



Procédé de préparation d'acides dicaféoylquiniques et de leur utilisation dans la lutte contre les pucerons

Jean-Luc Poessel, Marie-Helene Collet, Yvan Rahbé

► To cite this version:

Jean-Luc Poessel, Marie-Helene Collet, Yvan Rahbé. Procédé de préparation d'acides dicaféoylquiniques et de leur utilisation dans la lutte contre les pucerons. N° de brevet: WO 2009/095624 A2. 2009, 35 p. + annexes. hal-02820709

HAL Id: hal-02820709

<https://hal.inrae.fr/hal-02820709>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

(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
6 août 2009 (06.08.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/095624 A2

(51) Classification internationale des brevets :
A01N 37/38 (2006.01) A01N 37/36 (2006.01)
C07C 51/42 (2006.01) A01P 7/04 (2006.01)

(74) Mandataire : GROSSET-FOURNIER, Chantal; Gros-
set-Fournier & Demachy S.A.R.L., 54, rue Saint-Lazare,
F-75009 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2009/050137

(22) Date de dépôt international :
30 janvier 2009 (30.01.2009)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
08/00561 1 février 2008 (01.02.2008) FR

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

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147, rue de l'Université,
F-75338 Paris Cedex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : POËSSEL,
Jean-Luc [FR/FR]; 1464, route de Saint Saturnin, F-84250
Le Thor (FR). COLLET, Marie-Hélène [FR/FR]; 5, clos
des Hermas, F-84450 Saint Saturnin Les Avignon (FR).
RAHBE, Yves, Noël, Elie (prénom d'usage Yvan)
[FR/FR]; 85, rue des Charmettes, F-69100 Villeurbanne
(FR).

(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), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, 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 :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

(54) Title: METHOD FOR PREPARING DICAFFEOYLQUINIC ACIDS AND USE THEREOF IN COMBATING APHIDS

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION D'ACIDES DICAFFEOYLQUINIQUES ET LEUR UTILISATION DANS LA LUTTE
CONTRE LES PUCERONS

(57) Abstract: Method for preparing 3,5-dicaffeoylquinic acid and certain derivatives thereof, and use thereof in the preparation of
plant-protection products. Method for combating aphids using 3,5-dicaffeoylquinic acid and certain derivatives thereof.

(57) Abrégé : Procédé de la préparation de l'acide 3,5-dicaféoylquinique, et de certains de ses dérivés, et leur utilisation dans la
préparation de produits phytosanitaires. Procédé de lutte contre les pucerons utilisant l'acide 3,5-dicaféoylquinique, et de certains de
ses dérivés.



WO 2009/095624 A2

PROCEDE DE PREPARATION D'ACIDES DICAFAEYOYLQUINIQUES ET LEUR UTILISATION DANS LA LUTTE CONTRE LES PUCERONS

La présente invention a pour objet la préparation de l'acide 3,5-dicaféoylquinique, et de certains de ses dérivés, et leur utilisation dans la préparation de produits phytosanitaires.

L'acide 3,5-dicaféoylquinique (3,5-diCQ) et ses différents dérivés ont été identifiés chez de nombreuses espèces d'intérêt agronomique appartenant à différentes familles botaniques (rosacées dont les arbres fruitiers à pépins et à noyau ; solanacées dont la tomate et la pomme de terre ; astéracées dont le tournesol, l'artichaut et la laitue ; rubiacées dont le café ; convolvulacées dont la patate douce....).

Plusieurs centaines de publications décrivent la présence de ces substances chez ces différentes espèces et mettent en évidence leurs propriétés chimiques et biologiques.

Ces composés présentent une forte activité antioxydante, qui leur confère un grand intérêt d'un point de vue nutritionnel (Ohnishi et al, (1994) *Phytochemistry*, **36**: 579-583 ; Iwai et al, (2004) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 4893-4898 ; Kim & Lee, (2005) *Planta Medica*, **71**: 871-876 ; Saito et al ; (2005) *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **13**: 4191-4199).

Ils montrent également de multiples propriétés médicinales, entre autres en tant qu'analgésiques (dos Santos et al, (2005) *Journal of Ethnopharmacology* **96**: 545-549), antihypertenseurs (Mishima et al, (2005a) *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **28**: 1909-1914), hypouricémiants (Nguyen et al, (2005) *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **28**: 2231-2234), hépatoprotecteurs (Basnet et al, (1996) *Biol Pharm Bull* **19**: 1479-1484), anti-inflammatoires (Peluso et al, (1995) *Journal of Natural Products* **58**: 639-646) et anticancéreux (Mishima et al, (2005b) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13**: 5814-5818).

Ces composés sont présents dans des préparations utilisées en médecine traditionnelle, dans des extraits végétaux actuellement commercialisés (extraits à base d'artichaut ou d'échinacée) et dans la propolis (Mishima et al, (2005a) *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **28**: 1909-1914 ; Mishima et al, (2005b) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13**: 5814-5818 ; Basnet et al, (1996) *Biol Pharm Bull* **19**: 1479-1484). Ils possèdent également d'importantes propriétés anti-infectieuses, notamment antivirales. Ils constituent une nouvelle classe d'antirétrovirus, en particulier pour le traitement du SIDA, par leur action inhibitrice sur l'intégrase du HIV (Mahmood et al, (1993) *Antiviral Chem.*

Chemother. **4**: 235-240 ; Mc Dougall et al, (1998) Antimicrobial Agents & Chemotherapy **42**: 140-146 ; Zhu et al, (1999) J Virol **73**: 3309-3316).

Le brevet EP1008344 décrit l'utilisation de ce groupe de molécules dans le traitement de l'hépatite B, la demande internationale WO2006127525 leur utilisation dans le traitement du sida, la demande japonaise JP2006213636 préconise l'utilisation de ce groupe de molécules dans le traitement de cancers, la demande EP0577516 décrit des compositions dermatologiques dépigmentantes qui les contiennent et la demande EP1312373 évoque leurs effets anti-allergiques.

Les propriétés fongicides de ces molécules ont également été fréquemment montrées (Bazzalo et al, (1985) Phytopathologische Zeitschrift **112**: 322-332 ; Kodoma et al, (1998) Phytochemistry **47**: 371-373 ; Stange et al, (2001) Postharvest Biology & Technology **23**: 85-92).

En revanche, les propriétés insecticides ont été beaucoup plus rarement étudiées et les résultats sont très discordants. Bien que certains auteurs aient établi une corrélation entre la teneur élevée en diCQ des racines de cultivars de laitue et leur résistance à un aphidé (*Pemphigus bursarius*), ils n'ont jamais montré l'activité biologique directe de ces molécules vis à vis de l'insecte (Cole et al. (1984) Annals of Applied Biology **105**: 129-145). D'autres auteurs ont montré que certains dérivés présentaient peu ou pas d'activité insecticide chez des insectes broyeurs (Beninger et al, (2004) J Chem Ecol **30**: 589-605 ; Schwarz et al 1996). Certains auteurs ont même montré un effet phagostimulant de 3,5-diCQ sur des insectes broyeurs (Tamura et al. (2004) ; Mullin et al (1991) ;

Le pêcher *Prunus persica* (L.) Batsch (Rosacées), arbre particulièrement bien adapté au climat méditerranéen, est principalement cultivé en Chine, en Amérique du nord (Californie), en Amérique du sud (Chili et Argentine) et en Europe dans les pays du pourtour du Bassin Méditerranéen où les principaux centres de culture sont l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la France. En 2004, la production mondiale de pêches était de 15,6 millions de tonnes, répartie sur une surface de 1,4 millions d'hectares. La production française cette même année était de 413 000 tonnes produites principalement le long de la Vallée du Rhône, en Provence, dans le Roussillon et le long de la Vallée de la Garonne. Cette culture représente pour ces régions méridionales un enjeu économique incontestable.

Cependant, le pêcher peut être la cible de nombreuses attaques parasitaires d'origine animale ou microbienne. Les principaux pathogènes et ravageurs dont l'hôte est le pêcher sont des champignons: l'oïdium (*Sphaerotheca pannosa*), la cloque (*Taphrina*

deformans) et la moniliose (*Monilinia laxa*, *M. fructigena* et *M. fructicola*); des bactéries pouvant provoquer un dépérissement (*Xanthomonas arboricola* pathovar *pruni*) et de nombreux insectes et virus.

Une attaque particulièrement préoccupante est celle du puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* (Sulzer). Cet insecte piqueur suceur est particulièrement nuisible, non seulement par les dégâts directs qu'il occasionne mais aussi parce qu'il est un vecteur potentiel du Plum Pox Virus, agent causal de la maladie de la Sharka, qui provoque des déformations ainsi que des décolorations des fruits, les rendant alors non commercialisables. Aucun moyen de lutte curative n'étant disponible, les arbres infectés doivent être arrachés.

Pour lutter contre ce parasite, l'agriculteur se trouve alors confronté à deux problématiques :

- la lutte chimique contre le puceron vert qui exige des insecticides puissants (souvent nocifs et toxiques) et dont l'efficacité est par ailleurs aléatoire, entraînant un risque d'apparition de résistance chez *Myzus persicae* (Guillemaud et al, (2003) Bulletin of Entomological Research **93**, 289-297) et
- la prise en compte du souci de l'environnement, qui vise par ailleurs à réduire les intrants phytosanitaires.

Cette problématique a amené généticiens et entomologistes à chercher à améliorer la résistance du pêcher vis-à-vis de *Myzus persicae*.

Le puceron vert du pêcher appartient à l'ordre des Hémiptères et à la famille des Aphididae. Il mesure de 1,2 à 2,5 mm de long. C'est un puceron phytophage qui se nourrit de sève élaborée, prélevée au niveau du phloème par des pièces buccales de type piqueur-suceur (Hullé et al, (1998) dans ACTA et INRA éditions, 77 pages).

Le cycle annuel de *Myzus persicae*, sous climat tempéré, se compose d'une phase de reproduction sexuée, conduisant à la ponte d'un œuf d'hiver diapausant, suivie d'une phase de reproduction parthénogénétique (cycle complet ou holocyclie). Ces deux phases ont lieu sur des plantes hôtes différentes (cycle dioécique), appelées respectivement hôte primaire (le pêcher) et hôte secondaire (plantes herbacées dont certaines ont une importance économique majeure : pomme de terre, choux, aubergine, betterave...).

Les œufs d'hiver pondus à la base des bourgeons de pêcher éclosent de fin janvier à fin avril, lors du débourrement et donnent des femelles parthénogénétiques aptères, les fondatrices. Ces fondatrices sont à l'origine de plusieurs générations de femelles parthénogénétiques, les *fondatrigènes* sur l'hôte primaire. Dès la fin du printemps et en

été, lorsqu'il y a surpopulation sur le pêcher, les *fondatrigenes* donnent naissance à des individus ailés qui colonisent leur hôte secondaire. Ces individus ailés engendreront par reproduction asexuée plusieurs générations d'aptères ou d'ailés, les *virginogènes*, qui à l'automne donneront des individus mâles et femelles sexués et ailés, les *sexupares*. Ces individus retourneront sur le pêcher pour pondre les œufs d'hiver (Hullé et al, (1998) déjà cité ; Sauge, (1999) Analyse des mécanismes de résistance du pêcher *Prunus persica* (L.) Batsch au puceron vert Thèse Université Pierre et Marie Curie (Paris 6) 188 pages).

Les dégâts directs causés par ce puceron sont dus aux piqûres alimentaires de celui-ci qui provoquent le dessèchement des bourgeons, la chute des fleurs, des déformations du feuillage et des jeunes pousses, perturbent la croissance et peuvent induire des réactions nécrotiques (Massonié et al, (1979) Revue de zoologie agricole et pathologie végétale 78, 1-5 ; Monet et Massonié, (1994) Agronomie 2 177-182 ; Monet et Guye, (1998) in Monet R. (Ed) Proc. Fourth Intern. Peach Symposium Acta Hort 171-175). De plus, *Myzus persicae*, comme mentionné précédemment, est un vecteur du plum pox virus (provoquant la maladie de la sharka), appartenant au groupe des potyvirus qui provoquent des dégâts indirects, décolorations des feuilles et des déformations des fruits.

Compte tenu de ce qui précède il est nécessaire de trouver de nouveaux traitements pour lutter de manière efficace mais respectueuse de l'environnement contre les pucerons, notamment le puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*).

Or, les inventeurs ont mis en évidence l'effet répulsif et toxique du 3,5-diCQ et de certains de ses dérivés sur différentes espèces de pucerons.

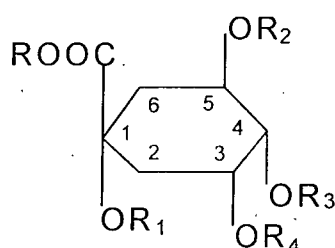
Cependant, le 3,5-diCQ et ses isomères, à part le 1,3-diCQ (ou cynarine), isolée de l'artichaut, ne sont pas aisément disponibles commercialement. Aussi ces composés doivent-ils être extraits de différents végétaux. Outre l'artichaut, on peut citer le café (EP0299107) et le tournesol chez qui on a décrit la surproduction de composés phénoliques et plus particulièrement d'acides dicaféoylquiniques en utilisant un éliciteur biotique, le pathogène *Sclerotinia* (EP1671535).

Il existe donc un besoin important de développer des procédés d'obtention de 3,5-diCQ et de ses dérivés faciles à mettre en œuvre et présentant un fort rendement.

Les inventeurs ont donc cherché à purifier cette molécule en quantité suffisante. L'isolement du 3,5-diCQ et ses dérivés à partir du pêcher n'apparaissait pas satisfaisant en raison des teneurs relativement faibles de la substance et de la présence de nombreux composés phénoliques pouvant entraver la purification (figure 1). En revanche *Ipomoea batatas* (convolvulacées), dont la composition phénolique a été étudiée en particulier dans

le tubercule comestible (patate douce) et les feuilles par des équipes japonaises (Islam *et al*, (2002) Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**: 3718-3722 ; Islam *et al* (2003) Journal of Food Science 68: 111-116) s'est révélée être une source prometteuse. Les racines non tubérisées d'*Ipomoea batatas* ont révélé une teneur importante en 3,5-diCQ (environ 15 mg par g de matière sèche) et une faible teneur en formes isomères contaminantes (figure 2). Ces teneurs sont particulièrement importantes dans des conditions de carence minérale, en particulier en azote, et de culture des racines à la lumière. Les teneurs peuvent atteindre 90 mg par g de matière sèche en culture sur eau distillée à la lumière.

Aussi la présente invention a pour objet un procédé de préparation de composés de formule (I)



dans laquelle

- R représente un atome d'hydrogène ou un groupement méthyle,
- R₁, R₂ et R₄ représentent chacun indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupe caféoyle et
- R₃ représente un hydrogène, un groupe caféoyle ou un groupe succinyle, à condition que deux au moins parmi R₁ à R₄ représentent un groupe caféoyle, et que R₃ représente un groupement succinyle seulement si R₂ et R₄ représentent un groupe caféoyle,

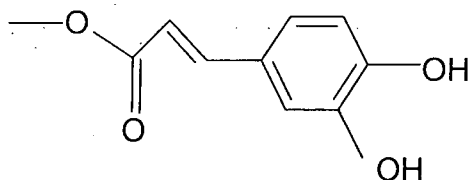
à partir de racines non tubérisées comprenant les étapes suivantes :

- a) prélèvement des racines non tubérisées ou récupération de l'exsudat racinaire,
- b) extraction par un ou plusieurs solvants organiques des composés phénoliques,
- c) récupération de l'extrait brut,
- d) purification éventuelle dudit extrait obtenu à l'étape c),
- e) optionnellement, isomérisation spontanée dudit extraits en condition de pH alcalin, lesdits composés de formule (I) pouvant être sous la forme de régio ou stéréoisomères, ou de leurs mélanges

On entend par racine non tubérisée une racine de structure normale, excluant les parties présentant le phénomène de tubérisation qui se caractérise par l'accumulation de

réserves et l'épaississement de la racine et conduit à la formation d'un tubercule consommable. Dans le cas d'*Ipomoea batatas*, le tubercule consommable est couramment dénommé patate douce.

On entend par groupement caféoylo le groupement représenté par la formule suivante



Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, ces composés sont extraits de la racine non tubérisée d'une plante, notamment d'une plante du genre *Ipomoea* (convolvulacées) ou des genres de la même famille *Argyreia*, *Calycobolus*, *Calystegia*, *Convolvulus*, *Dichondra*, *Erycibe*, *Evolvulus*, *Iseia*, *Jacquemontia*, *Maripa*, *Merremia*, *Mina*, *Operculina*, *Porana*, *Stictocardia*, ou *Turbina*. Outre *Ipomoea batatas*, le genre *Ipomoea* comprend environ 500 espèces dont des plantes ornementales comme le volubilis (*Ipomoea purpurea*) ou d'usage alimentaire comme le KangKong ou liseron d'eau (*Ipomoea aquatica*) consommé en Asie. Le genre *Convolvulus* comprend environ 250 espèces dont le liseron des champs (*Convolvulus arvensis*) et la belle de jour (*Convolvulus tricolor*). Le genre *Calystegia* comprend environ 25 espèces dont le liseron des haies (*Calystegia sepia*) et le liseron des bois (*Calystegia silvatica*).

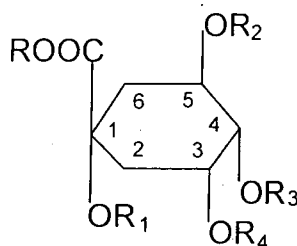
Particulièrement, l'acide 3,5-dicaféoylquinique et ses dérivés sont extraits des racines non tubérisées d'une plante choisie dans le groupe comprenant la patate douce (*Ipomoea batatas*), le volubilis (*Ipomoea purpurea*), le liseron d'eau (*Ipomoea aquatica*), le volubilis des jardins (*Ipomoea indica*), l'Ipomée Scarlett O'Hara (*Ipomoea nil*) et le liseron des haies (*Calystegi sepium*).

Dans un mode avantageux de réalisation du procédé de l'invention, l'acide 3,5-dicaféoylquinique et ses dérivés sont extraits des racines non tubérisées d'*Ipomoea batatas*.

Les racines non tubérisées d'*Ipomoea batatas* peuvent être produites à partir de semis, de boutures, de marcottes ou de tubercules, cultivés en culture hydroponique selon la technique décrite dans la demande internationale WO 01/33942, sur substrat horticole ou en pleine terre, avantageusement en condition de carence minérale. Elles peuvent être récoltées dès que leur quantité est suffisante pour procéder à une extraction du 3,5-diCQ.

Avantageusement, les racines non tubérisées sont produites par culture en milieu liquide, à la lumière et en situation de carence minérale.

Dans un mode avantageux de l'invention, les composés de formule (I),



qui sont préparés, sont choisis parmi l'acide 3,5-dicaféoylquinique (3,5-diCQ), les différentes formes isomères de 3,5-diCQ, notamment la cynarine (1,3-diCQ), l'acide 1,5-dicaféoylquinique (1,5-diCQ), l'acide 3,4-dicaféoylquinique (3,4-diCQ) et l'acide 4,5-dicaféoylquinique (4,5-diCQ), ses analogues triacylés comme l'acide 3,4,5-tricaféoylquinique (3,4,5-triCQ), ses analogues méthylés comme le méthyle 3,5-dicaféoylquininate, le méthyle 3,4-dicaféoylquininate, le méthyle 4,5-dicaféoylquininate, l'acide 4-succinyl-3,5-dicaféoylquinique.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, le procédé de préparation des composés de formule (I), notamment de l'acide 3,5-dicaféoylquinique comprend les étapes suivantes :

- a) prélèvement des racines d'*Ipomoea batatas*, issues de tubercules, boutures, semis ou marcottes,
- b) congélation dans l'azote liquide des racines prélevées à l'étape a),
- c) lyophilisation des racines congelées à l'étape b),
- d) broyage dans l'azote liquide des racines lyophilisées puis lyophilisation pour obtenir une poudre sèche,
- e) extraction des composés phénoliques par un solvant organique en 1 à 4 fois, par agitation à froid,
- f) rinçage du dernier résidu de l'étape e) par le même solvant organique que celui utilisé à l'étape e) puis évaporation du solvant présent dans l'extrait jusqu'à obtention d'une phase aqueuse,
- g) optionnellement, extraction liquide/liquide volume à volume par un solvant apolaire, par plusieurs extractions successives après addition d'un sel et d'un acide dans la phase aqueuse pour faciliter l'extraction des diCQ dans le solvant apolaire,

h) concentration à sec de la phase aqueuse obtenue à l'étape f) ou de la phase organique obtenue à l'étape optionnelle g) après adjonction d'un agent de séchage pour éliminer l'eau résiduelle et filtration, puis reprise du résidu sec par un solvant organique,

i) séparation par CLHP semi-préparative en phase inverse et collecte de la fraction contenant le 3,5-diCQ,

j) concentration de la fraction obtenue à l'étape i) jusqu'à l'obtention d'une phase aqueuse,

k) extraction liquide/liquide par un solvant organique (volume à volume) par plusieurs extractions successives après addition d'un sel, dans la phase aqueuse pour faciliter l'extraction dans le solvant apolaire de 3,5 diCQ,

l) concentration à sec de la phase organique, après adjonction d'un agent de séchage, et filtration pour éliminer l'eau résiduelle, et reprise par un solvant organique,

m) précipitation au froid de la molécule par ajout d'eau (au moins 3 volumes pour 1 volume de solvant organique utilisé à l'étape précédente), congélation de l'extrait dans l'azote liquide et lyophilisation pour obtenir la molécule sous forme de poudre sèche.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, les solvants organiques utilisés à l'étape e) sont ceux classiquement utilisés dans l'extraction des plantes ; ils sont notamment choisis dans le groupe comprenant l'éthanol, le méthanol, et l'acétone, ces solvants pouvant être mélangés avec de l'eau, comme par exemple l'éthanol à 70% utilisé dans l'exemple 1.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, l'étape g) est réalisée par extraction par l'acétate d'éthyle ou le diéthyléther (volume à volume) après addition de NaCl ou de sulfate d'ammonium (de 8 % à saturation) et d'acide métaphosphorique 1-2% poids/volume final); selon des protocoles adaptés de Macheix (1974) Thèse Doctorat Sciences Naturelles, Université Paris, VI, 168 p..

Les étapes d'évaporation des solvants sont réalisées par toute technique classiquement utilisées, notamment à l'aide d'un évaporateur rotatif et l'agent de séchage utilisé aux étapes h) et l) est avantageusement du sulfate de sodium anhydre.

Le solvant organique utilisé à l'étape h) est en général celui utilisé pour la chromatographie semi-préparative de l'étape i) et est avantageusement du méthanol de pureté CLHP.

La chromatographie semi-préparative de l'étape i) est réalisée avantageusement sur colonne C18 par un gradient eau acidifiée à pH 2,6/méthanol.

Le procédé selon l'invention permet d'obtenir l'acide 3,5-dicaféoylquinique avec une pureté supérieure à 90 % avantageusement comprise entre 93 et 95 %. Les substances contaminantes sont essentiellement des isomères du 3,5-diCQ.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, pour mieux conserver lors de l'extraction, les formes isomères natives présentes initialement dans les tissus végétaux, l'ensemble des étapes a) à m) est réalisé à froid, de préférence à une température comprise entre 3 et 5 °C, à l'abri d'une exposition prolongée à la lumière et le pH acide des solvants aqueux est de préférence compris entre 5,0 et 6,0.

Les acides 3,4-dicaféoylquinique (3,4-diCQ) et 4,5-dicaféoylquinique (4,5-diCQ) peuvent être facilement produits à partir de l'acide 3,5-dicaféoylquinique par isomérisation spontanée en condition de pH alcalin. Ainsi l'isomérisation du 3,5-diCQ peut être réalisée dans un tampon Tris-HCl (50 mM) pH 8,5 pendant 2 heures à 40°C selon une méthode adaptée de Hanson (1965) Biochemistry 4: 2719-2731, et Moller et Herrmann (1982) Journal of Chromatography 241 : 371-379. Dans ces conditions les trois formes isomères sont présentes en teneurs comparables et peuvent être séparées par CLHP semi-préparative selon un protocole identique à celui décrit précédemment pour la purification du 3,5-diCQ.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un composé de formule (I) ou de leur mélange pour lutter contre les pucerons.

Selon l'invention, les composés de formule (I) sont utilisés sous forme de composition comprenant une quantité efficace desdits composés.

Au sens de composition comprenant une quantité efficace d'au moins un composé choisi parmi l'acide 3,5-dicaféoylquinique (3,5-diCQ), les différentes formes isomères de 3,5-diCQ, notamment la cynarine (1,3-diCQ), l'acide 1,5-dicaféoylquinique (1,5-diCQ), l'acide 3,4-dicaféoylquinique (3,4-diCQ) et l'acide 4,5-dicaféoylquinique (4,5-diCQ), ses analogues triacylés comme l'acide 3,4,5-tricaféoylquinique (3,4,5-triCQ), ses analogues méthylés comme le méthyl 3,5-dicaféoylquininate, l'acide 4-succinyl-3,5-dicaféoylquinique, on entend soit des extraits bruts, soit des extraits purifiés, lesdits extraits pouvant être sous forme liquide ou solide, soit toutes préparations contenant lesdits extraits.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, le mélange préféré est le mélange de 3,5-diCQ, 3,4-diCQ et 4,5-diCQ.

Les compositions utilisées dans le procédé selon l'invention comprennent au moins un acide dicaféoylquinique, ses analogues triacylés, ses analogues méthylés, l'acide 4-succinyl-3,5-dicaféoylquinique ou un mélange de ceux-ci à une concentration comprise entre 0,01 et 5 mM, avantageusement entre 0,1 et 2 mM, plus avantageusement entre 0,25 et 1 mM.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, les pucerons sont choisis dans le groupe comprenant *Myzus persicae* (puceron vert du pêcher), *Myzus varians* (puceron cigarier du pêcher), *Myzus cerasi* (puceron noir du cerisier), *Brachycaudus persicae* (puceron noir du pêcher), *Aphis pomi* (puceron vert non migrant du pommier), *Brachycaudus helichrysi* (puceron vert du prunier), *Hyalopterus pruni* (puceron farineux du prunier), *Dysaphis plantaginea* (puceron cendré du pommier), *Dysaphis pyri*, puceron cendré (ou mauve) du poirier, *Aphis gossypii* (puceron du cotonnier ou du melon), *Acyrtosiphum pisum* (puceron du pois), *Macrosiphum euphorbiae* (puceron rose et vert de la pomme de terre), *Aphis spiraecola* (= *A. citricola*) (puceron vert des Citrus), *Aphis fabae* (puceron noir de la fève), *Rhopalosiphum maidis* (puceron vert du maïs), *Rhopalosiphum padi* (puceron du merisier à grappe), *Sitobion avenae* (Puceron des épis de céréales), *Diuraphis noxia* (puceron russe du blé), *Brevicoryne brassicae* (puceron cendré du chou), *Eriosoma lanigerum* (puceron lanigère du pommier), *Nasonovia ribisnigri* (puceron de la laitue), *Amphorophora idaei* (puceron du framboisier), *Toxoptera aurantii* (puceron noir des citrus et puceron du caféier), *Elatobium abietinum* (puceron vert de l'épicéa) et *Pemphigus bursarius* (puceron de la laitue).

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, le puceron est *Myzus persicae* (puceron vert du pêcher).

Les compositions utilisées dans le procédé selon l'invention sont appliquées sur les pucerons ou sur un endroit habité par lesdits pucerons.

La présente invention a également pour objet un procédé de lutte contre le puceron comprenant l'application d'au moins un composé de formule (I) ou leur mélange sur les pucerons ou sur un endroit habité par lesdits pucerons.

Les exemples 1 à 6 et les figures 1 à 24 qui suivent illustrent l'invention.

La figure 1 représente le chromatogramme CLHP à 330 nm d'un extrait d'apex de pêcher (5 CQ : acide 5-caféoylquinique ou acide chlorogénique, précurseur métabolique

du 3,5-diCQ). Les pics a, b et c représentent respectivement l'acide chlorogénique, le témoin interne et le 3,5-diCQ. Chaîne d'analyse CLHP KONTRON : 2 pompes micro 420, injecteur-passeur d'échantillons 460, détecteur UV double longueur d'onde 430. Pilotage et acquisition par logiciel DIAMIR. Colonne MERCK LiChro CART 250-4 – Superspher 100 RP18 endcapped, longueur 250 mm, diamètre 4 mm, placée dans un four thermostaté à 30°C. Phase mobile : solvant A : eau ultrapure acidifiée à pH 2,6 avec de l'acide orthophosphorique, solvant B : méthanol qualité CLHP. Injection : 10µl d'extrait solubilisé dans du méthanol, filtré sur membrane PTFE 0,45µm. détection à 330 et 280 nm.

Le gradient d'élution est le suivant :

	Temps (min)	Débit ml/min	% A	% B
Acquisition	0,00	0,5	97	3
	5,00	0,5	97	3
	13,00	0,5	92	8
	23,00	0,5	88	12
	30,00	0,5	88	12
	33,00	0,5	87	13
	38,00	0,5	87	13
	40,00	0,5	86	14
	46,00	0,5	86	14
	50,00	0,5	84	16
	55,00	0,5	84	16
	57,00	0,5	83	17
	67,00	0,5	83	17
	82,00	0,5	81	19
	87,00	0,5	79	21
	95,00	0,5	79	21
	105,00	0,5	77	23
	107,00	0,5	77	23
	109,00	0,7	77	23
	115,00	0,7	77	23
	170,00	0,7	40	60
	171,00	0,7	40	60
	173,00	0,5	40	60
	175,00	0,5	40	60
Rinçage	180,00	0,5	97	3
	210,00	0,5	97	3

Dans ces conditions, le temps de rétention du 3,5-diCQ est d'environ 142 min.

La figure 2 représente différents chromatogrammes CLHP de certains extraits.

La figure 2A représente le chromatogramme CLHP à 330 nm d'un extrait de racines d'*Ipomoea batatas* non tubérisées (5 CQ : acide 5-caféoylquinique ou acide

chlorogénique). Conditions CLHP sont identiques à celles de la figure 1. Les pics a, b et c représentent respectivement l'acide chlorogénique, le témoin interne et le 3,5-diCQ.

La figure 2B représente le chromatogramme CLHP à 280 nm d'un extrait de racines d'*Ipomoea aquatica* non tubérisées. Conditions CLHP sont identiques à celles de la figure 1. Les pics a, b, c et d représentent respectivement l'acide chlorogénique, le témoin interne, le 3,4-diCQ et le 3,5-diCQ.

La figure 2C représente le chromatogramme CLHP à 280 nm d'un extrait de racines d'*Ipomoea indica* non tubérisées. Conditions CLHP sont identiques à celles de la figure 1. Les pics a, b et c représentent respectivement l'acide chlorogénique, le témoin interne et le 3,5-diCQ.

La figure 2D représente le chromatogramme CLHP à 280 nm d'un extrait de racines de *Calystegia sepium* non tubérisées. Conditions CLHP sont identiques à celles de la figure 1. Les pics a, b, c, d et e représentent respectivement l'acide chlorogénique, le témoin interne, le 3,4-diCQ, le 3,5-diCQ et 4,5-diCQ.

La figure 2E représente le chromatogramme CLHP à 280 nm d'un extrait de racines d'*Ipomoea nil* variété « Scarlett O'hara » non tubérisées. Conditions CLHP sont identiques à celles de la figure 1. Les pics a, b et c représentent respectivement l'acide chlorogénique, le témoin interne et le 3,5-diCQ.

La figure 3 représente le chromatogramme CLHP à 330 nm du 3,5-diCQ purifié de racines d'*Ipomoea batatas* non tubérisées. 3,4-diCQ, a et b sont des isomères de 3,5-diCQ. Chaîne d'analyse CLHP KONTRON : 2 pompes micro 420, injecteur-passeur d'échantillons 460, détecteur UV double longueur d'onde 430. Pilotage et acquisition par logiciel DIAMIR. Colonne MERCK LiChro CART 250-4 -Superspher 100 RP18 endcapped, longueur 250 mm, diamètre 4 mm, placée dans un four thermostaté à 30°C. Phase mobile : solvant A : eau ultrapure acidifiée à pH 2,6 avec de l'acide orthophosphorique, solvant B : méthanol qualité CLHP. Injection : 10µl d'extrait solubilisé dans du Méthanol, filtré sur membrane PTFE 0.45µm. détection à 330 et 280 nm.

Gradient d'élution :

	Temps (min)	Débit ml/min	%A	% B
Acquisition	0,00	0,7	65	35
	1,00	0,7	65	35
	23,00	0,7	62	38
	30,00	0,7	62	38
	35,00	0,7	0	100

	40,00	0,7	0	100
Equilibration	41,00	0,7	65	35
	51,00	0,7	65	35

Dans ces conditions le 3,5-diCQ est élué à un temps de 18 à 20 min.

La figure 4 illustre l'influence des conditions de culture sur la quantité de matière sèche racinaire produite (MS), la teneur en 3,5-diCQ des racines et la quantité par bouture de 3,5-diCQ produite dans les racines après 4 semaines de culture (moyenne de 5 boutures) (exemple 2, expérimentation A).

La figure 5 représente l'influence des conditions de culture sur (A) la quantité de matière sèche racinaire produite, (B) la teneur en 3,5-diCQ des racines et (C) la quantité par bouture de 3,5-diCQ racinaire produite après 4 semaines de culture (moyenne de 5 boutures). Les conditions de culture des boutures sont indiquées dans le tableau I de l'exemple 2 (expérimentation A). Les barres verticales représentent l'écart-type. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test de Tukey).

La figure 6 illustre l'influence des conditions de carence minérale (azotée et phosphatée) sur la quantité de matière sèche racinaire produite, la teneur en 3,5-diCQ des racines et la quantité par bouture de 3,5-diCQ produite dans les racines après 3 semaines de culture (moyenne de 3 boutures) (exemple 2, expérimentation B).

La figure 7 représente l'influence des conditions de carence minérale (azotée et phosphatée) sur (A) la quantité de matière sèche racinaire produite, (B) la teneur en 3,5-diCQ des racines et (C) la quantité par bouture de 3,5-diCQ racinaire produite après 3 semaines de culture (moyenne de 3 boutures) (expérimentation B). Les conditions de culture des boutures sont indiquées dans le tableau II de l'exemple 2. Les barres verticales représentent l'écart-type. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test de Tukey).

La figure 8 illustre la mise au point d'un système de production de racines par marcottage. Elle représente l'influence des milieux de bouturage et de marcottage sur la quantité de matière sèche produite, la teneur en 3,5-diCQ et la quantité par plant de 3,5-diCQ de racines issues de boutures (4 semaines de culture) et de marcottes (2 semaines de culture) (moyenne de 3 boutures).

La figure 9 illustre la mise au point d'un système de production de racines par marcottage. Elle représente l'influence des milieux de bouturage et de marcottage sur (A) la quantité de matière sèche produite, (B) la teneur en 3,5-diCQ et (C) la quantité par plant de 3,5-diCQ de racines issues de boutures (4 semaines de culture) et de marcottes (2

semaines de culture) (moyenne de 3 boutures). Les conditions de culture des plants sont indiquées dans le tableau IV de l'exemple 3. Les milieux de culture sont l'eau distillée ou la solution minérale complète à 6 mM d'azote (composition dans le Tableau III de l'exemple 2). Les barres verticales représentent l'écart-type. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test de Tukey).

La figure 10 donne la composition du milieu de base dit Ap3 utilisé dans les exemples 2 et 3.

La figure 11 illustre le dispositif utilisé pour évaluer le comportement de larves de puceron en condition de choix entre deux milieux de composition différente (Chen, (1996), Thèse de l'Institut National des Sciences Appliquées, Lyon, France: 158 p).

La figure 12 illustre l'indice de phagostimulation vis-à-vis de *Myzus persicae*, de l'acide chlorogénique (A), de l'acide-para-coumarique (B), de l'acide caféique (C), de la cynarine (D), du méthyl ester de l'acide caféique (E), et de l'acide 3,5-dicaféoylquinique (F) dissous à différentes concentrations dans le milieu de référence Ap3 et testés contre le milieu Ap3 (tests de choix). L'effet répulsif (indice de phagostimulation négatif) est significatif pour les points expérimentaux accompagnés d'un astérisque ($P < 0,05$), de deux ($P < 0,01$) ou de trois ($P < 0,001$) (test des rangs de Wilcoxon). La dose 0 mM correspond au milieu témoin Ap3.

La figure 13 illustre l'indice de phagostimulation de l'acide 3,5-dicaféoylquinique (3,5-diCQ) et de son précurseur l'acide chlorogénique (AC) vis-à-vis de *Myzus persicae*, testés contre le milieu témoin Ap3 ou l'un contre l'autre. L'effet répulsif (indice négatif) est significatif pour les points expérimentaux accompagnés d'un astérisque ($P < 0,05$), de deux ($P < 0,01$) ou de trois ($P < 0,001$) (test des rangs de Wilcoxon). La concentration 0 mM (carré noir) correspond au milieu témoin Ap3.

La figure 14 illustre l'indice de phagostimulation de l'acide 3,5-dicaféoylquinique (3,5-DiCQ) à 0,5 mM contre des molarités décroissantes de son précurseur l'acide chlorogénique (AC) vis-à-vis de *Myzus persicae*. L'effet répulsif (indice négatif) est significatif pour les points expérimentaux accompagnés d'un astérisque ($P < 0,05$), de deux ($P < 0,01$) ou de trois ($P < 0,001$) (test des rangs de Wilcoxon).

La figure 15 illustre l'effet phagorépulsif sur *M. persicae* de l'acide 3,5-dicaféoylquinique (3,5-diCQ) (A), de l'isomère 4,5-diCQ (B) et du mélange 3,4-diCQ/3,5-diCQ/4,5-diCQ (C) par rapport au milieu témoin Ap3. Pour le mélange d'isomères, la dose indique la teneur totale en diCQ. L'effet répulsif (indice de phagostimulation négatif) est significatif pour les points expérimentaux accompagnés

d'un astérisque ($P < 0,05$), de deux ($P < 0,01$) ou de trois ($P < 0,001$). La dose 0 correspond au milieu Ap3.

La figure 16 illustre la mortalité larvaire cumulée de *Myzus persicae* obtenue au cours des tests d'évaluation de la toxicité de l'acide 3,5-dicaféoylquinique (3,5-diCQ), de son précurseur l'acide chlorogénique (AC), du milieu témoin Ap3 et de l'extrait témoin obtenu à partir des solvants et additifs utilisés pour la purification du 3,5-diCQ. Le milieu Ap3 est ajusté à pH 7,5.

La figure 17 illustre le poids des adultes aptères (moyenne + 1 écart-type) de *Myzus persicae* élevés sur milieu témoin Ap3, sur l'extrait témoin obtenu à partir des solvants et additifs utilisés pour la purification du 3,5-diCQ, et sur l'acide 3,5-dicaféoylquinique (3,5-diCQ). Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test de Student-Newman-Keuls).

La figure 18 illustre le poids des adultes aptères (moyenne + 1 écart-type) de *Myzus persicae* élevés sur milieu témoin Ap3 et sur l'acide chlorogénique. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test de Student-Newman-Keuls).

La figure 19 illustre la mortalité journalière cumulée observée au cours du développement larvaire de *Myzus persicae* (7 jours) en présence d'acide 3,5-dicaféoylquinique, de deux de ses isomères (4,5-diCQ, 1,5-diCQ) et du mélange 3,4-diCQ/3,5-diCQ/4,5-diCQ. La gamme de concentration de la substance testée varie 0,03125 mM à 1 mM. La dose 0 correspond au milieu témoin Ap3 seul.

La figure 20 illustre le poids moyen (moyenne $\pm$ 1 écart-type) d'un puceron parvenu à l'état adulte aptère au terme du développement larvaire sur milieu nutritif Ap3 supplémenté ou non par l'acide 3-5 dicaféoylquinique, ses isomères (4,5-diCQ, 1,5-diCQ), et le mélange 3,4-diCQ/3,5-diCQ/4,5-diCQ. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test de Bonferroni/Dunn).

La figure 21 illustre l'effet phagorépuelsif de l'acide 3,5-dicaféoylquinique vis-à-vis d'*Acyrtosiphon pisum*. L'effet répulsif (indice de phagostimulation négatif) est significatif pour les points expérimentaux accompagnés d'un astérisque ($P < 0,05$), de deux ($P < 0,01$) ou de trois ($P < 0,001$). La dose 0 correspond au milieu témoin Ap3.

La figure 22 illustre la mortalité journalière cumulée observée au cours du développement larvaire d'*Acyrtosiphon pisum* en présence d'acide 3,5-dicaféoylquinique. La gamme de concentration en 3,5-diCQ varie 0,03125 mM à 1 mM. La dose 0 correspond au milieu témoin Ap3 seul.

La figure 23 illustre l'effet phagorépulsif de l'acide 3,5-dicaféoylquinique vis-à-vis de *Macrosiphum euphorbiae*. L'effet répulsif (indice de phagostimulation négatif) est significatif pour les points expérimentaux accompagnés d'un astérisque ($P < 0,05$), de deux ($P < 0,01$) ou de trois ($P < 0,001$). La dose 0 correspond au milieu témoin Ap3.

La figure 24 illustre la mortalité journalière cumulée observée au cours du développement larvaire de *M. euphorbiae* en présence d'acide 3,5-dicaféoylquinique. La gamme de concentration en 3,5-diCQ varie 0,03125 mM à 1 mM. La dose 0 correspond au milieu témoin Ap3 seul.

Exemple 1 : Extraction de l'acide 3,5-diCQ de la racine non tubérisée d'*Ipomoea batatas*

Des tubercules de patate douce (*Ipomoea batatas*) achetés dans le commerce ont été mis en culture. Le support de culture est constitué d'un récipient d'une contenance de 1,5 L environ, protégé de la lumière. Les récipients sont remplis d'eau distillée et les tubercules y sont immergés à 80 %. La culture est réalisée au laboratoire en lumière naturelle.

Les racines non tubérisées formées par les tubercules sont prélevées environ 7 mois après la mise en culture, immédiatement congelées dans l'azote liquide et lyophilisées. Les racines sont ensuite broyées dans un mortier refroidi par de l'azote liquide puis de nouveau lyophilisées pour obtenir une poudre sèche. Cette poudre est conservée à -20°C .

On extrait 10 g de poudre sèche à trois reprises avec de l'éthanol à 70 % avec à chaque extraction homogénéisation à l'ultra-turrax de la poudre ou du résidu dans environ 80 mL de solvant, puis agitation 15 min en chambre froide (4°C) et filtration sur verre fritté. Après la dernière extraction, on rince le résidu par 60 mL d'éthanol à 70%. Le volume total de l'extrait hydroalcoolique est donc d'environ 300 mL. On évapore l'éthanol à l'aide d'un évaporateur rotatif pour obtenir une phase aqueuse de 10 à 20 mL complétée par de l'eau distillée jusqu'à un volume de 50 mL. On extrait cette phase aqueuse par 100 mL d'acétate d'éthyle après adjonction de chlorure de sodium (8%, Poids/Volume final phase aqueuse = 100 mL) et d'acide métaphosphorique (1 %, Poids/Volume final phase aqueuse). On réalise 4 extractions successives, on sèche les traces d'eau résiduelles par adjonction dans la phase organique de quelques mg de sulfate de sodium anhydre. Après filtration sur coton de verre on évapore à sec la phase

organique dans un évaporateur rotatif et on reprend le culot par 8 mL de méthanol qualité CLHP. On filtre sur membrane PTFE 0,45 µm. On sépare le 3,5-diCQ par 15 chromatographies successives sur une chaîne CLHP semi-préparative WATERS® 600 (solvants: eau ultra pure acidifiée à pH 2,6 par l'acide o-phosphorique (solvant A) et méthanol CLHP (solvant B)) sur une colonne INTERCHIM (longueur 250 mm ; diamètre 21,2 mm) remplie d'une phase stationnaire C18 Uptisphere 10 µm et thermostatée à 30 °C. Le débit du système est de 18 mL/min. Le volume injecté est de 500 µL. Le gradient utilisé est le suivant : 0 min : 35 % B ; 10 min : 35 % B ; 23 min : 38 % B ; 33 min : 38 % B. On recueille le 3,5-diCQ dans la phase mobile environ 25 min après l'injection. On réduit les fractions recueillies par concentration à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à obtention d'une phase aqueuse de 70 mL environ. On ajuste à 100 mL avec de l'eau distillée et on extrait 3 fois avec 200 mL d'acétate d'éthyle après addition de chlorure de sodium (10% Poids/Volume final phase aqueuse = 200 mL). On sèche la phase organique par adjonction de quelques mg de sulfate de sodium anhydre. Après filtration sur coton de verre, on évapore l'acétate d'éthyle à sec puis on reprend le résidu dans 10 mL de méthanol. On filtre sur membrane PTFE 0,45 µm. On ajoute 30 mL d'eau ultra pure froide pour faire précipiter la molécule, on congèle dans l'azote liquide et on lyophilise.

On obtient 91,9 mg de poudre blanche anhydre contenant environ 93 % de 3,5-diCQ et 7 % de formes isomères (figure 3, chromatogramme de contrôle de pureté de la substance obtenu sur chaîne CLHP analytique).

Exemple 2 : Conditions de culture favorables à la production d'acides dicaféoylquiniques dans les racines d'*Ipomoea batatas*

2.1. Matériel et méthode

Deux expérimentations successives (A et B) ont été menées sur une variété de la patate douce à chair rouge en provenance de Guadeloupe (clone IbD) cultivée en conteneurs de 7 L sous tunnel isolé des insectes à Avignon. Des boutures de 40 à 50 cm de longueur, constituées par l'extrémité des tiges en croissance ont été prélevées, effeuillées sur la partie basale pour éviter le contact des feuilles avec le milieu de culture, et placées dans des récipients en plastique transparent, d'une contenance de 1,25 L environ, remplis par les différents milieux et substrats de culture testés, et protégés ou non de la lumière par une feuille d'aluminium. Les récipients contenant un substrat solide sont percés à la base afin de permettre le drainage du milieu apporté. Les racines se

développant au niveau des nœuds de la tige, un nombre égal de nœuds de la base de la bouture a été placé dans le milieu de culture.

L'expérimentation A a permis de tester l'influence de trois facteurs différents sur la production de racines et leur teneur en 3,5-diCQ : la nature du substrat de culture, aéré ou non (perlite ou milieu liquide), l'effet de la lumière (culture des racines à l'obscurité ou à la lumière), et l'influence de la composition minérale du milieu de culture (milieu complet, milieu carencé en azote ou eau distillée). Les différentes conditions de culture comparées dans l'expérimentation A sont illustrées dans le tableau I.

TABLEAU I

Condition	Milieu de culture	Apports nutritifs	Apport d'azote	Eclairement racines
A	liquide	Eau distillée	0 mM	Obscurité
B	liquide	Eau distillée	0 mM	Lumière
C	liquide	Solution nutritive	0,05 mM	Obscurité
D	liquide	Solution nutritive	6 mM	Obscurité
E	perlite	Eau distillée	0 mM	Obscurité
F	perlite	Solution nutritive	6 mM	Obscurité

L'expérimentation B a permis de comparer l'influence respective des carences totales en azote et en phosphate sur la production de racines et leur teneur en 3,5-diCQ. Les différentes conditions de cultures comparées dans l'expérimentation B sont illustrées dans le tableau II.

TABLEAU II

Condition	Milieu de culture	Apports nutritifs	Apport d'azote	Apport de phosphate	Eclairement des racines
E	liquide	Eau distillée	0 mM	0 mM	Obscurité
F	liquide	Solution nutritive	6 mM	1 mM	Obscurité
G	liquide	Solution nutritive	0 mM	1 mM	Obscurité
H	liquide	Solution nutritive	6 mM	0 mM	Obscurité

5 et 3 répétitions par condition ont été respectivement mises en place pour les expérimentations A et B. Les plantes disposées de manière randomisée ont été cultivées dans une enceinte climatisée à une température de 25°C et sous une photopériode de 16 h de jour et 8 h de nuit. Le volume de milieu liquide est complété régulièrement au niveau initial et les plantes cultivées sur substrat solide arrosées fréquemment avec la solution de culture. Les racines formées ont été prélevées au bout de quatre semaines (expérimentation A) ou trois semaines (expérimentation B) de culture, pesées, placées dans l'azote liquide, lyophilisées, broyées dans l'azote liquide puis lyophilisées de nouveau. Les poudres obtenues ont été analysées par CLHP pour leur contenu en

composés phénoliques après extraction dans le solvant éthanol/eau (70/30, v à v), évaporation à sec, reprise de l'extrait sec dans le méthanol et filtration.

Dans les deux expérimentations, la solution nutritive apportée est une solution nutritive complète comprenant macro et micro-éléments dont la composition est donnée en tableau III. Les teneurs en azote, apporté exclusivement sous forme nitrate, et en phosphate varient selon les situations de carence étudiées.

TABLEAU III

en mg (ou μL) par L	Solutions			
Produit	6 mM N*	0,05 mM N	0 N	0 P
K_2SO_4	174	174	174	261
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$	708	6	0	708
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	370	370	370	370
$\text{CaSO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	86	598	603	86
EDTA-Fe, $1\text{H}_2\text{O}$	17	17	17	17
KH_2PO_4	136	136	136	0
Kanieltra 6 Fe (μL)	100	100	100	100

2.2. Résultats

Ils sont donnés dans les figures 4 à 7.

Les résultats de l'expérimentation A (figures 4 et 5) montrent que les conditions de culture exercent une forte influence sur la teneur en 3,5-diCQ des racines.

Les teneurs maximales en 3,5-diCQ sont observées dans les racines produites dans l'eau distillée et à la lumière (condition B) où elles dépassent 9 % de la matière sèche. Les teneurs sont minimales dans les racines produites sur substrat aéré de type perlite avec une solution minérale complète (condition F). Elles restent cependant élevées, avec environ 1,5 % de la matière sèche, dans ces conditions de culture comportant une solution minérale contenant de l'azote uniquement sous forme de nitrate. Les teneurs obtenues dans les autres conditions de culture montrent que la production de racines en milieu liquide et en situation de carence azotée tend à augmenter les teneurs en 3,5-diCQ (figures 4 et 5B).

La quantité de racines produites à partir des boutures est également fortement affectée par les conditions de cultures. La quantité de matière sèche racinaire dans les conditions de fertilisation complète (conditions D et F) est très supérieure à celle produite dans les autres conditions (figures 4 et 5A). Ceci conduit à une quantité totale de 3,5-diCQ produite par bouture équivalente dans les conditions permettant une forte teneur de 3,5-diCQ dans les racines mais pénalisant leur croissance (condition A) et dans les conditions

donnant une teneur plus faible en 3,5-diCQ mais permettant une croissance racinaire forte (conditions D et F) (figures 4 et 5C).

Les résultats de l'expérimentation B (figures 6 et 7) montrent que les conditions de carence minérale, azotée ou phosphatée, exercent une influence sur la teneur en 3,5-diCQ des racines.

Comme dans l'expérimentation A, les teneurs les plus fortes en 3,5-diCQ sont obtenues en culture dans l'eau distillée et les plus faibles dans la solution minérale complète. En culture dans des solutions minérales carencées en azote ou en phosphate les teneurs en 3,5-diCQ sont intermédiaires (figures 6 et 7B). Ceci montre que les conditions de carences en phosphate et en azote tendent l'une et l'autre à augmenter la teneur en 3,5-diCQ des racines par rapport à la condition de fertilisation complète mais de façon moins importante que la situation de carence totale en éléments minéraux, dans l'eau distillée. A l'inverse, ces conditions de carences azotée et phosphatée limitent la croissance racinaire par rapport à la solution minérale complète, de manière cependant moindre que dans l'eau distillée (figures 6 et 7A). Il en résulte que la quantité de 3,5-diCQ produit dans les racines par bouture est équivalente pour toutes les conditions (figures 6 et 7C).

2.3. Conclusion

Les conditions de culture influent fortement sur la teneur en 3,5-diCQ des racines non tubérisées de la patate douce *Ipomoea batatas*. La culture en milieu liquide, à la lumière et en situation de carence minérale, notamment azotée et phosphatée, sont des facteurs favorisant l'accumulation de l'acide 3,5-dicaféoylquinique dans les racines produites par des boutures. Les teneurs maximales, supérieures à 90 mg.g⁻¹ de matière sèche, ont été obtenues dans des racines produites dans l'eau et à la lumière. Ces conditions de culture limitent cependant fortement la production des racines obtenues par bouturage de tige. La culture des boutures dans une solution nutritive complète contenant de l'azote sous forme de nitrate uniquement, permet une production de racines plus importante présentant une teneur en 3,5-diCQ relativement élevée, variant de 20 à 25 mg.g⁻¹ de matière sèche.

Exemple 3 : Mise au point d'un système de production de racines par marcottage

3.1. Matériel et méthodes

Des tiges dont l'extrémité est en croissance, d'environ 110 cm de longueur, ont été prélevées sur le clone IbD de patate douce. Leur base a été défeuillée sur quatre nœuds, soit une longueur de 20 cm environ, et a été mise en bouturage en chambre climatisée dans des récipients de 1.25 L environ, contenant de l'eau distillée ou une solution minérale complète et protégés de la lumière par une feuille d'aluminium. La composition des solutions nutritives utilisées pour la production par bouturage de racines de patate douce *Ipomoea batatas* sont celles illustrées dans le tableau III. Les plantes ont été cultivées dans une enceinte climatisée à une température de 25°C et sous une photopériode de 16 h de jour et 8 h de nuit. Le volume de milieu liquide a régulièrement été complété au niveau initial. Après 15 jours de culture, les plants sont enracinés et servent de plantes mères à la production des marcottes. Pour cela, sur chaque plant une portion de tige d'une dizaine de nœuds a été défeuillée et mise en marcottage par immersion dans ces bacs de 20 L environ, remplis d'eau ou de solution minérale et abrités de la lumière par une feuille d'aluminium.

Quatre conditions expérimentales ont été mises en place faisant varier le milieu de bouturage ou de marcottage, eau ou solution minérale complète. Ces conditions expérimentales sont illustrées dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Condition	Milieu bouturage (4 semaines de culture)	Milieu marcottage (2 semaines de culture)
A	Eau distillée	Eau distillée
B	Eau distillée	Milieu nutritif 6 mM d'azote
C	Milieu nutritif 6 mM d'azote	Milieu nutritif 6 mM d'azote
D	Milieu nutritif 6 mM d'azote	Eau distillée

3 plants ont été cultivés par condition. Les racines ont été prélevées sur la partie bouturée et sur la partie marcottée de chaque plante 15 jours après la mise en marcottage des tiges soit 4 semaines après la mise en bouturage.

Les racines formées ont été prélevées, pesées, placées dans l'azote liquide, lyophilisées, broyées dans l'azote liquide puis lyophilisées de nouveau. Les poudres obtenues ont été analysées par CLHP pour leur contenu en composés phénoliques après extraction dans le solvant éthanol/eau (70/30, v à v), évaporation à sec, reprise de l'extrait sec dans le méthanol et filtration.

3.2. Résultats

Ils sont donnés dans les figures 8 et 9.

Les résultats montrent clairement que la teneur en 3,5-diCQ dépend du milieu de culture utilisé localement pour la production des racines, que ce soit par bouturage ou marcottage, et n'est pas influencée par la nature du milieu apporté pour la production du système racinaire distant (figures 8 et 9B).

Les teneurs moyennes en 3,5-diCQ des racines produites dans l'eau varient de 44,7 à 47,4 mg.g⁻¹ de matière sèche dans les racines de boutures et de 31,9 à 35,5 mg.g⁻¹ de matière sèche dans les racines de marcottes. Les teneurs moyennes en 3,5-diCQ des racines produites dans la solution minérale sont trois fois plus faibles. Elles varient de 15,5 à 16,2 mg.g⁻¹ de matière sèche dans les racines de boutures et de 10,2 à 11,6 mg.g⁻¹ de matière sèche dans les racines de marcottes.

La nature du milieu apporté localement influence la quantité de matière sèche produite (figure 8A). Cependant, de manière inattendue, elle semble également être influencée par le milieu de culture utilisé pour la production du milieu de culture distant. En effet la quantité moyenne de racines issues de boutures produites dans la solution minérale (condition D) est significativement supérieure quand les marcottes sont effectuées dans l'eau à celle des boutures dont la partie marcottée est dans la solution minérale (condition C). Les quantités moyennes totales de 3,5-diCQ produit dans les racines formées par bouturage (31,1 mg.g⁻¹ de matière sèche), par marcottage (26,2 mg.g⁻¹ de matière sèche) et leur somme (57,3 mg.g⁻¹ de matière sèche) sont les plus élevées dans cette condition D (bouturage dans la solution minérale et marcottage dans l'eau).

3.3. Conclusion

La teneur en 3,5-diCQ des racines obtenues par marcotte dépend du milieu de culture utilisé localement pour leur production et n'est pas influencée par les conditions de culture de la plante mère. Le marcottage dans l'eau de plants de patate douce normalement fertilisés permet la production de racines présentant des teneurs élevées en 3,5-diCQ. Ce système permet de concilier une croissance importante de la plante-mère par une alimentation minérale appropriée et la production de racines issues de marcottes présentant des teneurs élevées en 3,5-diCQ. L'intérêt de ce système a été validé en culture en extérieur sur deux clones de patate douce, cultivées en container sous tunnel et normalement fertilisés. Les tiges mises en marcottage dans l'eau ont produit en 15 jours une masse racinaire importante présentant des teneurs élevées en 3,5-diCQ (Clone IbD: 32,7 mg.g⁻¹ matière sèche ; Clone IbE: 40,4 mg.g⁻¹ matière sèche).

Exemple 4 : Mesure de la répulsivité du 3,5-diCQ, de ses isomères et de leur mélange vis-à-vis du puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*)

4.1. Mode opératoire

La méthode utilisée est celle développée par Yvan Rahbé (Rahbé & Febvay (1993) *Entomologia Experimentalis et Applicata* **67**: 149-160 ; Chen (1996) Thèse de l'Institut National des Sciences Appliquées, Lyon, France: 158 p) dans le cadre de recherches sur les déterminants chimiques de la résistance des plantes à diverses espèces de pucerons (*Aphis gossypii*, *Acyrtosiphon pisum*), et adaptée au puceron vert *Myzus persicae*.

L'objectif est d'évaluer le caractère attractif ou répulsif d'une molécule candidate, à différentes concentrations, soit par rapport à un milieu de base témoin, soit par rapport à une autre substance. Le milieu de base utilisé, dit Ap3 (composition dans le tableau de la figure 10), a été mis au point à l'UMR INRA-INSA de Lyon pour permettre un développement optimal de l'espèce de puceron *Acyrtosiphon pisum* (Febvay *et al.* (1988) *Canadian Journal of Zoology* **66**: 2149-2453). Il permet aussi le développement de *Myzus persicae*. Ce milieu de base est supplémenté ou non par les différents acides phénoliques testés. Le comportement de choix du puceron, mis en présence des deux milieux, est étudié dans un système clos où l'insecte n'a pas d'autre alternative pour se nourrir que de choisir l'un des deux milieux. Le dispositif est schématisé dans la Figure 11.

Le milieu (35 µl) est coulé entre deux membranes de Parafilm® étirées sur un cône Eppendorf®. Sur un portoir comportant 6 cages expérimentales, un milieu témoin est disposé en face d'un milieu testé sur chaque cage. Les répétitions d'une même modalité

(milieu témoin ou milieu testé) sont disposées en alternance le long du portoir, pour éviter tout biais systématique lors du dépôt des pucerons. Six larves de puceron (second ou troisième stade) sont déposées en fin de journée dans chacune des cages d'un portoir. Les portoirs sont ensuite introduits dans une boîte noire placée dans une enceinte climatique à 19°C pendant 15 heures. Ce passage à l'obscurité permet de stabiliser plus rapidement la fixation des larves. Le lendemain matin, le nombre de pucerons fixés sur chaque milieu est alors noté. Les tests sont effectués en routine sur 24 répétitions de choix (4 portoirs comportant chacun 6 cages). Un indice de phagostimulation, représentant le degré d'appétence pour le puceron du milieu testé, est calculé de la façon suivante :

Indice de phagostimulation = $(\text{Nb test} - \text{Nb témoin}) / \text{Nb total}$, où :

Nb test = Nombre de pucerons fixés sur le milieu testé,

Nb témoin = Nombre de pucerons fixés sur le milieu témoin,

Nb total = Nombre total de pucerons fixés.

Par construction, la valeur de l'indice est comprise entre -1 et 1. Un indice négatif signifie que le milieu testé est répulsif par rapport au milieu témoin, et un indice positif signifie que le milieu testé est attractif. L'hypothèse que l'effet du milieu testé est identique à celui du milieu témoin est examinée par le test des rangs de Wilcoxon.

Les substances phénoliques testées autres que le 3,5-diCQ ont une origine commerciale excepté le méthyl ester de l'acide caféique qui a été synthétisé. Les molécules ont été caractérisées par spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire du proton. La teneur et la stabilité des molécules dissoutes sont contrôlées par CLHP après dissolution des molécules dans le milieu Ap3, au début et en fin d'expérimentation.

4.2. Résultats

4.2.1 Effet répulsif du 3,5-diCQ

Ils sont donnés dans les figures 12 à 14.

Les résultats obtenus mettent en évidence un effet répulsif significatif de l'ensemble des dérivés caféiques.

Le 3,5-diCQ et le méthyl ester de l'acide caféique sont les deux composés les plus répulsifs : ils ont un effet hautement significatif dès la plus faible concentration (0,25

mM), alors que les effets de l'acide chlorogénique et de la cynarine ne sont significatifs qu'à partir des concentrations 0,5 mM et 1 mM respectivement. L'acide para-coumarique, qui est une molécule phénolique mono hydroxylée, n'a aucun effet répulsif sur *Myzus persicae* dans la gamme de concentration testée (figure 12). On a également vérifié qu'une solution témoin réalisée avec les solvants et additifs utilisés pour l'extraction et la purification du 3,5-diCQ ne montre un effet répulsif qu'à une concentration largement supérieure à celle utilisée lors de la préparation de la molécule (données non montrées).

Le 3,5-diCQ est significativement répulsif dès la concentration de 0,125 mM et l'acide chlorogénique (AC) à 0,25 mM (figure 13). Pour une même molarité, le puceron choisi systématiquement AC plutôt que le 3,5-diCQ dès 0,125 mM. On a obtenu des résultats identiques en utilisant un milieu Ap3 à pH 5,3 dans lequel les substances testées ne montrent aucun brunissement, contrairement au milieu Ap3 originel ajusté à pH 7,5 dans lequel les substances caféiques montrent un brunissement important (résultats non montrés).

Lorsqu'on fait varier la concentration d'AC de 0,5 mM à 2 mM face à 3,5-diCQ 0,5mM, les résultats obtenus montrent que le 3,5-diCQ à une molarité de 0,5 mM reste répulsif par rapport à l'acide chlorogénique à une concentration quatre fois supérieure (2 mM) pour un pH de 7,5 (Figure 14). Des résultats similaires ont été obtenus à pH 5,3.

L'ensemble des résultats obtenus montre un net effet répulsif de l'acide 3,5-dicaféoylquinique vis-à-vis du puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*). Cet effet est détectable à une concentration minimale de 125 μM (soit 64,5 mg.L^{-1}). L'effet répulsif de cette molécule est nettement plus fort que celui de son précurseur métabolique, l'acide chlorogénique.

4.2.2 Effet répulsif des isomères du 3,5-diCQ et de leur mélange sur *Myzus persicae*

Les résultats sont donnés dans la figure 15.

Les effets répulsifs du 3,5-diCQ, du 4,5-diCQ et du mélange 3,4-diCQ/3,5-diCQ/4,5-diCQ (en proportions égales) ont été testés aux mêmes concentrations. La gamme de concentration de la substance testée ou du mélange varie de 0,03125 à 1 mM.

Le 3,5-diCQ et de l'ensemble de ses isomères représentent un effet répulsif significatif. Le 3,5-diCQ, le 4,5-diCQ et le mélange 3,4-diCQ/3,5-diCQ/4,5-diCQ ont un effet répulsif hautement significatif dès la dose 0,125 mM. Des effets répulsifs

significatifs ont pu être détectés dès la dose de 0,03125 mM pour le 4,5-diCQ et le mélange 3,4-diCQ/3,5-diCQ/4,5-diCQ.

L'acide 3,5-dicaféoylquinique, l'acide 4,5-dicaféoylquinique et le mélange 3,4-diCQ/3,5-diCQ/4,5-diCQ présentent tous une activité répulsive sur *Myzus persicae*. Cette activité varie cependant en fonction de la molécule présentée au puceron. Cela suggère une influence de la position d'acylation des acides caféiques sur l'acide quinique sur le caractère répulsif des acides dicaféoylquiniques.

Exemple 5 : Mesure de la toxicité du 3,5-diCQ, de ses isomères et de leur mélange sur le développement larvaire du puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*)

5.1. Mode opératoire

L'objectif est de quantifier l'effet toxique du 3,5-diCQ et ses dérivés sur le puceron pendant la durée de son développement larvaire, soit 8 à 10 jours pour *Myzus persicae* à 19° C. La molécule est ajoutée à différentes concentrations au milieu nutritif Ap3.

Le milieu (75 µl) est coulé entre deux membranes de Parafilm® stérilisées aux UV et étirées sur un support cylindrique en PVC (h = 1,5 cm, d = 2 cm), en conditions stériles. Le Jour J0, 20 larves néonates sont déposées à l'intérieur du cylindre, lequel est ensuite retourné et appliqué sur un carré de Parafilm®. Les boîtes sont placées sous lumière tamisée (16h jour/8h nuit) et dans une enceinte à 19° C. Le pourcentage de fixation est noté après 1 heure comme indicateur de phagostimulation à court terme et pour vérifier qu'aucune anomalie ne s'est produite au moment du dépôt des pucerons. La mortalité larvaire est relevée quotidiennement en fin de journée. Le jour J+3, les larves sont prélevées et dédoublées dans deux nouvelles boîtes. Le jour de leur mue imaginale, les pucerons ayant atteint le stade adulte aptère sont déposés successivement sur une balance de précision (d = 0,01 mg) et les poids cumulés sont notés pour chaque concentration de chaque molécule testée. Les poids individuels sont calculés ultérieurement. Les effets d'une même molécule à toutes les concentrations et les effets du milieu témoin sont évalués simultanément pendant le même test. Les tests sont effectués en routine sur 3 répétitions.

5.2. Résultats

5.2.1 Effet toxique du 3,5-diCQ sur *Myzus persicae*

5.2.1.1. Effet sur la mortalité larvaire

Les résultats sont donnés dans la figure 16.

On observe un effet très marqué du 3,5-diCQ sur la mortalité larvaire du puceron, qui augmente progressivement au cours du développement de l'insecte. La mortalité augmente également avec la concentration, pour atteindre pratiquement 100% à 2 mM. En revanche, la mortalité n'excède jamais 10% sur le milieu Ap3, sur l'extrait témoin obtenu à partir des solvants et additifs utilisés pour la purification du 3,5-diCQ, et sur l'acide chlorogénique (y compris aux concentrations les plus élevées).

5.2.1.2. Effet sur le poids des adultes aptères

Les résultats sont donnés aux figures 17 et 18.

Les pesées des adultes aptères survivants obtenus au terme de leur développement mettent en évidence un effet dépressif significatif du 3,5-diCQ à partir de la dose 0,25 mM (Figure 17) (ANOVA : $F = 32,86$, $P < 0,0001$). Les concentrations 1 et 2 mM du 3,5-diCQ ne sont pas représentées car aucun puceron n'a atteint le stade adulte aptère sur ces modalités. Cet effet dépressif sur le poids des pucerons n'est pas observé pour l'acide chlorogénique, qui semble exercer plutôt un effet probiotique (Figure 18; ANOVA : $F = 3,31$, $P = 0,0063$).

Les tests *in vitro* montrent que le 3,5-diCQ provoque une forte mortalité des larves pendant leur développement et diminue significativement le poids des adultes obtenus, alors que le précurseur métabolique AC ne montre aucun effet négatif sur le développement larvaire.

5.2.2 Effet toxique des isomères du 3,5-diCQ et de leur mélange sur *Myzus persicae*

5.2.2.1. Effet sur la mortalité larvaire

Les résultats sont donnés dans la figure 19.

On observe un effet toxique très marqué de tous les isomères testés et du mélange d'isomères à la dose 1 mM (80 à 100% de mortalité cumulée observée dès le 3^{ème} jour de développement larvaire). Le 4,5-diCQ et le 1,5-diCQ montrent un effet toxique net à la dose 0,5 mM (mortalité cumulée supérieure à 50 % au 3^{ème} jour). Le mélange d'isomères provoque une mortalité cumulée supérieure à 50 % au 3^{ème} jour dès la dose 0,25 mM.

5.2.2.2. Effet sur le poids des adultes aptères

Les résultats sont donnés dans la figure 20.

Les pesées des adultes aptères obtenus au terme de leur développement (Figure 20) mettent en évidence un effet dépressif significatif à la dose 0,5 mM pour le 3,5-diCQ (ANOVA : $F = 10,856$, $P < 0,0001$). Cet effet dépressif sur le poids des pucerons est observé dès la dose 0,25 mM pour le 4,5-diCQ (ANOVA : $F = 38,61$, $P < 0,0001$) et le mélange d'isomères (ANOVA : $F = 39,248$, $P < 0,0001$). En revanche aucun effet sur le poids des pucerons n'est observé pour la cynarine à la dose 0,25 mM (ANOVA : $F = 2,291$, $P = 0,068$).

L'acide 3,5-dicaféoylquinique, l'acide 4,5-dicaféoylquinique, l'acide 1,5-dicaféoylquinique et le mélange des acides 3,4-dicaféoylquinique/3,5-dicaféoylquinique/4,5-dicaféoylquinique présentent tous une activité toxique sur *Myzus persicae*.

Exemple 6 : Evaluation *in vitro* de l'effet de l'acide 3,5-dicaféoylquinique sur d'autres espèces de pucerons

6.1. Matériel animal et méthodes

Deux espèces de pucerons, dont le puceron vert ou rose du pois, *Acyrtosiphon pisum* et le puceron vert et rose de la pomme de terre, *Macrosiphum euphorbiae*, sont utilisées dans cette étude.

Acyrtosiphon pisum, (Harris) est un puceron de grande taille qui colonise les légumineuses sauvages et cultivées telles que le Sainfoin, la Luzerne, le Lotier, la Vesce, les Pois, le Haricot et le Trèfle. Le clone de puceron fourni par l'UMR BF2I INRA/INSA de Lyon est élevé en chambre climatisée sur fève.

Macrosiphum euphorbiae (Thomas) est un puceron de grande taille et fusiforme. Très polyphage et cosmopolite, il s'observe notamment sur la pomme de terre, la betterave, le chou, des plantes de serre (laitue, chicorée, poivron, aubergine, concombre), des plantes sauvages et des cultures florales: cinéraire, chrysanthème, dahlia, oeillet, etc. . Le clone de puceron, fourni par le laboratoire de biologie des plantes et contrôle des insectes ravageurs de l'Université de Picardie Jules Verne à Amiens, est élevé en chambre climatisée sur pomme de terre.

Le protocole mis en œuvre et le milieu nutritif sont identiques à ceux décrits précédemment pour *Myzus persicae* à l'exception du stade larvaire utilisé. Compte tenu de la taille de ces deux espèces, par souci de laisser un espace suffisant pour les larves dans

le dispositif expérimental, des larves de premier stade (L1) sont utilisées pour ce type de test.

En ce qui concerne les tests de toxicité, aucune modification n'a été apportée au protocole pour les tests sur *Macrosiphum euphorbiae*. En revanche, compte tenu de la taille et de la sensibilité au stress d'*Acyrtosiphon pisum*, le nombre d'individus par boîte a été ramené à 10, le nombre de répétitions par dose testée relevé à 4, et aucun changement de milieu n'est effectué en cours de test, ce qui aurait eu pour conséquence de provoquer une perturbation trop importante des pucerons.

6.2. Résultats

6.2.1. Effet répulsif et toxicité du 3,5-diCQ sur *Acyrtosiphon pisum*

6.2.1.1 Effet phagorépulsif

Les résultats obtenus (Figure 21) mettent en évidence un effet répulsif significatif du 3,5-diCQ dès la dose 0,03125 mM.

6.2.1.2. Effet toxique au cours de développement larvaire

La figure 22 met en évidence un effet très marqué du 3,5-diCQ sur le développement larvaire d'*A. pisum* puisque la mortalité dépasse 50% dès 0,03125 mM en 2 jours et atteint 100% dès 0,25 mM en 4 jours. En revanche, elle n'excède jamais les 20% sur Ap3. Ce taux plus important de mortalité sur milieu témoin par rapport à celui observé pour *Myzus persicae* s'explique par les pertes engendrées par la manipulation de ce puceron très fragile.

Ces résultats suggèrent que la dose minimale pour détecter des effets répulsif et toxique sur cette espèce de puceron pourrait être inférieure à 0,03125 mM, dose pour laquelle aucun effet toxique ou répulsif n'est observé chez *M. persicae*.

6.2.2 Effet répulsif et toxicité du 3,5-diCQ sur *Macrosiphum euphorbiae*

6.2.2.1. Effet phagorépulsif

Les résultats obtenus (Figure 23) mettent en évidence un effet répulsif hautement significatif du 3,5-diCQ sur *M. euphorbiae* dès la dose 0,125 mM.

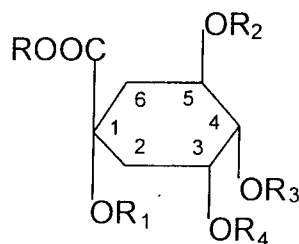
6.2.2.2. Effet toxique au cours du développement larvaire

La figure 24 met en évidence un effet très marqué du 3,5-diCQ sur le développement larvaire de *Macrosiphum euphorbiae* puisque la mortalité atteint 100% en

3 à 7 jours pour les doses 0,5 et 1 mM, et quasiment 100% en 6 jours pour la dose 0,25 mM.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation de composés de formule (I)



dans laquelle

- R représente un atome d'hydrogène ou un groupement méthyle
 - R₁, R₂ et R₄ représentent chacun indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupe caféoyle,
 - R₃ représente un hydrogène, un groupe caféoyle ou un groupe succinyle,
- à condition que deux au moins parmi R₁ à R₄ représentent un groupe caféoyle et que R₃ représente un groupement succinyle seulement si R₂ et R₄ représentent un groupe caféoyle

à partir de racines non tubérisées comprenant les étapes suivantes :

- a) prélèvement des racines non tubérisées ou récupération de l'exsudat racinaire,
- b) extraction par un ou plusieurs solvants organiques des composés phénoliques,
- c) récupération de l'extrait brut,
- d) purification éventuelle dudit extrait obtenu à l'étape c),
- e) optionnellement, isomérisation spontanée dudit extrait en condition de pH alcalin,

lesdits composés de formule (I) étant sous la forme de régio ou stéréoisomères ou de leurs mélanges.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les racines non tubérisées sont issues de plantes du genre *Ipomoea* (convolvulacées) ou des genres de la même famille *Argyreia*, *Calycobolus*, *Calystegia*, *Convolvulus*, *Dichondra*, *Erycibe*,

Evolvulus, *Iseia*, *Jacquemontia*, *Maripa*, *Merremia*, *Mina*, *Operculina*, *Porana*, *Stictocardia*, ou *Turbina*.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que les racines non tubérisées sont issues de plantes choisies dans le groupe comprenant la patate douce (*Ipomoea batatas*), le volubilis (*Ipomoea purpurea*), le liseron d'eau (*Ipomoea aquatica*), le volubilis des jardins (*Ipomoea indica*), l'Ipomée Scarlett O'Hara (*Ipomoea nil*) et le liseron des haies (*Calystegia sepium*).

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les racines non tubérisées sont issues d'*Ipomoea batatas*.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les racines non tubérisées sont produites par marcottage, bouturage ou par semis.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que des racines non tubérisées sont produites par culture en milieu liquide, à la lumière et en situation de carence minérale.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le composé de formule (I) est choisi parmi les différentes formes isomères des acides dicaféoylquiniques, notamment l'acide 3,5-dicaféoylquinique (3,5-diCQ), la cynarine (1,3-diCQ), l'acide 1,5-dicaféoylquinique (1,5-diCQ), l'acide 3,4-dicaféoylquinique (3,4-diCQ) et l'acide 4,5-dicaféoylquinique (4,5-diCQ), les analogues triacylés, comme l'acide 3,4,5-tricaféoylquinique (3,4,5-triCQ), ses analogues méthylés comme le méthyl 3,5-dicaféoylquininate, le méthyl 3,4-dicaféoylquininate, le méthyl 4,5-dicaféoylquininate, l'acide 4-succinyl-3,5-dicaféoylquinique ou leurs mélanges.

9. Procédé de préparation d'un composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications précédentes comprenant en outre les étapes suivantes :

- a) prélèvement des racines non tubérisées issues de tubercules, boutures, semis ou marcottes,
- b) congélation dans l'azote liquide des racines prélevées à l'étape a),

- c) lyophilisation des racines congelées à l'étape b),
- d) broyage dans l'azote liquide des racines lyophilisées puis lyophilisation pour obtenir une poudre sèche,
- e) extraction des composés phénoliques par un solvant organique en 1 à 4 fois, par agitation à froid,
- f) rinçage du dernier résidu de l'étape e) par le même solvant organique que celui utilisé à l'étape e) puis évaporation du solvant présent dans l'extrait jusqu'à obtention d'une phase aqueuse,
- g) optionnellement, extraction liquide/liquide volume à volume par un solvant apolaire, par plusieurs extractions successives après addition d'un sel et d'un acide dans la phase aqueuse,
- h) concentration à sec de la phase aqueuse obtenue à l'étape f) ou de la phase organique obtenue à l'étape optionnelle g) après adjonction d'un agent de séchage pour éliminer l'eau résiduelle et filtration, puis reprise du résidu sec par un solvant organique,
- i) séparation par CLHP semi-préparative en phase inverse et collecte de la fraction contenant le 3,5-diCQ,
- j) concentration à l'évaporateur rotatif de la fraction obtenue à l'étape i) jusqu'à l'obtention d'une phase aqueuse,
- k) extraction liquide/liquide par un solvant organique (volume à volume) par plusieurs extractions successives après addition d'un sel, dans la phase aqueuse pour faciliter l'extraction dans le solvant apolaire de 3,5-diCQ,
- l) concentration à sec de la phase organique, après adjonction d'un agent de séchage, filtration pour éliminer l'eau résiduelle, et reprise par un solvant organique,
- m) précipitation au froid de la molécule par ajout d'eau (au moins 3 volumes pour 1 volume de solvant organique utilisé à l'étape précédente), congélation de l'extrait dans l'azote liquide et lyophilisation pour obtenir la molécule sous forme de poudre sèche.

10. Procédé de préparation d'un composé de formule (I) selon la revendication 9 caractérisé en ce que l'étape g) est réalisée par extraction, soit par l'acétate d'éthyle soit par le diéthyléther (volume à volume) après addition de NaCl ou de sulfate d'ammonium et d'acide métaphosphorique dans la phase aqueuse et l'étape k) est

réalisée par extraction, soit par l'acétate d'éthyle soit par le diéthyléther (volume à volume) après addition de NaCl ou de sulfate d'ammonium dans la phase aqueuse.

11. Utilisation d'un composé de formule (I) ou leur mélange pour lutter contre les pucerons.

12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que les composés dérivés sont choisis dans le groupe comprenant les acides dicaféoylquiniques sous leurs différentes formes isomères, notamment l'acide 3,5-dicaféoylquinique (3,5-diCQ), la cynarine (1,3-diCQ), l'acide 1,5-dicaféoylquinique (1,5-diCQ), l'acide 3,4-dicaféoylquinique (3,4-diCQ) et l'acide 4,5-dicaféoylquinique (4,5-diCQ), les analogues triacylés comme l'acide 3,4,5-tricaféoylquinique (3,4,5-triCQ), ses analogues méthylés comme le méthyl 3,5-dicaféoylquininate le méthyl 3,4-dicaféoylquininate, le méthyl 4,5-dicaféoylquininate,, l'acide 4-succinyl-3,5-dicaféoylquinique et leurs mélanges pour lutter contre les pucerons.

13. Utilisation selon la revendication 11 ou 12, caractérisée en ce que le mélange est le mélange de 3,5-diCQ, 3,4-diCQ et 4,5-diCQ.

14. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisée en ce que les compositions utilisées comprennent au moins un dérivé d'acide dicaféoylquinique à une concentration comprise entre 0,01 et 5 mM, avantageusement entre 0,1 et 2 mM, plus avantageusement entre 0,25 et 1 mM.

15. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisée en ce que les pucerons sont choisis dans le groupe comprenant *Myzus persicae* (puceron vert du pêcher), *Myzus varians* (puceron cigarier du pêcher), *Myzus cerasi* (puceron noir du cerisier), *Brachycaudus persicae* (puceron noir du pêcher), *Aphis pomi* (puceron vert non migrant du pommier), *Brachycaudus helichrysi* (puceron vert du prunier), *Hyalopterus pruni* (puceron farineux du prunier), *Dysaphis plantaginea* (puceron cendré du pommier), *Dysaphis pyri*, (puceron cendré (ou mauve) du poirier), *Aphis gossypii* (puceron du cotonnier du melon), *Acyrtosiphum pisum* (puceron du pois), *Macrosiphum euphorbiae* (puceron rose et vert de la pomme de terre), *Aphis spiraeicola*

(= *A. citricola*) (puceron vert des Citrus), *Aphis fabae* (puceron noir de la fève), *Rhopalosiphum maidis* (puceron vert du maïs), *Rhopalosiphum padi* (puceron du merisier à grappe), *Sitobion avenae* (puceron des épis de céréales), *Diuraphis noxia* (puceron russe du blé), *Brevicoryne brassicae* (puceron cendré du chou), *Eriosoma lanigerum* (puceron lanigère du pommier), *Nasonovia ribisnigri* (puceron de la laitue), *Amphorophora idaei* (puceron du framboisier), *Toxoptera aurantii* (puceron noir des citrus et puceron du caféier), *Elatobium abietinum* (puceron vert de l'épicéa) et *Pemphigus bursarius* (puceron de la laitue).

16. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11 à 15, caractérisée en ce que le puceron est *Myzus persicae* (puceron vert du pêcher).

17. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11 à 16, caractérisée en ce que ledit composé est appliqué sur les pucerons ou sur un endroit habité par lesdits pucerons.

18. Procédé de lutte contre les pucerons, caractérisé en ce que l'on applique un composé de formule (I) ou leur mélange sur les pucerons ou sur un endroit habité par lesdits pucerons.

FIGURE 1

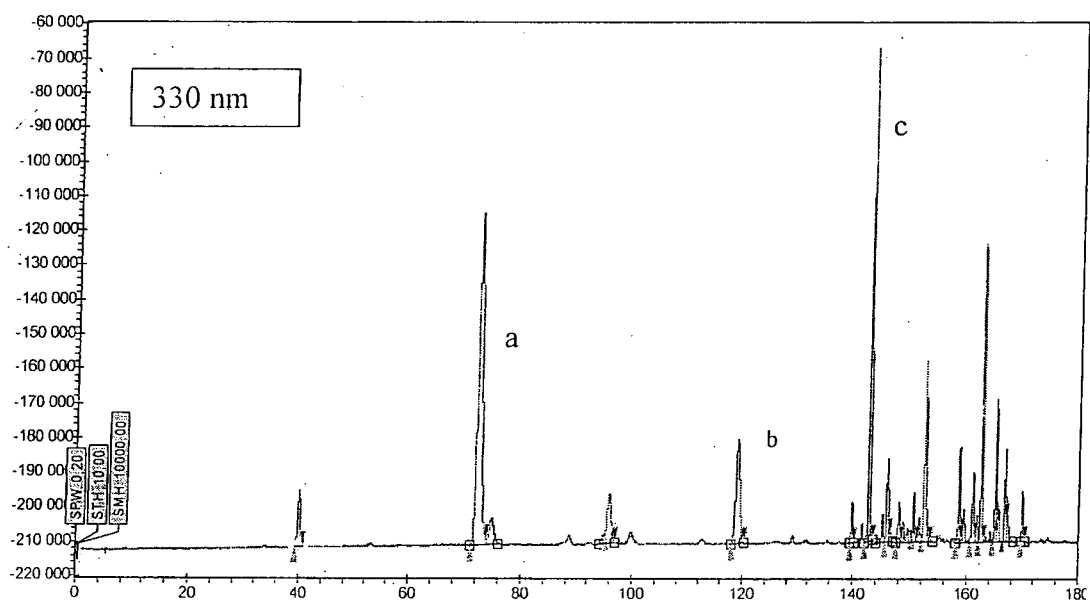
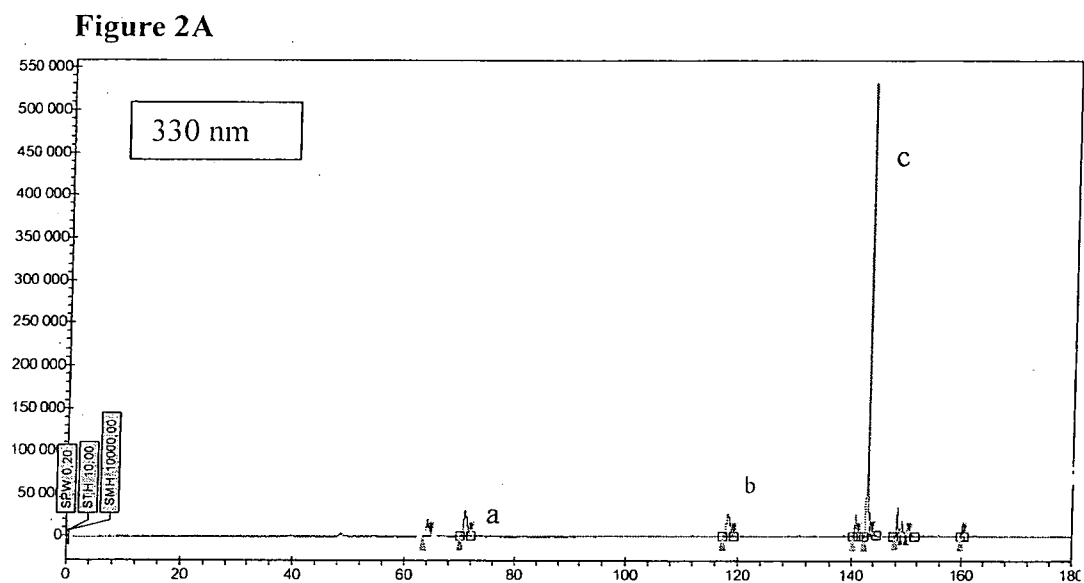


FIGURE 2



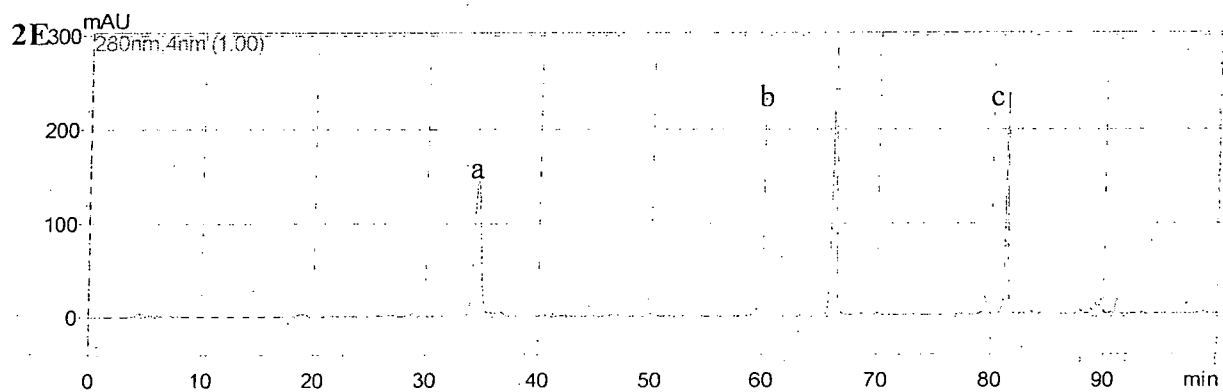
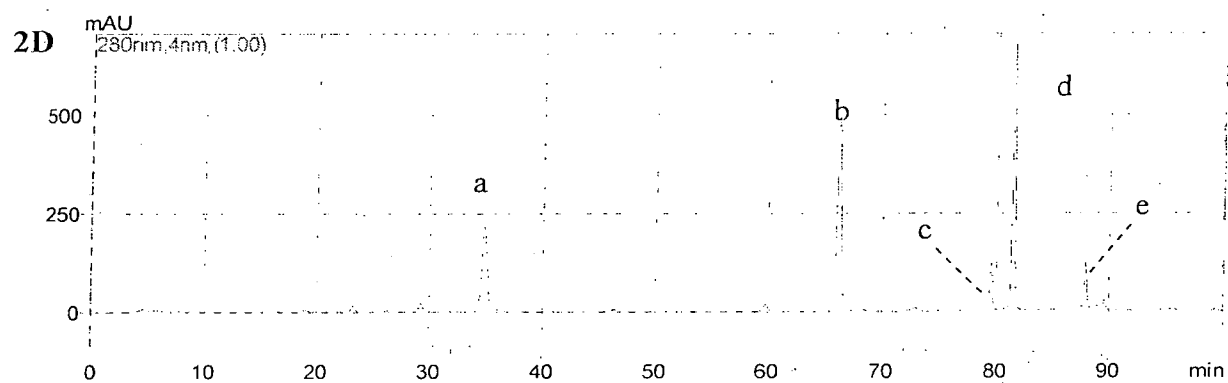
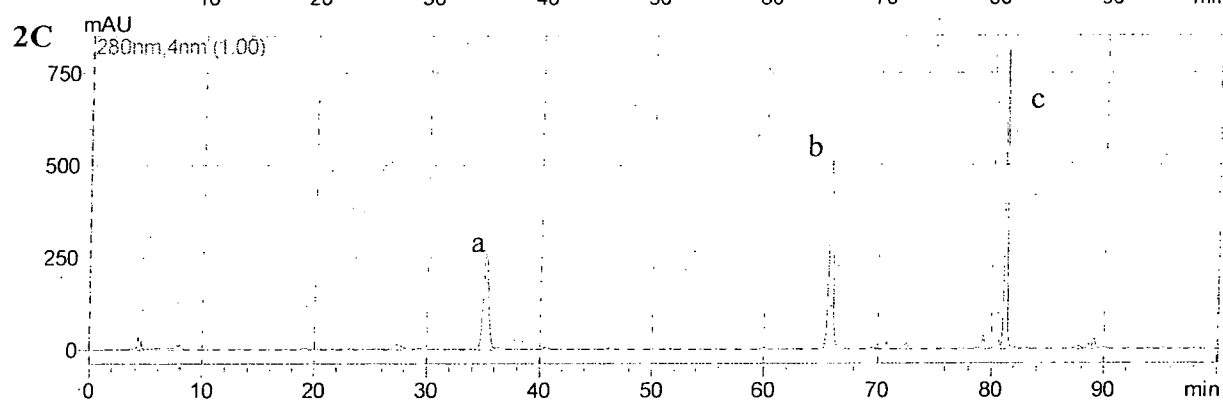
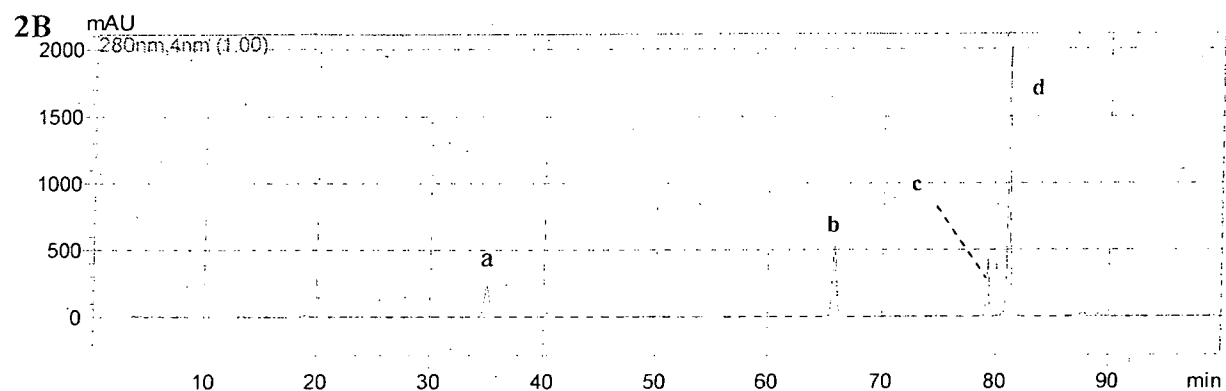


FIGURE 3

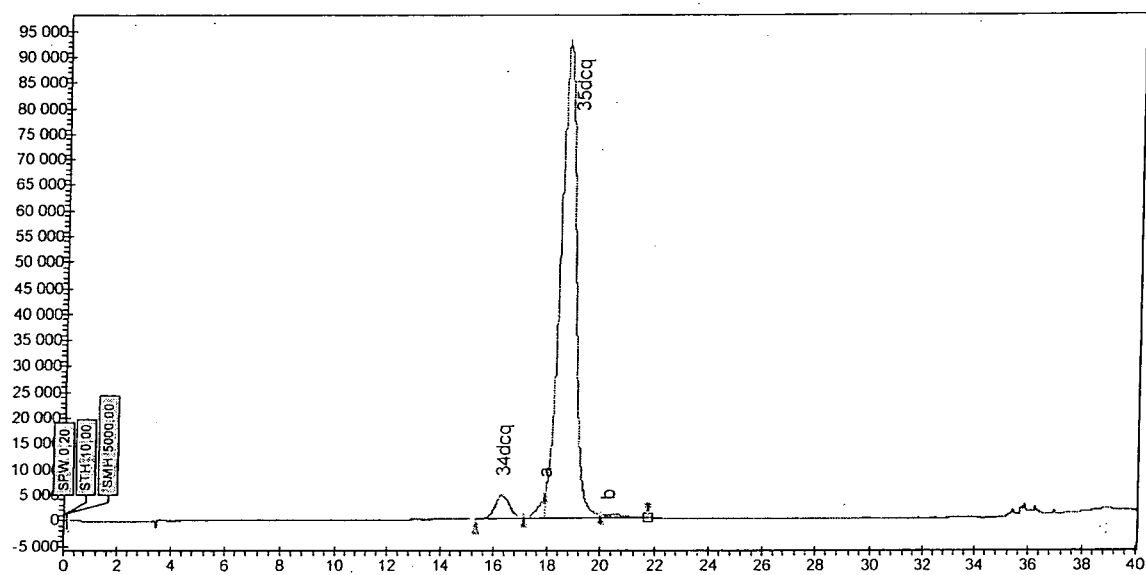


Figure 4

Condition		Matière sèche racinaire (g)	Teneur en 3,5-diCQ (mg.g ⁻¹ MS)	Quantité de 3,5-diCQ par plante (mg)
	Milieu/solution/éclairage			
A	Liquide/eau/obs	0,30	45,7	13,9
B	Liquide/eau/lum	0,31	92,0	28,2
C	Liquide/sol 0.05 mM N/obs	0,33	30,9	10,0
D	Liquide/sol 6 mM N/obs	1,57	20,6	32,0
E	Perlite/eau/obs	0,68	36,3	24,9
F	Perlite/sol 6 mM N/obs	1,75	14,8	25,4

Figure 5

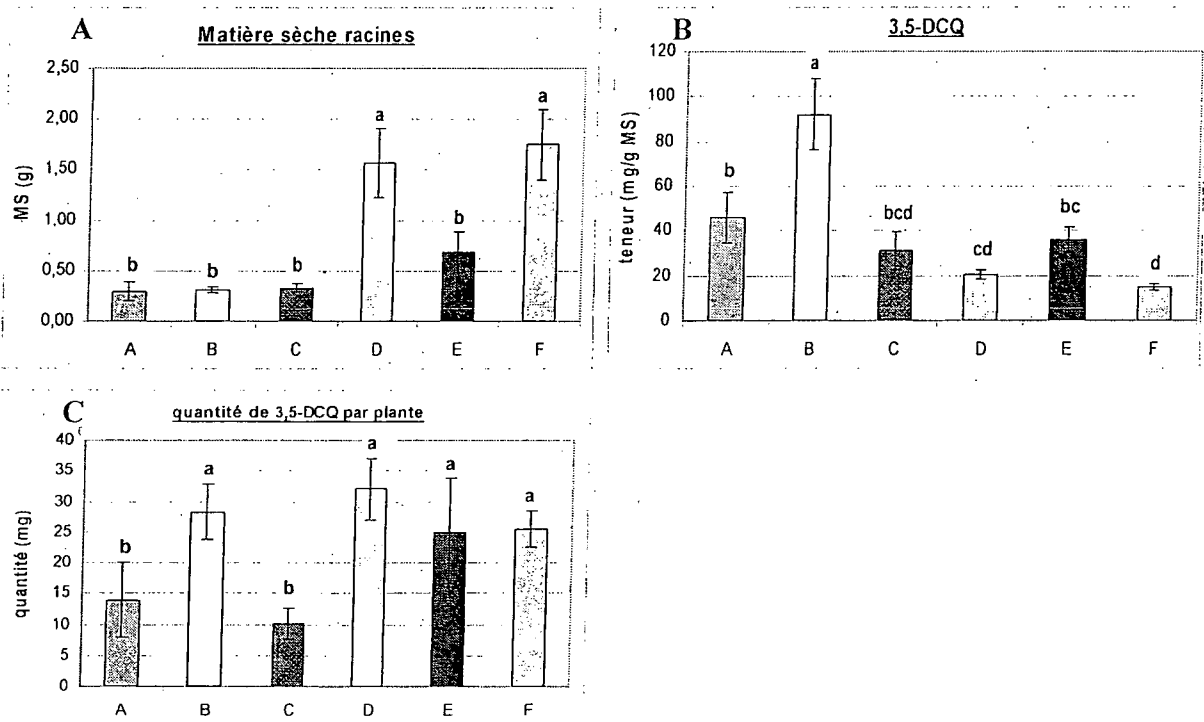


Figure 6

Condition		Matière sèche racinaire (g)	Teneur en 3,5-diCQ (mg.g ⁻¹ MS)	Quantité de 3,5-diCQ par plante (mg)
	Milieu/solution/éclairage			
E	Liquide/eau/obs	0,315	51,13	16,10
F	Liquide/sol 6 mM N, 1 mM P/obs	0,677	25,11	17,38
G	Liquide/sol 0 mM N, 1 mM P/obs	0,469	28,11	12,95
H	Liquide/sol 6 mM N, 0 mM P/obs	0,445	35,09	16,85

Figure 7

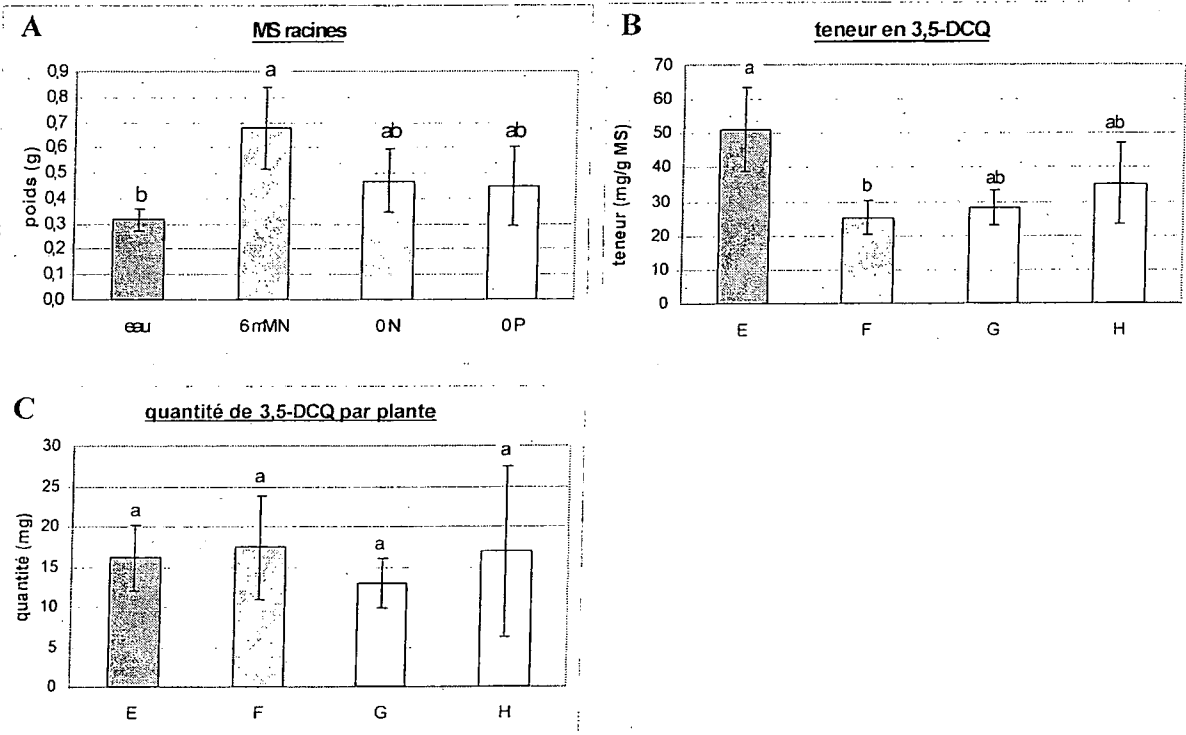
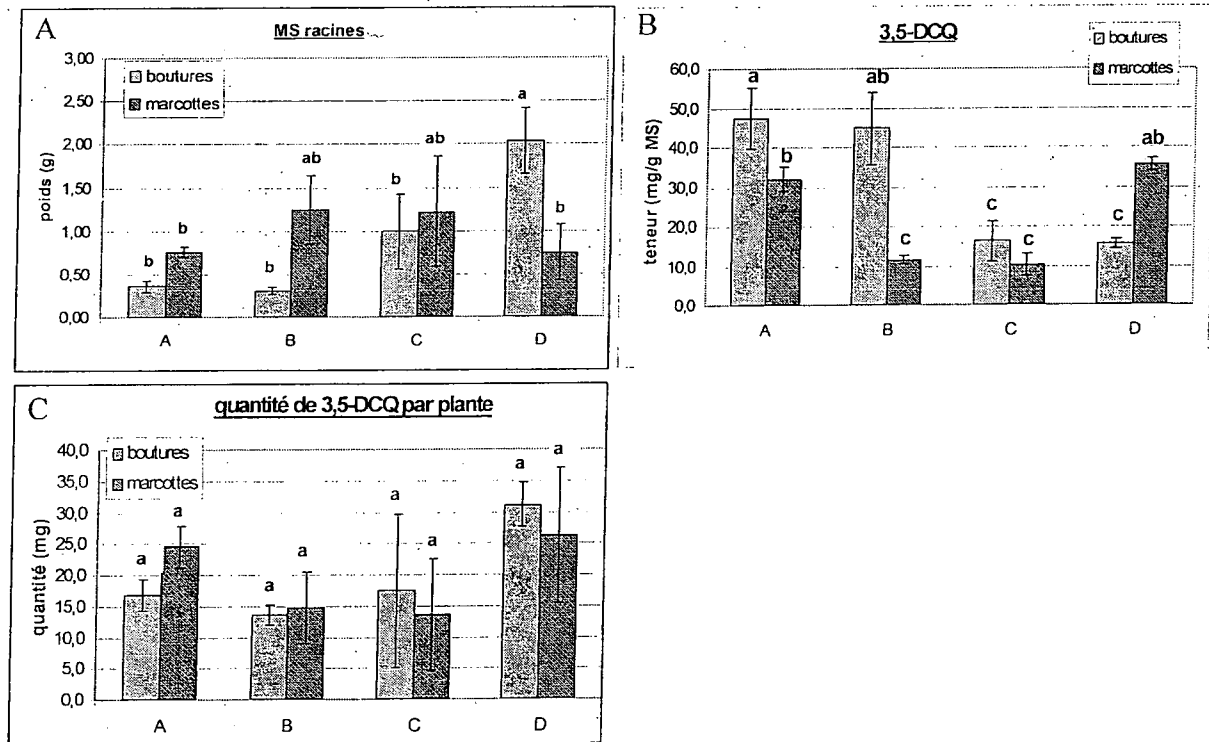


Figure 8

Condition			Matière sèche (g)		Teneur 3,5-diCQ (mg.g ⁻¹ MS)		Q 3,5-diCQ/plante (mg)		
	boutures	marcottés	boutures	marcottés	boutures	marcottés	boutures	marcottés	Total par plant
A	Eau	Eau	0,36	0,77	47,4	31,9	16,8	24,5	41.3
B	Eau	Solution	0,31	1,25	44,7	11,6	13,6	14,7	28.3
C	Solutions	Solution	0,99	1,22	16,2	10,2	17,4	13,6	31.0
D	Solution	Eau	2,03	0,74	15,5	35,5	31,1	26,2	57.3

Figure 9



11/25

FIGURE 10

	Masse Moléculaire	mM	Pour 100 mL
Acides aminés (L)			mg
Alanine	89,09	20,06	178,71
β-alanine	89,1	0,70	6,22
Arginine	174,2	14,06	244,90
Asparagine H ₂ O	150,14	19,88	298,55
Acide aspartique	133,11	6,63	88,25
Cystéine	121,16	2,44	29,59
Acide glutamique	147,13	10,15	149,36
Glutamine	146,15	30,49	445,61
Glycine	75,07	22,19	166,56
Histidine HCl H ₂ O	209,63	6,49	136,02
Isoleucine (allo free)	131,18	12,56	164,75
Leucine	131,18	17,65	231,56
Lysine HCl	182,65	19,22	351,09
Méthionine	149,21	4,85	72,35
Ornithine HCl	168,62	0,56	9,41
Phénylalanine	165,19	17,83	294,53
Proline	115,13	11,23	129,33
Sérine	105,09	11,83	124,28
Thréonine (allo free)	119,12	10,67	127,16
Tryptophane	204,23	2,09	42,75
Tyrosine	181,19	2,13	38,63
Valine	117,15	16,29	190,85
Total		260,01	3520,45
Saccharose	342,3	584,28	20000,00
Rapport Saccharose/AA		2,25	
Vitamines			(mg)
Acide p-aminobenzoïque			10,00
Acide L-ascorbique			100,00
Biotine			0,10
D-Panthothénate de calcium			5,00
Chlorure de choline			50,00
Acide folique			1,00
i-Inositol anhydre			42,00
Amide nicotinique			10,00
Pyridoxine HCl			2,50
Riboflavine			0,50
Thiamine HCl			2,50
Métaux traces			(mg)
CuSO ₄ , 5H ₂ O			0,47
FeCl ₃ , 6H ₂ O			4,45
MnCl ₂ , 4H ₂ O			0,65
NaCl			2,54
ZnCl ₂			0,83
Divers			(mg)
Citrate de calcium			10,00
Benzoate de cholestérol			2,50
MgSO ₄ 7H ₂ O			242,00
KH ₂ PO ₄			250,00

FIGURE 11

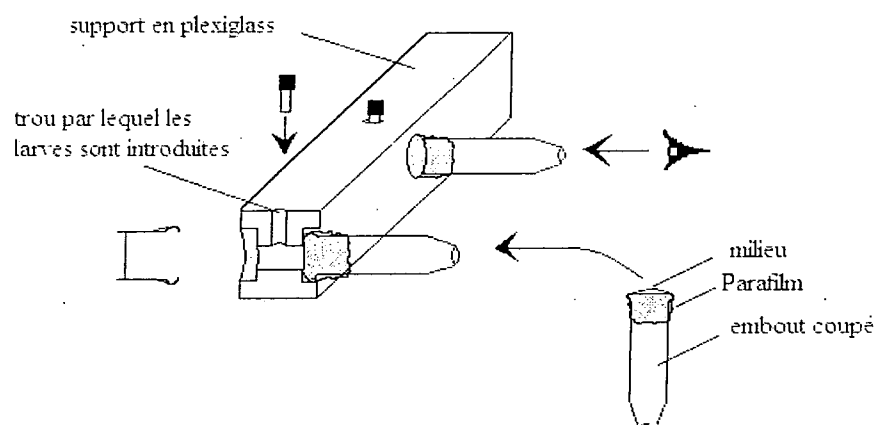


FIGURE 12

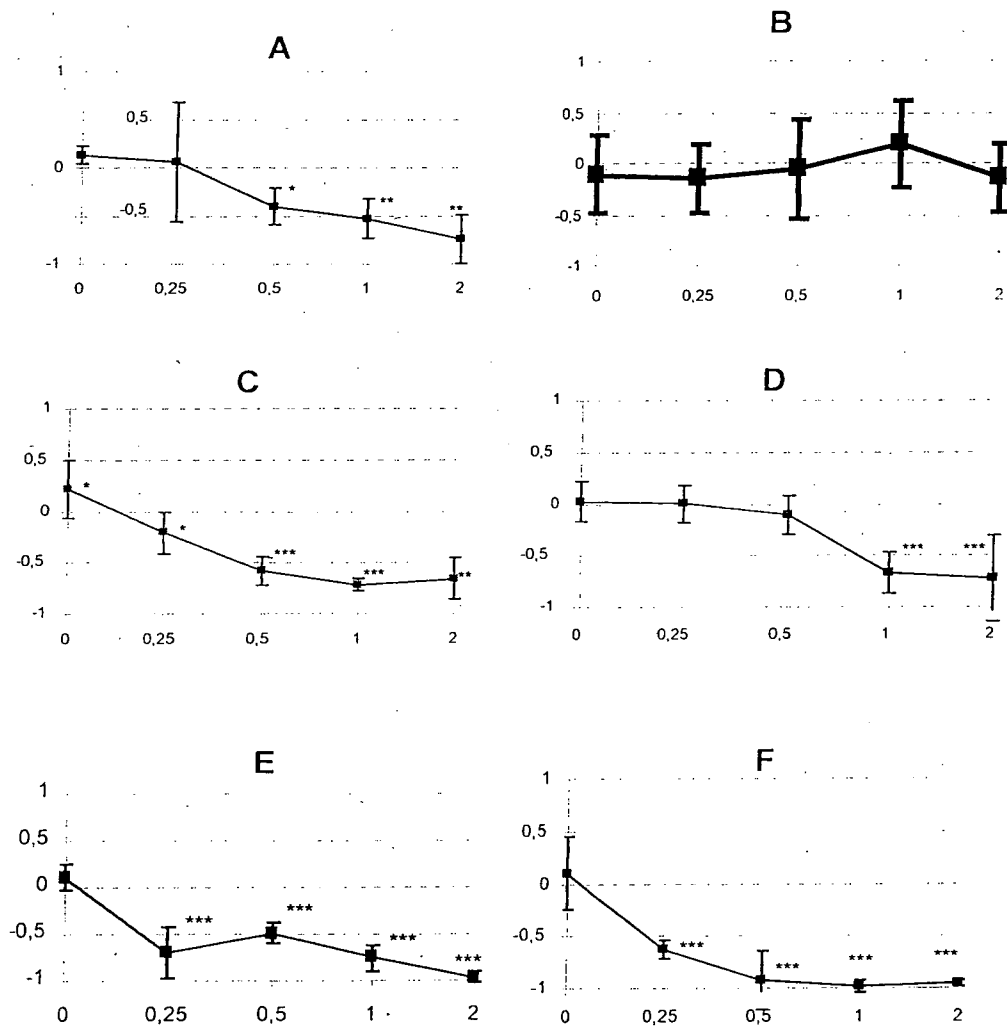


FIGURE 13

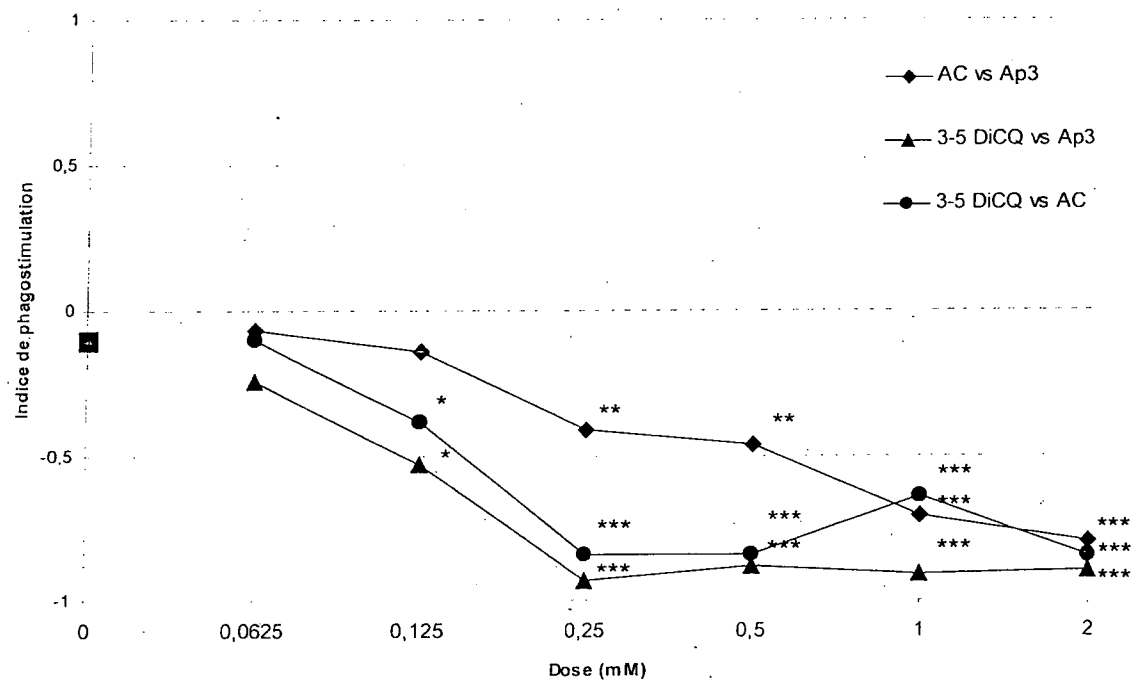


FIGURE 14

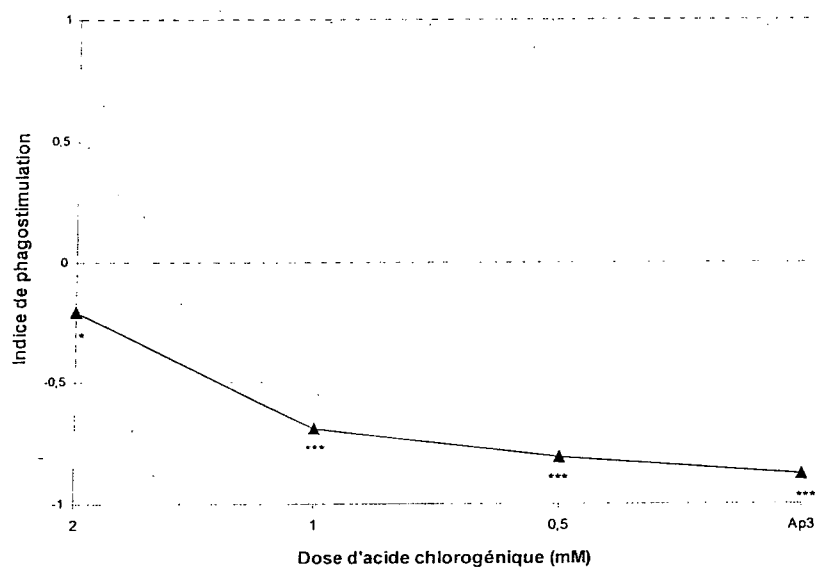


Figure 15

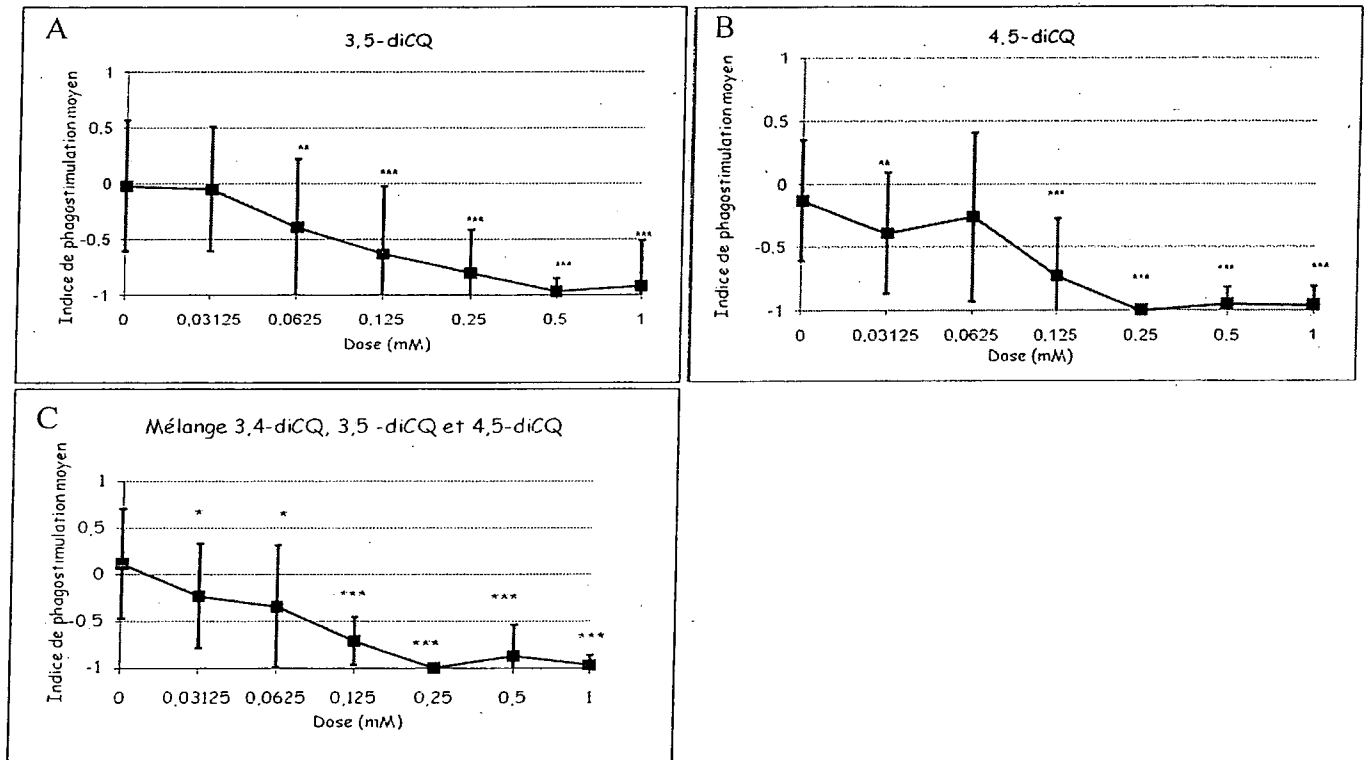


FIGURE 16

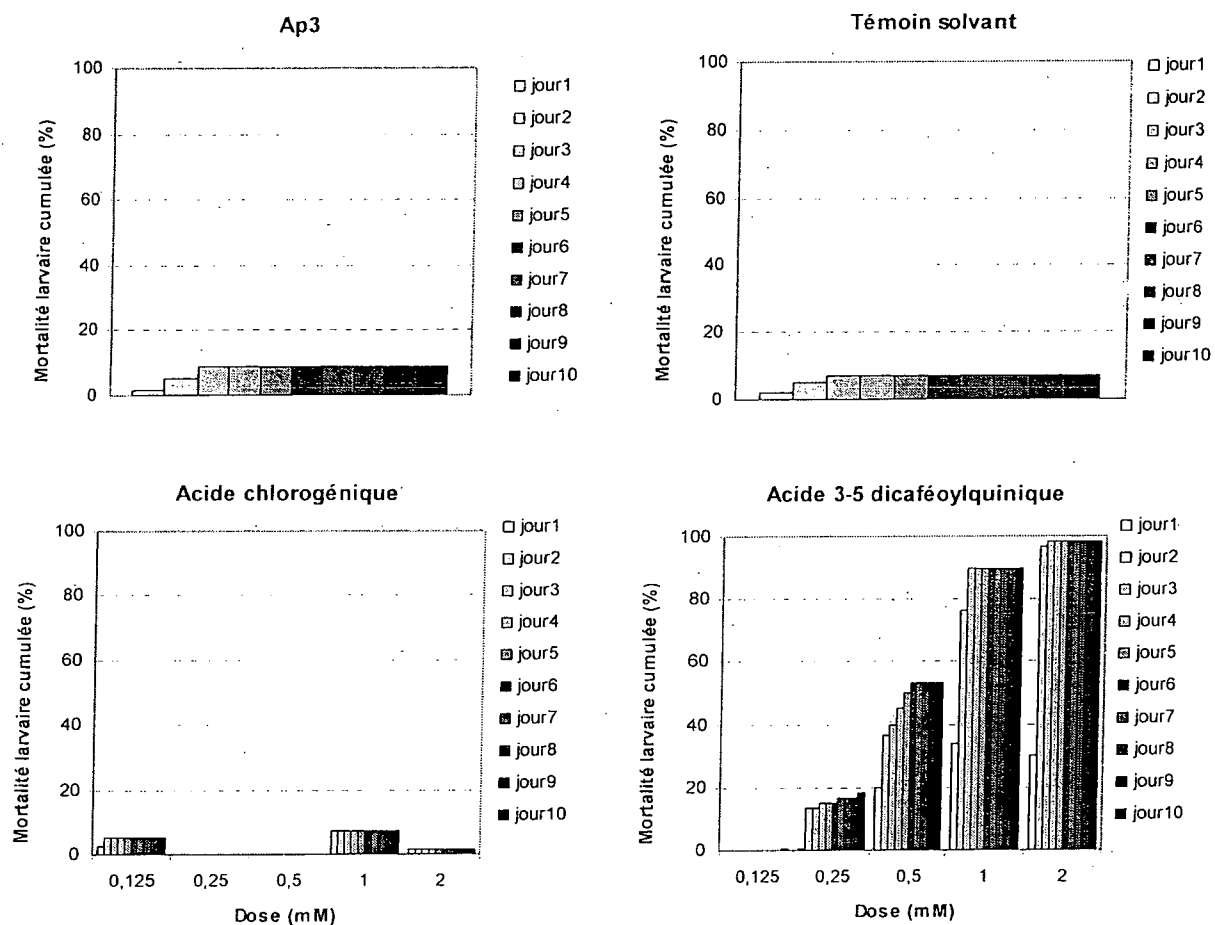


FIGURE 17

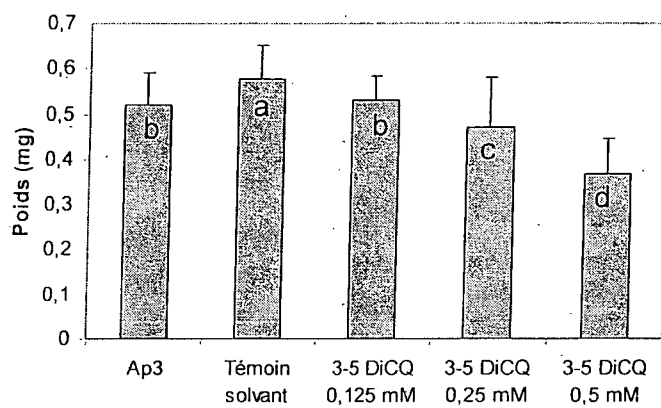


FIGURE 18

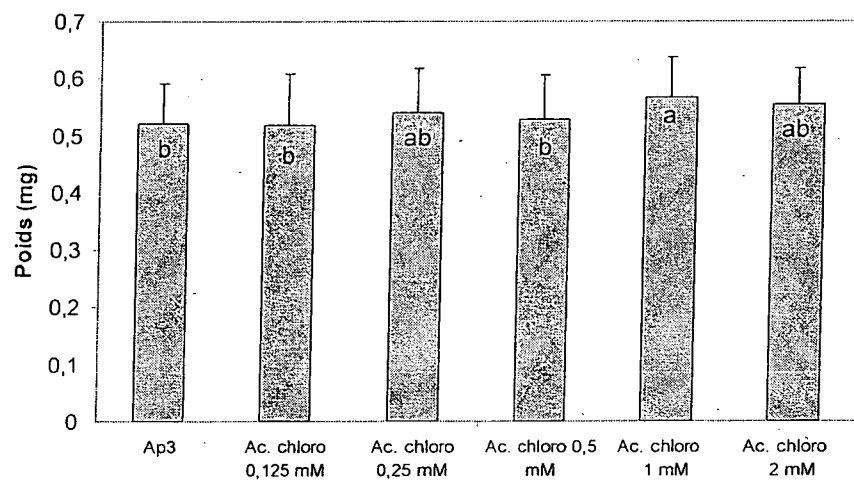


Figure 19

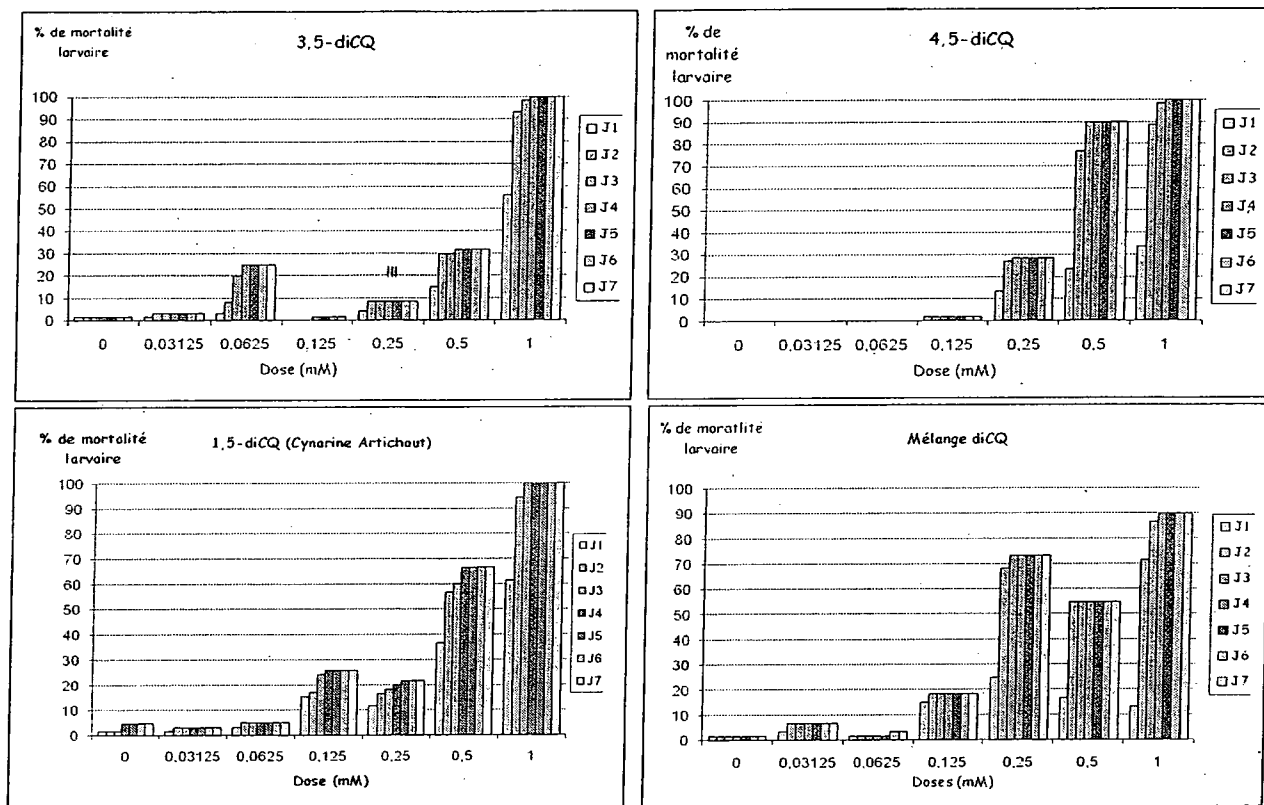


Figure 20

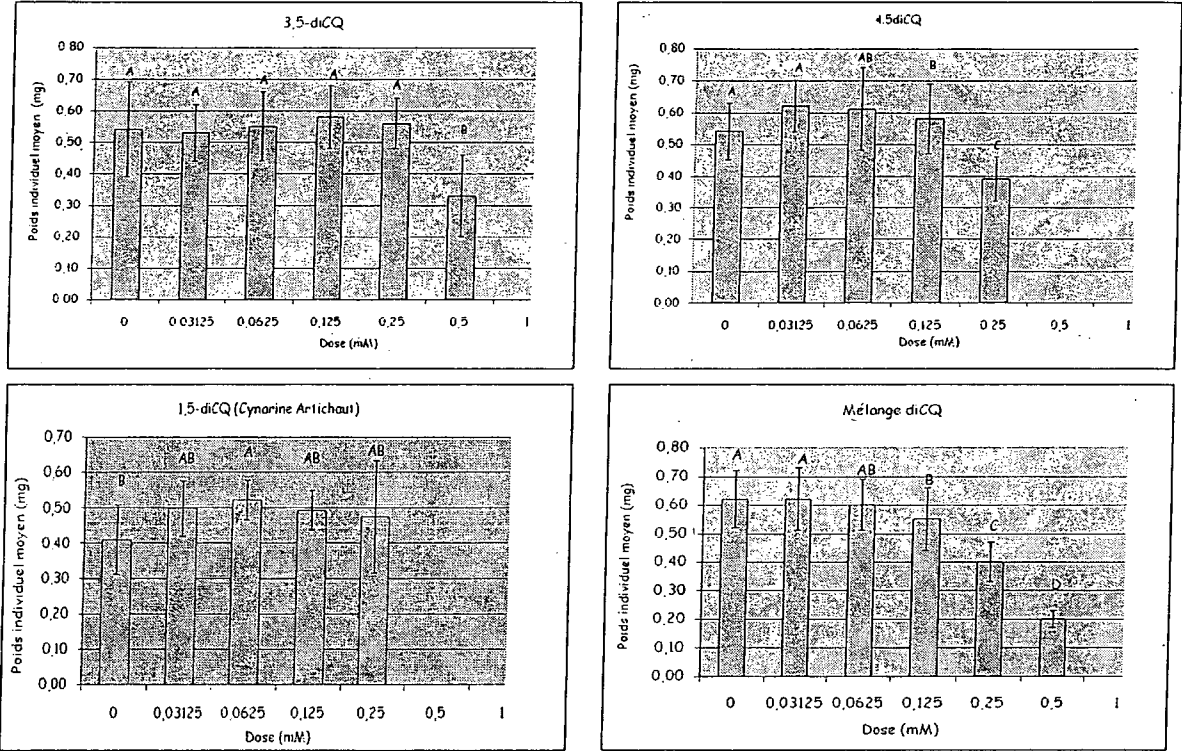


Figure 21

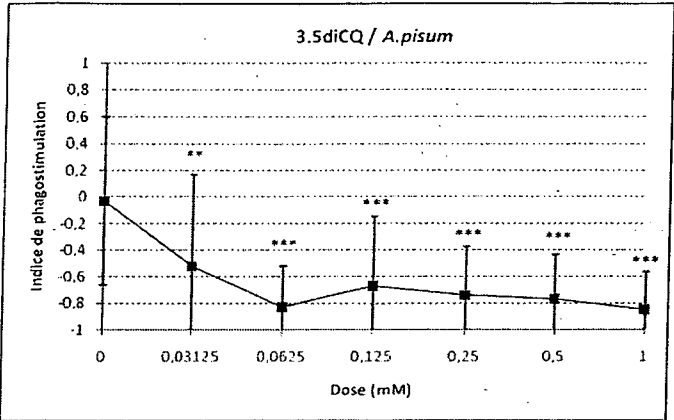


Figure 22

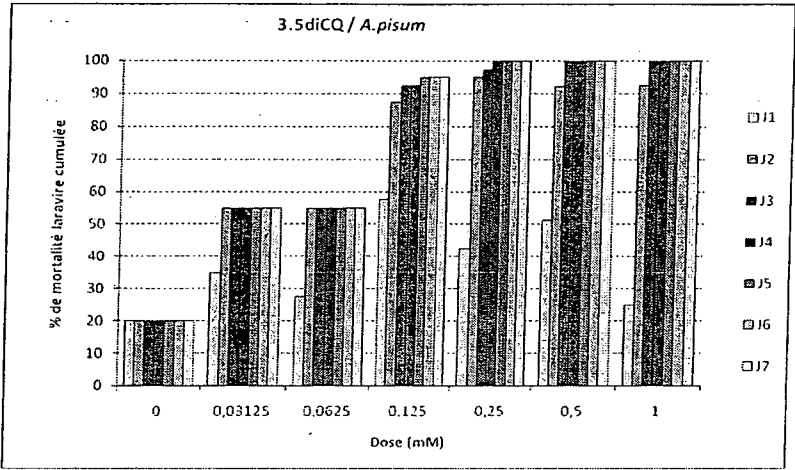


Figure 23

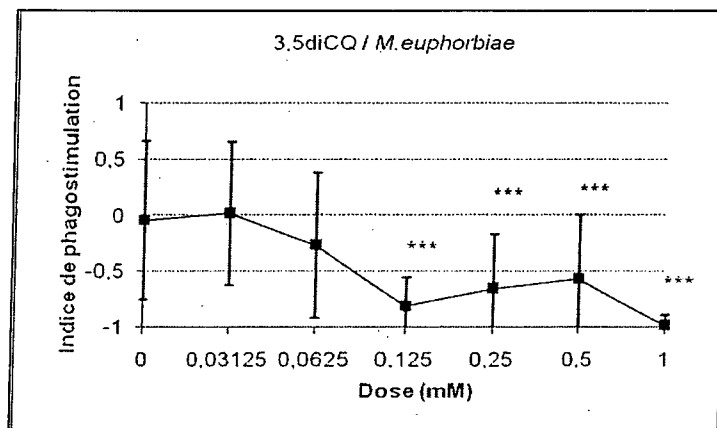


Figure 24

