |
|-----------------|--|---------------------|--|--------|
| | Prélèvement 9 h | Prélèvement 5 jours | 9 h | 5 j |
| Témoin eau | 18,52 \pm 0,65 | 14,9 \pm 4,3 | | |
| Cyt 2 Ba | 28,04 \pm 0,76 | 32,4 \pm 5,7 | 51,4 | 117,45 |
| Cyt 2 Bc | 19,7 \pm 0,2 | | 6,4 | |

20

Ces tests montrent un double intérêt de cette protéine CYT 2 Ba : Elle présente une stimulation rapide de l'activité peroxydase après pulvérisation. Cette augmentation d'activité est préservée et même augmentée au bout de 5 jours

Exemple 4 : Effet de protection anti-pathogénique de *Bacillus sphaericus* par stimulation des défenses naturelles de la plante

- 5 La composition à base de spores de *Bacillus thuringiensis var kurstaki* préparé selon l'exemple 1 est pulvérisée sur différentes plantes afin de tester leur résistance vis-à-vis de divers pathogènes. A titre d'exemple et en comparaison à des témoins non traités, les effets protecteurs de la composition selon l'invention se sont révélés efficaces lors de traitements préventifs renouvelés régulièrement. Nous citerons à titre d'exemples, les couples plante / pathogène suivant : vigne / Mildiou, Vigne / Botrytis, melon / Oïdium, Blé / Oïdium.

REVENDEICATIONS

- 1- Utilisation de spores, de protéines ou de delta-endotoxines issues :
- de clones de *Bacillus thuringiensis var kurstaki* de Barjac et Lemille (sérotype 3a et 3b) déposé à l'ATCC sous le N° 33679 ;
 - de clones de *Bacillus thuringiensis var israelensis* de Barjac (sérotype H14)
- 5 déposé à l'ATCC sous le N° 35646 ;
- de clones de *Bacillus sphaericus* déposé à l'ATCC sous le N° 10208 ;
- comme stimulateur des défenses naturelles des plantes entières par application foliaire, racinaire ou par injection, contre les pathogènes des cultures des types fongiques et/ou bactériens et/ou viraux.
- 10 2- Procédé d'obtention de spores, de protéines ou de delta-endotoxines telles que définies dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) une phase de culture bactérienne consistant :
- à utiliser un milieu glucosé (UG) dont la composition est : KH_2PO_4 (6,8 g/l) – $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (1,123 g/l) – $\text{MnSO}_4, 4\text{H}_2\text{O}$ (2 mg/l) – $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (0,014 g/l) – $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$ (0,020 g/l) – $\text{CaCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$ (0,183 g/l), dans lequel sont ajoutés 0,75% (p/v) de peptone pancréatique et 1% (p/v) de glucose et dont le pH est ajusté à 7,4 ;
- 15 -à stériliser ledit milieu par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes ;
- àensemencer une pré-culture de spores en milieu UG pendant 15 heures à 30°C
- 20 sous agitation ;
- à placer les fioles contenant les bactéries à 30°C sous agitation rotative douce (200 rpm) jusqu'à la lyse complète des bactéries (de 48 à 72 heures) ;
- b) une phase de séparation des spores et des cristaux consistant :
- à la réaliser à la température de 4°C ;
- 25 - à centrifuger le contenu de chaque fiole à 4500 rpm pendant 30 minutes ;
- à reprendre le culot dans NaCl 1M et à le laver deux fois à l'eau distillée contenant 1 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride et 10 mM EDTA puis à le re-suspendre dans un volume d'eau déminéralisée ;
 - à purifier la partie protéique sur un gradient discontinu de sucrose selon la
- 30 méthode de Thomas et Ellar (1983) [ultracentrifugation à 25 000 rpm et 48°C pendant 16 heures] ;
- à déterminer la concentration en protéines par la méthode de Bradford après solubilisation alcaline de l'extrait et une électrophorèse en conditions dénaturantes

(SDS-PAGE) réalisée pour la détection des protéines selon la méthode déjà décrites par Thomas et Ellar (1983).

3- Composition comprenant des spores, des protéines ou des delta-endotoxines obtenues par la mise en œuvre du procédé selon la revendication 2, caractérisée en ce que celles-ci sont incorporées à un véhicule autorisé en agriculture de type mouillant et pénétrant.

4- Composition, selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme liquide, notamment sous la forme de solution aqueuse.

5- Composition, selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme solide, notamment sous la forme de poudres, granulés ou en enrobage de semences.

6- Utilisation d'une composition, telle que définie dans la revendication 3, 4 ou 5, pour réduire :

- lorsqu'elle est appliquée aux céréales, notamment le blé, le maïs et le riz, l'attaque des oïdiums, des septorioses, des rouilles, des fusarioses, des pyricularioses et des maladies bactériennes et virales ;
- lorsqu'elle est appliquée aux arbres fruitiers, notamment le poirier et le pommier, l'attaque des oïdiums, des tavelures, des monilioses, des maladies bactériennes et virales telles que la "Sharka" ;
- lorsqu'elle est appliquée à la vigne, l'attaque de l'oïdium, du mildiou, du *Botrytis*, des maladies du bois, des maladies telluriques et virales telles que le "Court-Noué" ;
- lorsqu'elle est appliquée aux gazons et en horticulture, les attaques des pythiacés, champignons à sclérotés, fusarioses, oïdiums, maladies bactériennes et virales ;
- lorsqu'elle est appliquée au soja, au tournesol, aux melons, aux carottes, au chou-fleur et aux pommes de terre, l'attaque des oïdiums, des mildious des pythiacées (*Phytophthora*, *Pythium*), des champignons à sclérotés (*Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Pyrenochaeta*), des champignons vasculaires (*Fusarium*, *Verticillium*), des maladies bactériennes et virales.

REVENDEICATIONS MODIFIEES
reçues par le Bureau international le 17 mai 2006 (17.05.06);
+ Déclaration

1- Utilisation de spores, de protéines ou de delta-endotoxines à structure hélicoïdales et / ou en feuillet β issues de clones de *Bacillus thuringiensis* ou de clones de *Bacillus sphaericus*, comme stimulateur des défenses naturelles des plantes entières par application foliaire, racinaire ou par injection, contre les pathogènes des cultures des types fongiques et/ou bactériens et/ou viraux.

2- Spores, protéines ou delta-endotoxines issues de clones de *Bacillus thuringiensis* selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'il s'agit des clones de *Bacillus thuringiensis var kurstaki* de Barjac et Lemille (sérotypage 3a et 3b) déposés à l'ATCC sous le numéro 33679.

3- Spores, protéines ou delta-endotoxines issues de clones de *Bacillus thuringiensis* selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'il s'agit des clones de *Bacillus thuringiensis var israelensis* de Barjac (sérotypage H14) déposés à l'ATCC sous le numéro 35646.

4- Spores, protéines ou delta-endotoxines issues de clones de *Bacillus sphaericus* selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'il s'agit des clones de *Bacillus sphaericus* déposés à l'ATCC sous le numéro 10208.

5- Composition comprenant des spores, des protéines ou des delta-endotoxines selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que celles-ci sont incorporées à un véhicule autorisé en agriculture de type mouillant et pénétrant.

6- Composition, selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme liquide, notamment sous la forme de solution aqueuse.

7- Composition, selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme solide, notamment sous la forme de poudres, granulés ou en enrobage de semences.

8- Utilisation d'une composition, telle que définie dans la revendication 5, 6 ou 7, pour réduire :

- lorsqu'elle est appliquée aux céréales, notamment le blé, le maïs et le riz, l'attaque des oïdiums, des septorioses, des rouilles, des fusarioses, des pyricularioses et des maladies bactériennes et virales ;

- lorsqu'elle est appliquée aux arbres fruitiers, notamment le poirier et le pommier, l'attaque des oïdiums, des tavelures, des monilioses, des maladies bactériennes et virales telles que la "Sharka" ;

- lorsqu'elle est appliquée à la vigne, l'attaque de l'oïdium, du mildiou, du *Botrytis*, des maladies du bois, des maladies telluriques et virales telles que le "Court-Noué" ;
- lorsqu'elle est appliquée aux gazons et en horticulture, les attaques des pythiacés, champignons à sclérotés, fusarioses, oïdiums, maladies bactériennes et virales ;
- 5 - lorsqu'elle est appliquée au soja, au tournesol, aux melons, aux carottes, au chou-fleur et aux pommes de terre, l'attaque des oïdiums, des mildious des pythiacées (*Phytophthora*, *Pythium*), des champignons à sclérotés (*Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Pyrenochaeta*), des champignons vasculaires (*Fusarium*, *Verticillium*), des maladies bactériennes et virales.

| |
|---|
| DECLARATION SELON L'ARTICLE 19.1 |
|---|

DEMANDE DE BREVET PCT/FR2005/003177**La demande examinée (PCT/FR2005/003177)**

La demande examinée concerne l'utilisation de spores, de protéines ou de delta-endotoxines issues de clones de *Bacillus thuringiensis* ou de clones de *Bacillus sphaericus*, comme stimulateur des défenses naturelles des plantes entières par application foliaire, racinaire ou par injection, contre les pathogènes des cultures des types fongiques et/ou bactériens et/ou viraux.

Les clones revendiqués possèdent une structure hélicoïdale et / ou en feuillet β qui a la particularité de se loger à l'intérieur des membranes cellulaires et de former un canal ionique ou pore qui modifie la perméabilité membranaire (dépolarisation), constituant un signal précoce pour le déclenchement de la cascade d'événements métaboliques amenant la résistance de la plante face à ses agresseurs.

Les documents cités

Aucun des documents cités ne fait état de telles particularités ni des moyens pour les obtenir.

Commentaires

Pour obtenir les produits de la demande examinée, la composition chimique des milieux de culture a fait l'objet d'expérimentations spécifiques.

Quant aux formulations d'exploitation, la recherche de l'action des défenses naturelles des cellules végétales, et non plus insecticides ou fongicides, ont fait également l'objet d'expérimentations spécifiques.

Toutes ces caractéristiques ne sont pas enseignées dans les documents cités.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2005/003177

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N63/02 A01P3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | <p>TRAVIS R. GLARE AND MAUREEN O'CALLAGHAN: "Environmental and health impacts of <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>" 'Online! July 1998 (1998-07), BIOCONTROL & BIODIVERSITY, GRASSLANDS DIVISION, AG RESEARCH, LINCOLN (NEW ZEALAND), XP002341828 Retrieved from the Internet: URL: http://www.moh.govt.nz/moh.nsf/0/FF3B628D67E34963CC256BA3000D8476/\$File/bti.pdf page 12 - page 13; table 1</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p> | 3-5 |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 March 2006

Date of mailing of the international search report

17/03/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Molina de Alba, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2005/003177

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>WO 97/05165 A (DJAVAKHIA, VITALI; BATCHIKOVA, NATALIA; KORPELA, TIMO; KHOMUTOV, RADII) 13 February 1997 (1997-02-13) abstract page 3, line 6 - page 4, line 2 examples 2,3,8,9</p> | 1-6 |
| X | <p>J.W. KLOPPER ET AL.: "Induced systemic resistance and promotion of plant growth by Bacillus spp." PHYTOPATHOLOGY, vol. 94, no. 11, November 2004 (2004-11), pages 1259-1266, XP001207080 abstract page 1261, column 1 page 1265, column 2</p> | 1-6 |
| X | <p>SHOUAN ZHANG AND M.S. REDDY: "Lack of induced systemic resistance in peanut to late spot disease byplant growth-promoting rhizobacteria and chemical elicitors" PLANT DISEASE, vol. 85, no. 8, August 2001 (2001-08), pages 879-884, XP009052743 abstract page 880, column 1, paragraph 2; table 1 page 883, column 1, paragraph 4; table 4</p> | 1-6 |
| A | <p>US 2003/228679 A1 (SMITH DONALD L ET AL) 11 December 2003 (2003-12-11) cited in the application abstract</p> | 1-6 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2005/003177

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date | | | | |
|---|------------------|-------------------------|---------------------------|---------------|----|------------|------|
| WO 9705165 | A | 13-02-1997 | AT 286070 T 15-01-2005 | | | | |
| | | | AU 6659896 A 26-02-1997 | | | | |
| | | | DE 69634137 D1 03-02-2005 | | | | |
| | | | DE 69634137 T2 29-12-2005 | | | | |
| | | | EP 0868431 A1 07-10-1998 | | | | |
| | | | FI 953688 A 03-02-1997 | | | | |
| | | | US 6528480 B1 04-03-2003 | | | | |
| <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">US 2003228679</td> <td style="width: 5%;">A1</td> <td style="width: 15%;">11-12-2003</td> <td style="width: 50%;">NONE</td> </tr> </table> | | | | US 2003228679 | A1 | 11-12-2003 | NONE |
| US 2003228679 | A1 | 11-12-2003 | NONE | | | | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2005/003177

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
A01N63/02 A01P3/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie* | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|------------|--|-------------------------------|
| X | <p>TRAVIS R. GLARE AND MAUREEN O'CALLAGHAN: "Environmental and health impacts of Bacillus thuringiensis israelensis" 'Online! juillet 1998 (1998-07), BIOCONTROL & BIODIVERSITY, GRASSLANDS DIVISION, AG RESEARCH, LINCOLN (NEW ZEALAND), XP002341828 Extrait de l'Internet: URL: http://www.moh.govt.nz/moh.nsf/0/FF3B628D67E34963CC256BA3000D8476/\$File/bti.pdf page 12 - page 13; tableau 1</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p> | 3-5 |

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"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

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 mars 2006

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

17/03/2006

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Molina de Alba, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2005/003177

| C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie* | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | <p>WO 97/05165 A (DJAVAKHIA, VITALI; BATCHIKOVA, NATALIA; KORPELA, TIMO; KHOMUTOV, RADII) 13 février 1997 (1997-02-13) abrégé page 3, ligne 6 - page 4, ligne 2 exemples 2,3,8,9</p> | 1-6 |
| X | <p>J.W. KLOPPER ET AL.: "Induced systemic resistance and promotion of plant growth by Bacillus spp." PHYTOPATHOLOGY, vol. 94, no. 11, novembre 2004 (2004-11), pages 1259-1266, XP001207080 abrégé page 1261, colonne 1 page 1265, colonne 2</p> | 1-6 |
| X | <p>SHOUAN ZHANG AND M.S. REDDY: "Lack of induced systemic resistance in peanut to late spot disease byplant growth-promoting rhizobacteria and chemical elicitors" PLANT DISEASE, vol. 85, no. 8, août 2001 (2001-08), pages 879-884, XP009052743 abrégé page 880, colonne 1, alinéa 2; tableau 1 page 883, colonne 1, alinéa 4; tableau 4</p> | 1-6 |
| A | <p>US 2003/228679 A1 (SMITH DONALD L ET AL) 11 décembre 2003 (2003-12-11) cité dans la demande abrégé</p> | 1-6 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2005/003177

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | | Date de publication |
|---|----|------------------------|---|-------------|------------------------|
| WO 9705165 | A | 13-02-1997 | AT | 286070 T | 15-01-2005 |
| | | | AU | 6659896 A | 26-02-1997 |
| | | | DE | 69634137 D1 | 03-02-2005 |
| | | | DE | 69634137 T2 | 29-12-2005 |
| | | | EP | 0868431 A1 | 07-10-1998 |
| | | | FI | 953688 A | 03-02-1997 |
| | | | US | 6528480 B1 | 04-03-2003 |
| <hr/> | | | | | |
| US 2003228679 | A1 | 11-12-2003 | AUCUN | | |
| <hr/> | | | | | |