



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A01C 1/06</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 97/43894 (43) Date de publication internationale: 27 novembre 1997 (27.11.97)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00874 (22) Date de dépôt international: 16 mai 1997 (16.05.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/06215 20 mai 1996 (20.05.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE DE MICROENCAPSULATION [FR/FR]; 8, rue André Boquel, F-49100 Angers (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): AMIET-CHARPENTIER, Caroline [FR/FR]; 30, rue Joseph Cussonneau, F-49100 Angers (FR). BENOIT, Jean-Pierre [FR/FR]; 45, allée des Chataigniers, F-49240 Avrille (FR). RICHARD, Joël [FR/FR]; La Modtais - Blou, F-49160 Longue (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>

(54) Title: MICROPARTICLES CONTAINING BACTERIA, PRODUCTION METHOD AND USE OF SAID MICROPARTICLES FOR COATING SEEDS AND IN AGRI-FOOD COMPOSITIONS

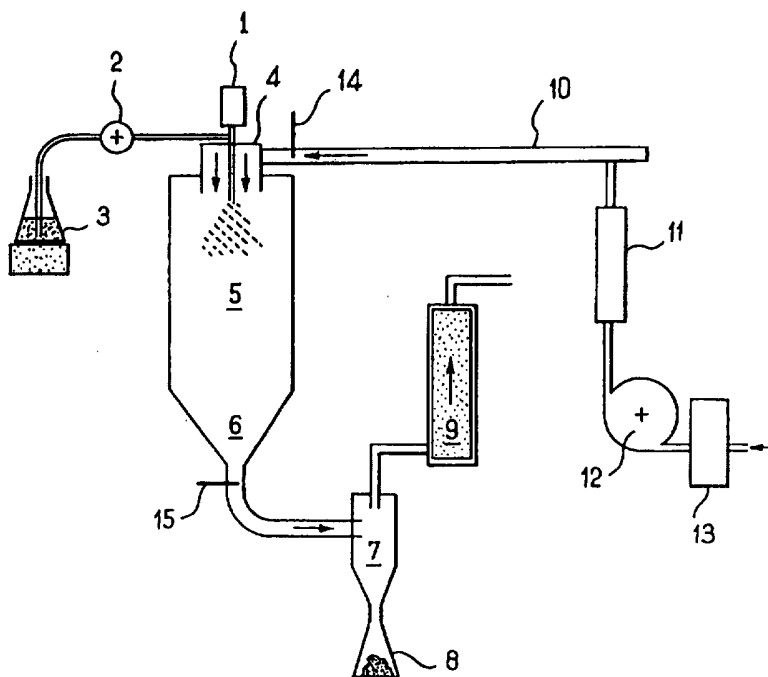
(54) Titre: MICROPARTICULES CONTENANT DES BACTERIES, PROCEDE DE PRODUCTION ET UTILISATION DESDITES MICROPARTICULES POUR L'ENROBAGE DE SEMENCES ET DANS LES COMPOSITIONS AGROALIMENTAIRES

(57) Abstract

The invention features microparticles useful particularly for treating seeds and in agri-food compositions, characterised in that they are constituted by a matrix of water soluble, water-dispersed or water-dispersible polymers, of an effective amount of bacteria and an appropriate amount of water to enable the bacteria to survive. The invention also features a production method of the said particles by hot air pulverisation of a suspension. It also features seeds treated by a dispersion containing these microparticles and agri-food compositions containing such microparticles.

(57) Abrégé

L'invention concerne des microparticules utiles notamment pour le traitement des semences et dans les compositions agroalimentaires, caractérisées en ce qu'elles sont formées d'une matrice de polymères hydrosolubles, hydrodispersées, ou hydrodispersables, d'une quantité efficace de bactéries et d'une quantité d'eau appropriée pour permettre la survie desdites bactéries. L'invention concerne également un procédé de production desdites microparticules par pulvérisation d'une suspension sous air chaud. Elle concerne également les semences traitées par une dispersion contenant ces microparticules et les compositions agroalimentaires contenant de telles microparticules.



L'invention concerne également les semences traitées par une dispersion contenant ces microparticules et les compositions agroalimentaires contenant de telles microparticules.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

MICROPARTICULES CONTENANT DES BACTÉRIES, PROCÉDÉ DE PRODUCTION ET UTILISATION DESDITES MICROPARTICULES POUR L'ENROBAGE DE SEMENCES ET DANS LES COMPOSITIONS AGROALIMENTAIRES

5 La présente invention est relative à de nouvelles microparticules à base de polymères, contenant des bactéries, utiles notamment pour l'inoculation de semences et dans les compositions agroalimentaires. Elle a également pour objet un procédé de production de telles microparticules ainsi que les microparticules susceptibles d'être obtenues par ledit procédé.

10 L'invention est également relative à l'application de ces microparticules pour l'enrobage ou le pelliculage des semences et aux semences enrobées par lesdites microparticules.

 Elle concerne enfin les compositions agroalimentaires contenant de telles microparticules.

15 Dans l'industrie des semences, on recherche depuis de nombreuses années le moyen d'inoculer des plantes par des bactéries stimulatrices de la croissance des végétaux afin d'améliorer les récoltes et réduire l'emploi de pesticides.

 On distingue schématiquement deux types d'inoculation :

20 - la bactérisation indirecte qui implique l'utilisation de "billes bactériennes" mises en contact, simultanément avec les semences, lors du semis,

 - la bactérisation directe qui consiste à inoculer directement les semences sous forme d'un enrobage ou revêtement incluant lesdites
25 bactéries.

 A l'heure actuelle, la bactérisation indirecte a été essentiellement étudiée. De nombreux travaux ont en effet permis de former des granules de bactéries à base de polymères tels que les polyacrylamides (Dommergues et al, Appl. Environ. Microbiol., 37 (4), 779-781, 1979) ou les polysaccharides comme
30 l'alginate (Van Elsas et al Biol. Fertil:Soils, 14, 14-22, 1992 ou Diem et al, AISI,

Santa Margherita Ligure, Italy, 25-29 Sept., 196-210, 1988) ou les K-carraghenanes (Trevors et al, Microbial releases, 1, 61-69, 1992) ou les I-carraghenanes (Bashan, Appl. Environ. Microbiol., 51(5), 1089-1098, 1986) ou le xanthane (Jung et al, Plant and Soil, 65, 219-231, 1982 ou Mugnier et al, Appl. Environ. Microbiol., 50(1), 108-114, 1985).

En outre, plusieurs demandes de brevet relatives aux travaux précités décrivent l'obtention et l'utilisation de telles bactéries enrobées.

La demande de brevet FR-A-2615203 décrit une méthode d'encapsulation par coextrusion permettant d'obtenir des granules sphériques d'un diamètre de 6 mm environ contenant environ 10^8 bactéries chacune.

La demande de brevet européen n° EP-A-295 968 décrit des engrais contenant des microorganismes isolés de la rhizosphère, et obtenus par microencapsulation dans une matrice de polysaccharide.

La demande de brevet européen n° EP-A-17 565 décrit l'inclusion de rhizobiums dans un polymère polysaccharidique, destinés à l'inoculation des légumineuses, en vue d'augmenter leur potentiel fixateur d'azote.

Cependant cette méthode de bactérisation indirecte ne convient pas à l'industrie des semences qui préfère commercialiser un produit prêt à l'emploi évitant ainsi l'étape de bactérisation in situ lors du semis.

Dans cette optique, Bashan Y. (Appl. Environ. Microbiol., 51(5) 1089-1098 (1986)) a décrit la bactérisation directe de semences de blé par des bactéries bénéfiques de la rhizosphère. Ces dernières étaient incluses dans l'enrobage d'alginate de calcium de semences. Cette technique d'encapsulation des semences avec un alginate renfermant des bactéries s'est révélée non applicable, selon Bashan, en raison d'une incompatibilité de conservation entre bactéries et semences : ces dernières nécessitent un environnement sec sinon elles germent précocement, alors que les microorganismes exigent un taux d'humidité plus important pour survivre.

On a également proposé (Digat, Edit. C. Keel; B. Koller, G. Defagot. I.O.B.C. / W.P.R.S. bulletin, XIV-8, 383-391, 1991) la bactérisation directe par des bactéries rhizosphériques, de différentes sortes de semences (pois, soja, maïs, laitue, betterave, tomate) par une technique de double inclusion dans des granulés d'alginate de calcium (environ 10^8 bactéries par semence). La

viabilité bactérienne est estimée après une déshydratation des semences enrobées après une heure à 40° C. Celle-ci est de plus de 10⁷ bactéries par semence pour les différents types de semences testées.

Enfin Callan et al (Hort. Science, 26 (9), 1163-1165, 1991) ont
5 montré in vivo qu'il était possible avec des semences de maïs pelliculées avec une suspension de *Pseudomonas fluorescens* d'obtenir dans une solution de méthylcellulose à 1,5 % une protection égale ou supérieure au fongicide, contre l'attaque par *Pythium ultimum*, que la pression de la maladie causée par le champignon soit sévère, modérée ou faible.

10 Par ailleurs, on cite les documents suivants :

EP-A- 494 802 décrit des graines revêtues de particules d'un polysaccharide au moins partiellement polymérisé contenant des cellules déshydratées d'un microorganisme ayant un effet bénéfique sur la croissance de la plante cultivée. Ces particules sont obtenues par broyage
15 d'un gel séché d'un polysaccharide au moins partiellement polymérisé contenant des cellules d'un microorganisme désiré (cf. page 3, lignes 39 et 40). Les particules ne contiennent pas une quantité d'eau appropriée pour permettre la survie desdites bactéries.

On se référera de plus à la publication Bashan Y. discutée ci-dessus
20 qui explique que cette technique d'encapsulation à sec des semences présente de nombreux inconvénients étant donné que les microorganismes exigent, au contraire de ce document, un taux d'humidité suffisant pour survivre.

Bashan signale notamment que lorsque l'on procède à une bactérisation directe par une solution d'alginate contenant des bactéries et que l'on sèche à 50°C l'enrobage, on a une perte immédiate en bactéries
25 vivantes, le nombre de bactéries passant de 10⁸ à 10² bactéries par semence.

EP-A- 377 370 concerne un procédé d'encapsulation de particules de principe actif par pulvérisation d'un copolymère silicone thermoplastique en solution dans un solvant organique ou en dispersion ou en émulsion
30 aqueuse et élimination par séchage à l'air chaud du solvant ou de l'eau. Ce document décrit en fait un film polymérique enrobant une particule qui ne peut être une bactérie et qui est en tout état de cause déshydratée.

FR-A- 2 615 603 décrit des granulés biodégradables comprenant un noyau consistant en une matrice nourricière enrobant les microorganismes à inoculer, et une enveloppe protectrice poreuse enrobant ledit noyau.

5 Ces granulés sont de dimension macroscopique de diamètre compris entre 3 mm et 12 mm (cf. page 5, lignes 25-30) soit 100 fois supérieure aux microparticules selon l'invention. Leur taille supérieure ou mm ne permet pas une bactérisation directe des semences.

10 On remarquera en outre que les granulés décrits dans ce document ne sont pas destinés à l'enrobage de semences. Le passage page 7, lignes 28-31 du document ne se réfère pas à l'enrobage de semences avec les granulés mais simplement au fait que l'extrait nutritif dans lequel les microorganismes sont enrobés peut également servir d'enrobage à des semences.

15 EP-A- 17 565 décrit un procédé d'inclusion de microorganismes dans une matrice constituée par un gel de polymère, le gel étant associé à une substance à grande capacité d'absorption d'eau de manière à obtenir un mélange gel + absorbant ayant une teneur en eau supérieure à 50 %.

20 On notera que les granulés obtenus présentent un diamètre de l'ordre de 3 mm (cf. page 7, lignes 46 à 57). Par ailleurs, ce document se réfère à la bactérisation indirecte telle qu'elle est définie ci-dessus.

25 EP-A- 295 968 se réfère à des engrais contenant des microorganismes conditionnés par microencapsulation dans une matrice de polysaccharide. Le microorganisme encapsulé se présente généralement sous forme d'une poudre beige claire pouvant être mélangée à tout engrais contenant de l'azote et/ou du phosphore et/ou du potassium (cf. colonne 2, lignes 22-27). Il s'agit donc à nouveau d'une encapsulation de bactéries sous forme déshydratée.

30 EP-A- 253 673 décrit des semences revêtues d'un film comprenant des microorganismes et un copolymère du type vinyl pyrrolidone et vinyl acétate ou styrène ou styrène substitué.

Il ne s'agit en aucune manière de microparticules mais plutôt d'une composition particulière de polymères enrobant les semences. Ce document se réfère à la technique bien connue d'enrobage ou de pelliculage. On notera que les microorganismes ne sont pas hydratés car si cela était le cas, cela provoquerait la germination prématurée des graines.

EP-A- 145 086 décrit des semences enrobées au moyen d'un polyester qui peut comprendre des bactéries. Il s'agit donc de la même technique d'enrobage que celle décrite dans le document précédent, c'est-à-dire avec des bactéries déshydratées.

US-A- 5 113 619 se réfère également à la technique d'enrobage bien connue de semences par un film contenant des bactéries.

Il apparaît donc que jusqu'à présent il n'a pas été possible de produire des semences, associées à des bactéries, présentant une durée de conservation suffisante pour qu'elles puissent être utilisées plusieurs mois après leur enrichissement en bactéries.

L'objet de la présente invention est en particulier de résoudre ce problème.

Un autre objet de la présente invention est de proposer de nouvelles microparticules contenant des bactéries et permettant de préserver leur viabilité pendant une durée appropriée. Cette propriété peut être valorisée aussi bien dans le domaine de la bactérisation de semences que dans l'alimentation animale vu que les bactéries notamment de type lactique ont un effet probiotique.

La solution au problème indiqué ci-dessus réside en premier lieu dans une nouvelle microparticule, utile notamment pour le traitement des semences, caractérisée en ce qu'elle est formée d'une matrice de polymères hydrosolubles, hydrodispersés ou hydrodispersables, d'une quantité efficace de bactéries et d'une quantité d'eau appropriée pour permettre la survie desdites bactéries.

On définit ci-après les termes suivants :

- quantité efficace : quantité de bactéries qui, lorsque la microparticule de polymère est désagrégée, permet de libérer des bactéries en nombre d'unités formant colonie (UFC) suffisant pour assurer le résultat technique recherché, par exemple la croissance des végétaux ou la protection
5 contre certains champignons nuisibles.

- quantité appropriée : teneur en eau suffisante pour assurer la survie des bactéries encapsulées.

- hydrosolubles, hydrodispersés ou hydrodispersables : polymères pouvant être solubilisés ou dispersés par action de l'eau.

10 Par "microparticule" on entend des particules dont le diamètre est inférieur à 1 mm, de préférence à 500 μm . Les microparticules peuvent se présenter sous la forme de microsphères (bactéries noyées dans la matière) ou de microcapsules (bactéries au centre de la microcapsule).

15 On a en effet trouvé de façon surprenante qu'il était possible d'obtenir, par un procédé de séchage à sec (en anglais "spray-drying") dont les paramètres ont été judicieusement choisis, des microparticules présentant les caractéristiques appropriées à l'enrobage des semences et pour les compositions agroalimentaires et plus particulièrement contenant des bactéries dont le nombre d'unités formant colonie (UFC) est suffisant, même
20 après plusieurs mois, pour une utilisation dans l'industrie.

Il faut noter que l'invention n'est pas limitée à l'utilisation des microparticules dans le domaine de la croissance des végétaux. Bien au contraire, l'invention trouvera d'autres applications selon les bactéries contenues dans la microparticule, en particulier dans le domaine
25 agroalimentaire.

On décrira en premier lieu les microparticules objet de l'invention puis le procédé pour les obtenir et enfin l'application de celles-ci.

La proportion en matrice de la microparticule est généralement comprise entre 70 et 99,9 %, et préférentiellement entre 85 et 99,5%.

30 Les microparticules ont généralement un diamètre moyen compris entre 1 et 100 μm . De préférence, entre 2 et 50 μm .

A l'intérieur de cet intervalle selon les applications des microparticules, le diamètre pourra varier de façon significative. Ainsi dans le cas de l'application à l'enrobage des semences il sera avantageusement compris entre 5 et 35 μm .

5 La largeur de la distribution de taille est généralement comprise entre 1 et 30 μm .

Une des caractéristiques essentielles des microparticules selon l'invention est leur teneur en eau résiduelle.

10 Cette teneur résiduelle en eau est en effet nécessaire pour assurer la survie des bactéries. Cette teneur sera généralement comprise entre 4 et 30% en poids, et préférentiellement entre 8 et 25 %, cette teneur dépendant, en outre, de la nature des bactéries encapsulées.

15 La proportion de bactéries est définie par le nombre d'unités formant colonie UFC pour un gramme de particules. En général la proportion est supérieure à 10^6 et de préférence comprise entre 10^8 et 10^{11} UFC/g de particules.

20 Typiquement après trois mois dans les conditions appropriées, la proportion de bactéries par gramme de microparticules est supérieure à 10^5 UFC et n'a pas diminué de plus d'un facteur 10^3 par rapport à la proportion initiale de bactéries.

Le nombre de bactéries par microparticule peut être déduit du nombre de bactéries par gramme de microparticules lorsque l'on connaît le diamètre desdites particules. Bien évidemment, ce nombre variera en fonction du diamètre.

25 Par exemple pour une microparticule d'un diamètre 20 μm , le nombre de bactéries est compris entre 1 et 90. Pour un diamètre de 30 μm , il est compris entre 2 et 300 ; pour un diamètre de 40 μm , il est compris entre 4 et 700.

30 Parmi les polymères hydrosolubles, hydrodispersés ou hydrodispersables on peut citer les polymères vinyliques fonctionnalisés par des groupements ionisables ou polaires, les polymères acryliques ou méthacryliques, les polysaccharides éventuellement modifiés.

Les groupements ionisables ou polaires sont plus particulièrement les substituants des monomères dont dérivent les polymères vinyliques. Parmi ceux-ci on peut citer à titre indicatif les groupements COOH, SO₃H, SO₄H, NH₂, pyridine, pyrrolidone, OH, diméthyléthylamine.

5 Selon une variante préférée, les polymères acryliques ou méthacryliques sont choisis parmi les homopolymères ou copolymères acryliques ou méthacryliques.

Parmi les polysaccharides, on peut citer à titre non limitatif :

10 - l'amidon ou l'amidon modifié comme les carboxyméthylamidons, les polysaccharides résultant de la dépolymérisation par une méthode physique, chimique ou enzymatique,

15 - la cellulose ou la cellulose modifiée comme les carboxyméthylcelluloses, l'éthylcellulose, l'hydroxyméthylcellulose, l'hydroxyéthylcellulose, l'hydroxypropylcellulose, la méthylhydroxyéthylcellulose, la méthylhydroxypropylcellulose, les polysaccharides résultant de la dépolymérisation par une méthode physique, chimique ou enzymatique.

20 - les alginates, extraits d'algues brunes,
- les carraghénanes de type lambda, iota ou kappa extraits d'algues rouges,
- les pectines extraites des citrons, des pommes ou des betteraves,
- les pectates qui résultent de la déméthylation des pectines,
- les guar, les guar modifiées tels que les carboxyméthylguar,
- les xanthanes,
25 - les chitosans.

De préférence, les microparticules à base de polysaccharides selon l'invention sont formées d'amidon, de cellulose, d'agar-agar ou d'éthylcellulose.

30 Les masses molaires des polymères hydrosolubles sont comprises entre 3000 et 10⁵ g/mole et préférentiellement entre 5000 et 70 000 g/mole. Les masses molaires des polymères hydrodispersés ou hydrodispersables sont comprises entre 60 000 et 2.10⁶ g/mole et préférentiellement entre 80 000 et 5.10⁵ g/mole.

Parmi les bactéries assurant la croissance des végétaux on peut citer : les bactéries du genre *Pseudomonas fluorescens-putida* qui sont des rhizobactéries en forme de bâtonnets gram négatif et aérobies. On peut également citer *Azospirillum brasilense* et *Bradyrhizobium japonicum*.

5 Parmi les bactéries à usage alimentaire on peut citer *Lactobacillus acidophilus* ou *Streptococcus salivarius* ou d'autres bactéries lactiques.

Parmi les bactéries à usage pharmaceutique on peut citer, *Bifidobacterium pseudolongum* qui a un rôle bénéfique au niveau de la microflore intestinale humaine et animale.

10 Dans le cas des microparticules à base de polysaccharides, il est avantageux que celles-ci comprennent un agent de protection à forte rétention d'eau permettant d'améliorer la teneur résiduelle en eau desdites microparticules.

Parmi ces agents de rétention encore appelés agents protectants, 15 on peut citer les produits dérivés du lait (lait en poudre, Carbélaç WB 700-R, Carbélaç 35®, Clar 101®) les hydrolysats tels que la caséine, la levure, le milieu de culture MRS base. Ces agents ont en outre pour fonction de constituer la base du milieu favorable à la conservation de la biomasse à l'intérieur de la microparticule.

20 Ces agents seront présents dans un rapport polymère/agent de rétention de l'eau compris entre 60/40 et 90/10. Ils peuvent bien entendu être également présents dans le cas de microparticules à base de polymères vinyliques ou acryliques.

25 D'autres agents hygroscopiques présents par rapport aux polymères secs tels que la silice hydrophile (jusqu'à 10 %) sont avantageusement associés aux polymères hydrosolubles, hydrodispersés ou hydrodispersables.

30 Il est également possible d'y ajouter en faible quantité certains additifs servant de substrat potentiel durant le stockage. Ces additifs favorisent également la survie des bactéries au cours du procédé de séchage qui sera décrit ci-après et permettent de protéger les bactéries de l'oxygène actif. Parmi ces additifs on peut citer : le carbonate de calcium, le R-glycérophosphate, le glutamate de sodium, la vitamine C, le glucose, le lactose.

Les additifs sont généralement présents à raison de 0,5 à 30 % en poids par rapport au polymère, et préférentiellement de 1 à 20 %.

L'invention concerne également un procédé de production de microparticules telles que décrites précédemment, caractérisé en ce qu'une solution ou dispersion aqueuse comprenant un polymère hydrosoluble ou hydrodispersable, une suspension bactérienne, éventuellement un agent de protection, un agent hygroscopique et des additifs est pulvérisée sous courant d'air chaud puis en ce que les microparticules sont récupérées. Ces microcapsules sont récupérées notamment par séparation du courant d'air chaud.

La technique par séchage à air chaud d'une pulvérisation (en anglais "spray drying") est largement répandue dans l'industrie chimique, l'industrie alimentaire et les industries biochimiques et pharmaceutiques (Broadhead et al, Drug Dev. Ind. Pharm., 18 (11 et 12), 1169-1206, 1992). C'est une technique pouvant être appliquée aux composés thermosensibles tels que les bactéries.

A titre purement illustratif on donne à la figure unique annexée, une représentation schématique d'un tel dispositif avec ci-après les significations des références :

- 20 1/ Ensemble de pulvérisation
- 2/ Pompe péristaltique
- 3/ Solution à atomiser
- 4/ Distributeur d'air
- 5/ Chambre de dessiccation
- 25 6/ Cône de la chambre de dessiccation
- 7/ Cyclone
- 8/ Flacon de récupération
- 9/ Filtre de sortie
- 10/ Corps de chauffe
- 30 11/ Débitmètre
- 12/ Turbine
- 13/ Filtre absolu
- 14/ Sondes de température à l'entrée
- 15/ sondes de température à la sortie.

Selon une variante préférée, le taux de matière sèche (TMS) de la solution ou dispersion aqueuse est compris entre 20 et 30 %, la teneur en solution bactérienne (Tc) est de l'ordre de 3 à 10% et lorsqu'un agent de protection est présent, le rapport en poids polymère/agent de protection est
5 compris entre 60/40 et 90/10.

La température de l'air chaud est de préférence de l'ordre de 60° C à 120° C selon les cas, bien que certaines bactéries comme les bactéries lactiques puissent résister à une température de l'ordre de 140° C.

L'invention concerne également l'application des microparticules
10 décrites précédemment dans le domaine cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire, agricole.

Elle concerne plus particulièrement l'application desdites microparticules à l'enrobage ou au pelliculage de semence.

Ainsi, de façon générale, l'invention concerne un produit de
15 multiplication de plantes cultivées, revêtu en partie ou en totalité d'une couche contenant des microparticules selon l'invention.

On désigne par le nom "produit de multiplication" toutes les parties génératives de la plante qu'on peut utiliser pour la multiplication de celle-ci. On citera par exemple les graines (semences au sens étroit), les racines, les
20 fruits, les tubercules, les bulbes, les rhizomes, les parties de tige, les plants, (pousses) et autres parties de plantes. On mentionnera également les plantes germées et les jeunes plants qui doivent être transplantés après germination ou après la sortie de terre. Ces jeunes plants peuvent être protégés avant la transplantation par un traitement total ou partiel par immersion.

Ainsi, ces composés peuvent être utilisés dans le traitement des
25 semences (par exemple céréales, cotonnier, betterave, colza, graines fourragères, graines légumières) par exemple sous la forme d'enrobage ou de pelliculage.

L'invention est maintenant illustrée par les exemples suivants.
30

Conditions générales des expériences

Les polymères d'encapsulation étudiés, sont :

- un copolymère d'esters d'acide acrylique et méthacrylique (Eudragit® RS 30D, obtenu chez Röhm Pharma, GmbH, Darmstadt, Allemagne).

- un amidon modifié (N-Lok®, provenant de National Starch & Chemical).

- une éthylcellulose (Aquacoat®, Seppic, France), nécessitant l'utilisation d'un plastifiant, le phtalate de diéthyle.

5 La substance hygroscopique utilisée est :

- une silice hydrophile (Sipernat 22®, Degussa France). Trois concentrations sont testées :

3,1 %, 4,5% et 6,0% en poids par rapport au polymère sec (représentant 30% de la suspension).

10 Les agents de protection ont pour fonction de participer à la rétention d'eau et de constituer la base du milieu favorable à la conservation de la biomasse à l'intérieur de la microparticule.

Parmi ceux-ci ont été utilisés les produits dérivés du lait :

- Carbélaç 35® (société Carbery Milk Products, Irlande)

15 - Carbélaç WB 700®

- Clar101® (société CLAR, France)

- Hydrolysât de caséine

- Hydrolysât de levure.

20 Les souches de rhizobactéries appartenant au groupe *Pseudomonas fluorescens-putida*, bâtonnets gram négatif et aérobies, sont :

- la souche M3.1, isolée à partir de racines de maïs thaïlandais,

- ou la souche G92, isolée à partir de racines de pommiers français (Golden Delicious).

25 Ces deux souches ont été fournies par l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), station de Pathologie végétale et Phytobactériologie, Beaucouze, France.

30 Les bactéries sont cultivées à 26° C, pendant quelques jours (5 à 7 jours), dans 100 ml de milieu liquide de King B [20g proteose peptone n° 3 ; 1,5 g di-potassium hydrogénophosphate ; 1,5 g magnésium sulfate ; 12,5 g glycérol bidistillé ; 1 l d'eau déminéralisée].

Les cellules sont récoltées stérilement par centrifugation à 7000 tpm (5910 g) pendant 10 min à 12°C, pour une concentration finale de 10¹¹-10¹² unités formant colonie (UFC)/ml.

Les différentes solutions de polymères sont préparées en utilisant les quantités suivantes :

- 100 ml de copolymère méthacrylique (Eudragit®, déjà sous forme de dispersion aqueuse, renfermant 30% de polymère sec),
- 5 - 30 g de poudre N-Lok® dissous dans 70 g d'eau déminéralisée,
- 100 ml d'éthylcellulose, déjà sous forme de dispersion aqueuse (30% de polymère sec) et 5 ml de phtalate de diéthyle, mélangés et agités pendant 40 min.

10 Pour la solution à atomiser, 5 à 10 ml de cellules bactériennes, à raison de 10^{11} - 10^{12} UFC/ml, sont ajoutés aux préparations de polymères (100 ml) 2 à 4 heures avant l'atomisation et l'ensemble est mis sous agitation. La compatibilité polymères/bactéries est vérifiée juste avant de procéder à la microencapsulation.

15 La suspension à vaporiser est agitée pendant toute la durée de passage dans un système d'atomisation utilisant une buse à ultrasons ou une buse pneumatique, et le produit obtenu est récolté à deux niveaux :

- dans le flacon de récupération,
- dans le cône de la chambre de dessiccation.

20 Le flux d'alimentation est co-courant à l'entrée d'air de séchage (Figure annexée).

La survie des rhizobactéries est étudiée de la façon suivante :

Les bactéries piégées dans les microparticules sont libérées en dispersant ou en dissolvant les microparticules :

- d'Eudragit® dans l'éthanol à 15% (v/v), pendant 5 min. Cette concentration d'alcool a été préalablement testée sur les bactéries pour vérifier si elle n'était pas toxique,
- 25 - d'amidon modifiée, dans l'eau,
- d'éthylcellulose, dans l'acétone, le dichlorométhane ou l'eau physiologique peptonée [chlorure de sodium 0,9% ; peptone 1%].

30 La viabilité des bactéries libérées est estimée par la technique de numération suivante :

- Suspension : libération des bactéries dans 4,5 ml d'eau déminéralisée stérile (pour les microparticules d'amidon modifié), dans 4,5 ml d'alcool à 15% (pour celles à base d'Eudragit®) et dans 4,5 ml d'eau physiologique peptonée (pour les microparticules d'éthylcellulose).

5 - Puis établissement de dilution au dixième dans de l'eau déminéralisée stérile (0,5 ml de suspension bactérienne ; 4,5 ml d'eau déminéralisée stérile).

- Etalement de 50 µl, sur milieu gélosé de King B [Agar 15 g/l (Osi, France)] sur lequel les bactéries émettent une fluorescence verte intense typique de cette souche permettant un dénombrement visuel des colonies développées. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à l'étuve à 26° C. La viabilité bactérienne est estimée par une moyenne, à partir de 3
10 prélèvements de microparticules et établissement d'1 à 2 gammes de dilution par prélèvement. D'où obtention de la viabilité bactérienne en UFC/g de
15 microparticules dissoutes.

Une méthode similaire est mise en oeuvre pour étudier la viabilité et la survie des bactéries lactiques.

La granulométrie est mesurée grâce à un appareil Coulter®.

20 La mesure de l'humidité est réalisée à l'aide d'un analyseur d'humidité. L'humidité résiduelle est obtenue à 135°C et s'exprime en pourcentage (%).

1 - Expériences d'encapsulation de bactéries dans un copolymère méthacrylique

25 Les exemples 1 à 6 sont réalisés avec *Pseudomonas fluorescens putida* et les exemples 7 à 10 avec une bactérie lactique ayant une application dans le domaine agroalimentaire.

Exemple 1

30 A environ 100 ml correspondant à 104,24 g de dispersion de copolymère méthacrylique (Eudragit RS30D®) dans un erlen de 250 ml stérile, on ajoute environ 5 ml correspondant à 5,73 g de culot bactérien. L'ensemble est agité pendant 2 h. La concentration bactérienne dans le polymère est déterminée par SDE de 10⁻⁶ à 10⁻⁹ à partir de trois prélèvements de 0,5 ml effectués avant atomisation.

Les conditions d'atomisation sont :

- température de l'air à l'entrée = 60° C
 - débit du flux d'alimentation = 7 ml/min
 - débit de l'air chaud = 32 Nm³/h
- 5 - ultrasons (buse) : fréquence = 37 kHz, amplitude = 75% de sa puissance maximale (150 W).

Les microparticules sont récupérées dans un erlen de 500 ml stérile ou dans le cône de la chambre de dessiccation et pesées. Elles possèdent un diamètre moyen de 48 µm et comportent en moyenne 7,1.10⁸ UFC/g de microparticules.

10

Après deux mois, le nombre d'UFC/microparticule est 1,9.10⁷ ; après 6 mois 1,3.10⁶ ; après un an 3,4.10³ UFC/microparticule.

Taux d'humidité : 24 % en poids.

15 Exemple 2

A environ 100 ml correspondant à 102,75 g de dispersion de copolymère méthacrylique (Eudragit RS30D®) dans un erlen de 250 ml stérile, on ajoute environ 5 ml correspondant à 5,94 g de culot bactérien. L'ensemble est agité pendant 3 h. La concentration bactérienne dans le polymère est déterminée par SDE de 10⁻⁵ à 10⁻⁸ à partir de trois prélèvements de 0,5 ml effectués avant atomisation.

20

Les conditions d'atomisation sont :

- température de l'air à l'entrée = 60°C
 - débit du flux d'alimentation = 6,90 ml/min
- 25 - débit de l'air chaud = 36 Nm³/h
- ultrasons (buse) : fréquence = 37 kHz, amplitude = 75% de sa puissance maximale (150 W).

Les microparticules sont récupérées dans un erlen de 500 ml stérile dans le cône de la chambre de dessiccation et pesées.

Le diamètre moyen des microparticules est de 47 µm et elles comportent 5,8.10⁷ UFC/g de microparticule.

30

Après deux mois, le nombre d'UFC/microparticule est de 5,5.10⁷ ; après 6 mois 3,6.10⁵ ; après un an 8,1.10⁵.

Taux d'humidité : 25 % en poids.

Exemple 3

A environ 100 ml correspondant à 106,56 g de dispersion de copolymère méthacrylique (Eudragit RS30D®) dans un erlen de 250 ml stérile, on ajoute environ 1,50 g de silice hydrophile, soit 4,48% par rapport au polymère sec. On ajoute ensuite environ 10 ml correspondant à 11,58 g de culot bactérien. L'ensemble est agité pendant 2 h. La concentration bactérienne dans le polymère est déterminée par SDE de 10^{-3} à 10^{-6} à partir de trois prélèvements de 0,5 ml effectués avant atomisation.

Les conditions d'atomisation sont :

- 10 - température de l'air à l'entrée = 60° C
- débit du flux d'alimentation = 7,23 ml/min
- débit de l'air chaud = 36 Nm³/h
- ultrasons (buse) : fréquence = 37 kHz, amplitude = 75% de sa puissance maximale (150 W).

15 Le diamètre moyen des microparticules est de 41 µm et elles comportent $2 \cdot 10^8$ UFC/g de microparticule.

Après deux mois, le nombre d'UFC/microparticule est de $5,3 \cdot 10^8$; après 7 mois $2,1 \cdot 10^6$; $6,2 \cdot 10^6$ après un an.

Taux d'humidité : 27 % en poids.

20

Exemple 4

A environ 100 ml correspondant à 105,53 g de dispersion de copolymère méthacrylique (Eudragit RS30D®) dans un erlen de 250 ml stérile, on ajoute environ 2,00 g de silice hydrophile (Sipernat 22®), soit 5,94% par rapport au polymère sec. On ajoute ensuite environ 5 ml correspondant à 5,87 g de culot bactérien. L'ensemble est agité pendant 2 h 45. La concentration bactérienne dans le polymère est déterminée par SDE de 10^{-4} à 10^{-7} à partir de trois prélèvements de 0,5 ml effectués avant atomisation.

Les conditions d'atomisation sont :

- 30 - température de l'air à l'entrée = 60° C
- débit du flux d'alimentation = 9,41 ml/min
- débit de l'air chaud = 37 Nm³/h
- ultrasons (buse) : fréquence = 37 kHz, amplitude = 75% de sa puissance maximale (150 W).

Les microparticules sont récupérées dans un erlen de 500 ml stérile dans le cône de la chambre de dessiccation et pesées.

Le diamètre moyen des microparticules est de 34 μm et elles comportent 3.10^8 UFC/g de microparticule.

5 Après deux mois, le nombre d'UFC/microparticule est de 9.10^6 ; après 7 mois $8,9.10^4$.

Taux d'humidité : 18 % en poids.

Exemple 5

10 A environ 100 ml correspondant à 106,39 g de dispersion de copolymère méthacrylique (Eudragit RS30D®) dans un erlen de 250 ml stérile, on ajoute 1,04 g de silice hydrophile (Sipernat 22®), soit 3,15% par rapport au polymère sec. On ajoute ensuite environ 5 ml correspondant à 5,72 g de culot bactérien. L'ensemble est agité pendant 2 h 40. La concentration bactérienne
15 dans le polymère est déterminée par SDE de 10^{-5} à 10^{-8} à partir de trois prélèvements de 0,5 ml effectués avant atomisation.

Les conditions d'atomisation sont :

- température de l'air à l'entrée = 60° C
- débit du flux d'alimentation = 8,62 ml/min
- 20 - débit de l'air chaud = 38 Nm³/h
- ultrasons (buse) : fréquence = 37 kHz, amplitude = 75% de sa puissance maximale (150 W).

Les microparticules sont récupérées dans un erlen de 500 ml stérile dans le cône de la chambre de dessiccation et pesées.

25 Taux d'humidité : 25 % en poids.

Le diamètre moyen des microparticules est de 39 μm et elles comportent $9,8.10^8$ UFC/g de microparticule.

Après deux mois, le nombre d'UFC/g de microparticule est de $5,5.10^7$; après 6 mois $7,3.10^6$.

30

Exemple 6

A environ 100 ml correspondant à 105,56 g de dispersion de copolymère méthacrylique (Eudragit RS30D®) dans un erlen de 250 ml stérile, on ajoute 1,50 g de silice hydrophile (Sipernat 22®), soit 4,52% par rapport au

polymère sec. On ajoute ensuite environ 5 ml correspondant à 5,70 g de culot bactérien. L'ensemble est agité pendant 3 h 35. La concentration bactérienne dans le polymère est déterminée par SDE de 10^{-5} à 10^{-8} à partir de trois prélèvements de 0,5 ml effectués avant atomisation.

5 Les conditions d'atomisation sont :

- température de l'air à l'entrée = 60° C
- débit du flux d'alimentation = 8,62 ml/min
- débit de l'air chaud = 36-37 Nm³/h
- ultrasons (buse) : fréquence = 37 kHz, amplitude = 75% de sa

10 puissance maximale (150 W).

Les microparticules sont récupérées dans un erlen de 500 ml stérile dans le cône de la chambre de dessiccation et pesées.

Le diamètre moyen des microparticules est de 42 µm et elles comportent $3,1 \cdot 10^8$ UFC/g de microparticule après deux mois, et $5,5 \cdot 10^3$ après 7

15 mois.

Taux d'humidité : 21 % en poids.

Exemple 7

20 Un exemple similaire à l'exemple 1 a été réalisé avec 75 g de copolymère méthacrylique (Eudragit RS30D®) et 25 g d'un agent de protection qui est :

- le Carbélaç 35® (ex 7-a)
- le Carbélaç WB 700® (ex 7-b)
- le Carbélaç 70® (ex 7-c)
- 25 - le Clar 101® (ex 7-d)

La température d'entrée d'air de séchage est de 80° C.

Les microparticules récupérées dans le flacon ont un diamètre moyen de 8 µm.

30 Les viabilités sont indiquées dans le tableau ci-dessous en UFC/g de microparticules.

	T0	T30	T90
7-a	5,5.10 ⁹	9.10 ⁸	1,7.10 ⁸
7-b	5,2.10 ⁹	5,4.10 ⁸	8,5.10 ⁶
7-c	2,9.10 ⁹	2,9.10 ⁶	2,8.10 ³
5 7-d	2.10 ⁸	1,4.10 ⁶	---

Taux d'humidité compris entre 9 et 12 % pour chacune des poudres.

Exemple 8

10 Un exemple similaire à l'exemple 7 a été réalisé mais avec une température d'entrée d'air de séchage de 120° C. L'agent de protection est :

- l'hydrolysate de levure (ex-9-a)
- l'hydrolysate de caséine (ex-9-b)
- le Carbélaç 35® et le glutamate de sodium (ex-9-c)

15 Les microparticules récupérées dans le flacon ont un diamètre moyen de 7 µm.

Les viabilités sont indiquées dans le tableau ci-dessous en UFC/g de microparticules.

	T60	T90	T120	T150
9-a	1,1.10 ¹⁰	1,1.10 ⁹	1,3.10 ⁸	
9-b	3,4.10 ⁹	4,2.10 ⁷	>1,1.10 ⁹	1,1.10 ⁸
9-c	1,9.10 ⁷	5,4.10 ⁷	5,7.10 ⁷	2,2.10 ⁷

25 Taux d'humidité compris entre 10 et 12 % en poids.

II - Expériences d'encapsulation de bactéries dans un polysaccharide

Exemple 9

30 Un exemple similaire à l'exemple 7 a été réalisé avec 75 g d'amidon modifié (N-Lok®) et 25 g d'un agent de protection qui est :

- le Clar 101® (ex 8-a)
- le Carbélaç 35® (ex 8-b)
- le Carbélaç 700® (ex 8-c)

Les microparticules récupérées dans le flacon ont un diamètre moyen de 15 μm .

Les viabilités sont indiquées dans le tableau ci-dessous en UFC/g de microparticules.

5

	T0	T30	T90
8-a	$2,4 \cdot 10^9$	$2,9 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^7$
8-b	$2 \cdot 10^9$	$5,3 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$
8-c	$2,2 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^8$

10

Taux d'humidité compris entre 10 et 12 % en poids.

Exemple 10

Un essai réalisé selon l'exemple 8 avec le Carbélac 35® mais à une température d'entrée de 120°C donne les résultats suivants de viabilité :

15

	T30	T60	T90
9-a	$1,2 \cdot 10^9$	$4,8 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$

De même avec l'hydrolysate de levure (9-b) ou l'hydrolysate de caséine (9-c) on obtient les résultats suivants :

20

	T0	T30	T90	T120
9-b	$7,6 \cdot 10^9$	$7 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^9$	
9-c	$9,6 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^9$		$> 1,1 \cdot 10^9$

Taille des particules 12 μm .

25

Taux d'humidité compris entre 10 et 12 % en poids.

REVENDEICATIONS

1. Microparticule, utile notamment pour le traitement des semences et dans les compositions agroalimentaires, caractérisée en ce qu'elle est formée d'une matrice de polymères hydrosolubles hydrodispersés ou hydrodispersables, d'une quantité efficace de bactéries et d'une quantité d'eau appropriée pour permettre la survie desdites bactéries.

2. Microparticule selon la revendication 1, caractérisée en ce que les polymères hydrosolubles hydrodispersés et/ou hydrodispersables sont choisis parmi les polymères vinyliques fonctionnalisés par des groupements ionisables, les polymères acryliques ou méthacryliques, les polysaccharides éventuellement modifiés.

3. Microparticule selon la revendication 2, caractérisée en ce que les polymères vinyliques sont fonctionnalisés par des groupements choisis dans le groupe constitué par les groupements COOH, SO₃H, SO₄H, NH₂, pyridine, pyrrolidone, OH, diméthyléthylamine.

4. Microparticule selon la revendication 2, caractérisée en ce que les polymères acryliques ou méthacryliques sont choisis dans le groupe constitué par les homopolymères ou copolymères acryliques ou méthacryliques.

5. Microparticule selon la revendication 2, caractérisée en ce que les polysaccharides sont choisis parmi l'amidon éventuellement modifié, la cellulose éventuellement modifiée, les carraghénanes ou les agars éventuellement modifiés, les xanthanes, les alginates, les chitosans.

6. Microparticule selon la revendication 5, caractérisée en ce que les polymères hydrosolubles hydrodispersés et/ou hydrodispersables sont choisis dans le groupe constitué par l'amidon, l'amidon modifié, la cellulose, l'agar-agar, l'éthylcellulose.

7. Microparticule selon la revendication 1, caractérisée en ce que la quantité d'eau résiduelle contenue dans la microparticule est comprise entre 4 et 30%.

8. Microparticule selon la revendication 1, caractérisée en ce que les bactéries sont choisies dans le groupe constitué par les bactéries du type stimulant la croissance des végétaux.

9. Microparticule selon la revendication 1 ou 8, caractérisée en ce que les bactéries sont choisies dans le groupe constitué par les bactéries du genre *Pseudomonas fluorescens* ou les bactéries lactiques.

5 10. Microparticule selon la revendication 1, caractérisée en ce que la matrice comprend un agent de rétention de l'eau.

11. Microparticule selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'agent de rétention de l'eau est choisi dans le groupe constitué par les produits dérivés du lait, les hydrolysats de caséine ou de levure.

10 12. Microparticule selon la revendication 10 ou 11, caractérisée en ce que le rapport en poids entre le polymère et l'agent de rétention de l'eau est compris entre 60/40 et 90/10.

13. Microparticule selon la revendication 1, caractérisée en ce que la proportion en matrice de la microparticule est comprise entre 70) et 99,9 % en poids, avantageusement entre 85 et 99,5 % en poids.

15 14. Microparticule selon la revendication 1, caractérisée en ce que la matrice comprend un ou plusieurs additifs ou charges choisis parmi la silice hygroscopique, le carbonate de calcium, le β -glycérophosphate, le glutamate de sodium, la vitamine C, le glucose, le lactose.

20 15. Microparticule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle présente un diamètre compris entre 1 et 100 μm , avantageusement 2 à 50 μm .

16. Microparticule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le nombre d'unités formant colonie (UFC) par gramme de microparticule est compris entre 10^8 et 10^{11} UFC/g de microparticule.

25 17. Procédé de production de microparticule selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'une solution ou dispersion aqueuse comprenant un polymère hydrosoluble ou hydrodispersable, une suspension bactérienne, éventuellement un agent de protection, un agent hygroscopique et des additifs est pulvérisée sous courant d'air chaud puis en
30 ce que les microparticules sont récupérées.

18. Procédé de production de microparticules selon la revendication 17, caractérisé en ce que le taux de matière sèche (TMS) est compris entre 20 et 30 %, la teneur en solution bactérienne (Tc) est de l'ordre de 3 à 10% et lorsqu'un agent de protection est présent, le rapport en poids polymère/agent de protection est compris entre 60/40 et 90/10.

19. Procédé de production de microparticules selon la revendication 17 ou 18, caractérisé en ce que la température de l'air chaud est comprise entre 60°C et 120°C.

20. Microparticule contenant des bactéries susceptibles d'être obtenues pour le procédé selon l'une des revendications 17 à 19.

21. Semences revêtues par enrobage ou pelliculage d'une couche contenant des microparticules selon l'une des revendications 1 à 16.

22. Application des microparticules selon l'une des revendications 1 à 16, à la réalisation de produit à usage cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire, agricole.

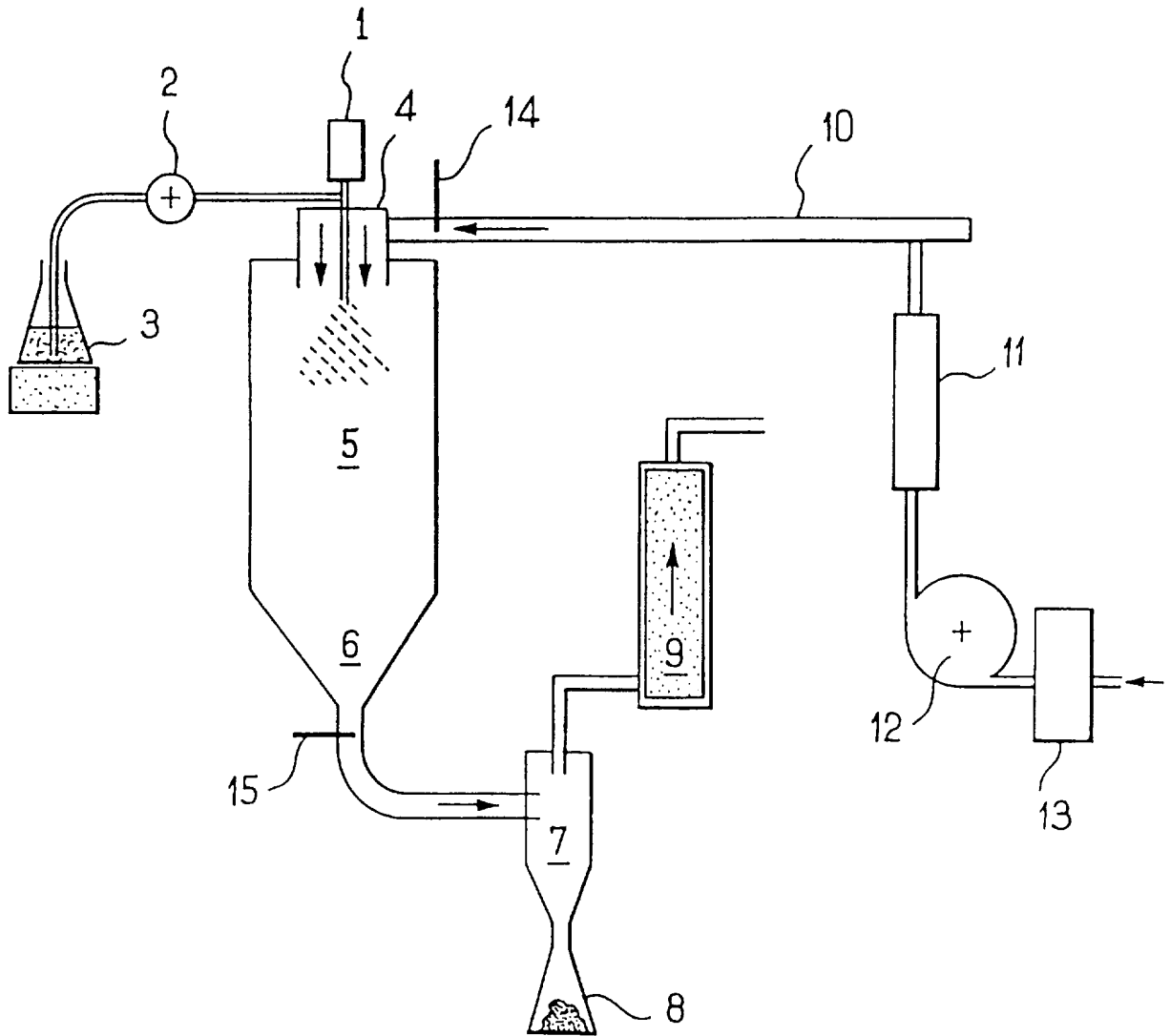


FIGURE 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 97/00874

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A01C1/06

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)
IPC 6 A01C

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 494 802 A (PIONEER FRANCE MAÏS) 15 July 1992 see the whole document	1,2,5,6, 8,9,14, 21,22
Y	---	17,20
Y	EP 0 377 370 A (RHONE-POULENC SANTE) 11 July 1990 see the whole document	17,20
A	---	1,2,10, 14,19, 21,22
	--- -/--	

Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*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)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>*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</p> <p>*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</p> <p>*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.</p> <p>*&* document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search 4 September 1997	Date of mailing of the international search report L. van Velzen-Pâren 16.09.97
--	---

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 Merckx, A
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 97/00874

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	FR 2 615 203 A (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE) 18 November 1988 cited in the application see the whole document	1,2,5,8, 10,21,22
---		12-14, 17,20
X A	EP 0 017 565 B (RHONE-POULENC INDUSTRIES) 24 October 1984 cited in the application see claims	1,2,8, 10,13,22
---		7,14,17, 19-21
X A	EP 0 295 968 A (PIONEER FRANCE MAÏS) 21 December 1988 cited in the application see claims	1,2,8,22
---		17,20
X A	EP 0 253 673 A (AGRICULTURAL GENETICS COMPANY) 20 January 1988 see claims	1,2,21
---		8,22
X A	EP 0 145 086 A (SOLVAY) 19 June 1985 see page 2, line 22 - page 7, line 30	1,8,14, 21,22
---		2,13,17, 20
X A	US 5 113 619 A (LEPS ET AL.) 19 May 1992 see claims	1,8,21
---		17,20
A	WO 93 14158 A (BERWIND PHARMACEUTICAL SERVICES) 22 July 1993 see abstract	1,22

A	AU 589 380 B (TREBOSI) 12 October 1989 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. .nal Application No

PCT/FR 97/00874

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 494802 A	15-07-92	FR 2671265 A	10-07-92

EP 377370 A	11-07-90	FR 2643572 A	31-08-90
		AU 622260 B	02-04-92
		AU 4822790 A	10-07-90
		CA 2006235 A	22-06-90
		WO 9006808 A	28-06-90
		JP 3502905 T	04-07-91
		US 5130171 A	14-07-92

FR 2615203 A	18-11-88	EP 0314746 A	10-05-89
		WO 8808876 A	17-11-88

EP 17565 B	15-10-80	FR 2453215 A	31-10-80
		AR 222867 A	30-06-81
		AU 542836 B	21-03-85
		AU 5716880 A	09-10-80
		BR 8002025 A	25-11-80
		CA 1144882 A	19-04-83
		EP 0017565 A	15-10-80
		OA 6505 A	31-07-81
		US 4434231 A	28-02-84

EP 295968 A	21-12-88	FR 2611698 A	09-09-88
		DE 3889385 D	09-06-94
		DE 3889385 T	10-11-94
		ES 2052751 T	16-07-94
		US 5366532 A	22-11-94

EP 253673 A	20-01-88	CA 1285154 A	25-06-91
		DE 3773283 A	31-10-91
		JP 1959477 C	10-08-95
		JP 6085714 B	02-11-94
		JP 63024883 A	02-02-88
		US 4849005 A	18-07-89
		US RE34670 E	26-07-94

EP 145086 A	19-06-85	FR 2556173 A	14-06-85
		AU 569931 B	25-02-88
		AU 3654184 A	20-06-85

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No PCT/FR 97/00874
--

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 145086 A		BR 8406342 A CA 1288967 A DE 3475039 A JP 1788996 C JP 4081407 B JP 60145005 A US 4879839 A US 4735017 A	08-10-85 17-09-91 15-12-88 10-09-93 24-12-92 31-07-85 14-11-89 05-04-88
US 5113619 A	19-05-92	NONE	
WO 9314158 A	22-07-93	EP 0551700 A AU 3583993 A CN 1074920 A DE 69219303 D ES 2100279 T JP 7502769 T US 5630871 A ZA 9300225 A	21-07-93 03-08-93 04-08-93 28-05-97 16-06-97 23-03-95 20-05-97 27-08-93
AU 589380 B	12-10-89	AU 4937185 A	22-05-86

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. e Internationale No
PCT/FR 97/00874

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A01C1/06

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)
CIB 6 A01C

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 494 802 A (PIONEER FRANCE MAÏS) 15 Juillet 1992 voir le document en entier	1,2,5,6, 8,9,14, 21,22
Y	---	17,20
Y	EP 0 377 370 A (RHONE-POULENC SANTE) 11 Juillet 1990 voir le document en entier	17,20
A	---	1,2,10, 14,19, 21,22
	---	-/--

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

4 Septembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

L. van Velzen-Péron 16.09.97

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

Merckx, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den : Internationale No
PCT/FR 97/00874

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	FR 2 615 203 A (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE) 18 Novembre 1988 cité dans la demande voir le document en entier	1,2,5,8, 10,21,22
A	---	12-14, 17,20
X	EP 0 017 565 B (RHONE-POULENC INDUSTRIES) 24 Octobre 1984 cité dans la demande voir revendications	1,2,8, 10,13,22
A	---	7,14,17, 19-21
X	EP 0 295 968 A (PIONEER FRANCE MAÏS) 21 Décembre 1988 cité dans la demande voir revendications	1,2,8,22
A	---	17,20
X	EP 0 253 673 A (AGRICULTURAL GENETICS COMPANY) 20 Janvier 1988 voir revendications	1,2,21
A	---	8,22
X	EP 0 145 086 A (SOLVAY) 19 Juin 1985 voir page 2, ligne 22 - page 7, ligne 30	1,8,14, 21,22
A	---	2,13,17, 20
X	US 5 113 619 A (LEPS ET AL.) 19 Mai 1992 voir revendications	1,8,21
A	---	17,20
A	WO 93 14158 A (BERWIND PHARMACEUTICAL SERVICES) 22 Juillet 1993 voir abrégé	1,22
A	AU 589 380 B (TREBOSI) 12 Octobre 1989 -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Doc. e Internationale No

PCT/FR 97/00874

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 494802 A	15-07-92	FR 2671265 A	10-07-92
EP 377370 A	11-07-90	FR 2643572 A AU 622260 B AU 4822790 A CA 2006235 A WO 9006808 A JP 3502905 T US 5130171 A	31-08-90 02-04-92 10-07-90 22-06-90 28-06-90 04-07-91 14-07-92
FR 2615203 A	18-11-88	EP 0314746 A WO 8808876 A	10-05-89 17-11-88
EP 17565 B	15-10-80	FR 2453215 A AR 222867 A AU 542836 B AU 5716880 A BR 8002025 A CA 1144882 A EP 0017565 A OA 6505 A US 4434231 A	31-10-80 30-06-81 21-03-85 09-10-80 25-11-80 19-04-83 15-10-80 31-07-81 28-02-84
EP 295968 A	21-12-88	FR 2611698 A DE 3889385 D DE 3889385 T ES 2052751 T US 5366532 A	09-09-88 09-06-94 10-11-94 16-07-94 22-11-94
EP 253673 A	20-01-88	CA 1285154 A DE 3773283 A JP 1959477 C JP 6085714 B JP 63024883 A US 4849005 A US RE34670 E	25-06-91 31-10-91 10-08-95 02-11-94 02-02-88 18-07-89 26-07-94
EP 145086 A	19-06-85	FR 2556173 A AU 569931 B AU 3654184 A	14-06-85 25-02-88 20-06-85

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der .e Internationale No

PCT/FR 97/00874

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 145086 A		BR 8406342 A	08-10-85
		CA 1288967 A	17-09-91
		DE 3475039 A	15-12-88
		JP 1788996 C	10-09-93
		JP 4081407 B	24-12-92
		JP 60145005 A	31-07-85
		US 4879839 A	14-11-89
		US 4735017 A	05-04-88

US 5113619 A	19-05-92	AUCUN	

WO 9314158 A	22-07-93	EP 0551700 A	21-07-93
		AU 3583993 A	03-08-93
		CN 1074920 A	04-08-93
		DE 69219303 D	28-05-97
		ES 2100279 T	16-06-97
		JP 7502769 T	23-03-95
		US 5630871 A	20-05-97
		ZA 9300225 A	27-08-93

AU 589380 B	12-10-89	AU 4937185 A	22-05-86
