SPF Economie, PME, Classes
Moyennes & Energie
Office de la Propriété intellectuelle

(11) 1031778 B1

(47) Date de délivrance : 05/02/2025

(12) BREVET D'INVENTION BELGE

(47) Date de publication : 05/02/2025

(21) Numéro de demande : BE2023/5565

(22) Date de dépôt : 06/07/2023

(62) Divisé de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : A01N 63/22, A01P 21/00, C12N 1/20

(30) Données de priorité :

(73) Titulaire(s) :

AGRICELLS
SA
6900, AYE (MARCHE-EN-FAMENNE)
Belgique

(72) Inventeur(s) :

LECLERCQ Maxime
6900 AYE (MARCHE-EN-FAMENNE)
Belgique

VANDAMME Vincent
6900 AYE (MARCHE-EN-FAMENNE)
Belgique

(54) MICROORGANISME BIOSTIMULANT

(57)Une composition biostimulante comprenant une souche de Bacillus amyloliquefaciens ayant incorporé un plasmide ayant au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO :1, son utilisation en agriculture, procédé pour accroitre la croissance d'un végétal d'intérêt et procédé pour accroitre la production de cyclopeptides lipidiques tels que la surfactine, l'iturine, et/ou la fengycine par un microorganisme.

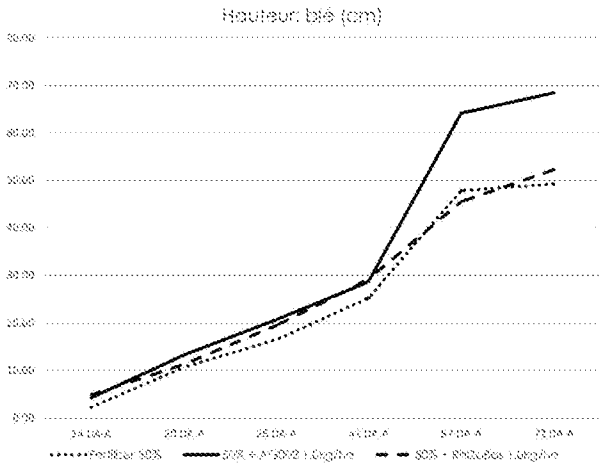


Fig. 6

MICROORGANISME BIOSTIMULANT

Domaine technique

La présente invention concerne l'utilisation d'une souche de *Bacillus amyloliquefaciens* à des fins de biostimulation, ainsi que des méthodes de biostimulation.

L'art antérieur

La biostimulation de la croissance d'un végétal d'intérêt est connue. En particulier, diverses souches du groupe *Bacillus subtilis* sont commercialisées dans ce but.

Les souches du groupe de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, IT45 ou QST 713 (Serenade®) sont connues, les deux premières surtout aux fins de contrôle d'organismes pathogènes. De même la souche expérimentale GA1 a été testée pour son efficacité en biocontrôle d'organismes pathogènes, mais sans qu'elle ne soit commercialisée (Arguelles-Arias *et al.*, 2009).

En outre, le produit RhiZoBas est une souche de *Bacillus amyloliquefaciens* commercialisée à des fins de biostimulation.

D'autre part, la demande de brevet WO 2018/122541 décrit l'intérêt d'un isolat de lipopeptides pour la biostimulation, en particulier pour s'affranchir du métabolisme du microorganisme, qui risque de varier selon les conditions de culture, qui sont difficilement contrôlables.

Ainsi, l'utilisation d'extraits mieux contrôlés d'une souche particulière en biostimulation reflète les difficultés rencontrées : selon les conditions agronomiques, une souche peut avoir un caractère biostimulant, ou pas, voire même avoir des effets délétères au niveau du végétal d'intérêt.

Certes, certaines des conditions sont pilotables ou mesurables avant une éventuelle application du microorganisme, telles que les paramètres physico-chimiques du champ : type de sol, abondance en azote ou en autres nutriments, présence ou absence de pathogènes dans le sol.

Cependant, d'autres paramètres sont plus aléatoires, tels que les conditions météorologiques.

Ceci va influer à la fois au niveau du métabolisme du microorganisme « biostimulant », et de celui du végétal d'intérêt, si bien qu'il y a de nombreux paramètres qui risquent d'affecter les propriétés biostimulantes d'un microorganisme, ou d'en réduire la portée.

Un microorganisme dont l'effet biostimulant est plus robuste et moins dépendant des conditions agronomiques, représente donc un intérêt majeur.

Bref résumé de l'invention

Un premier aspect de la présente invention porte sur une composition biostimulante comprenant une souche de *Bacillus amyloliquefaciens* ayant incorporé un plasmide ayant au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO :1.

De préférence, cette souche de *Bacillus amyloliquefaciens* a au moins 90% d'identité avec SEQ ID NO :5, ladite identité étant calculée sur toute la longueur de ladite SEQ ID NO :5.

Avantageusement, cette souche de *Bacillus amyloliquefaciens* a incorporé une copie unique du plasmide ayant au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO :1.

De préférence cette souche de *Bacillus amyloliquefaciens* ayant incorporé le plasmide ayant au moins 95% d'identité avec SEQ ID

NO :1, ce plasmide en outre encodant un peptide ayant 100% d'identité avec SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3 et/ou SEQ ID NO :4.

De préférence, cette composition biostimulante est une huile végétale comprenant la souche de *Bacillus amyloliquefaciens* ou une émulsion huile dans l'eau comprenant la souche de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Un aspect lié de la présente invention porte sur une graine d'un végétal d'intérêt enrobée par cette composition biostimulante.

Alternativement, de préférence, cette composition biostimulante est sous forme de granules, lesdites granules comprenant au moins 40% en poids de carbonate de calcium et/ou de carbonate de magnésium (poids des carbonates de calcium et/ou de magnésium : poids des granules exempt du *Bacillus amyloliquefaciens*), de préférence lesdites granules ayant un diamètre compris entre 0,5 mm et 2 mm.

Alternativement, de préférence, cette composition biostimulante est sous forme d'une poudre sèche ré hydratable, comprenant un agent de charge et un agent tensioactif (qui peut être un mélange d'agents tensioactifs).

Un autre aspect lié de la présente invention porte sur un procédé pour accroitre la croissance de végétaux comprenant l'étape d'administrer auxdits végétaux cette composition biostimulante.

De préférence, dans ce procédé, la composition biostimulante est appliquée dans ou sur le sol avant que ledit végétal ne soit planté ou que la graine dudit végétal ne soit semée ou, avantageusement, substantiellement en même temps que la graine dudit végétal est semée.

De préférence, alternativement ou en plus, dans ce procédé, la composition biostimulante est appliquée sur le sol après que ledit végétal ait été planté ou que la graine dudit végétal ait été semée.

De préférence, dans ce procédé, le végétal est choisi parmi les poacées, les légumineuses, les cucurbitacées, les astéracées, les solanacées, le colza, la betterave, la carotte, la fraise, la banane, le kiwi, le géranium, le pélargonium, le chrysanthème, le pommier, le poirier, l'abricotier, le pêcher et la vigne, de préférence la tomate, le maïs, le blé la chicorée ou le concombre.

Avantageusement, dans ce procédé, la croissance accrue est celle des racines, de la tige et/ou le poids du végétal, de préférence cette croissance accrue étant mesurée au moins 40, 45, 50, 55, 60, 65 jours après l'administration de la souche de *Bacillus*.

Un autre aspect de la présente invention porte sur un procédé pour accroitre la production, par une souche choisie parmi *Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus velezensis, et Bacillus licheniformis*, de cyclopeptides lipidiques, de préférence choisis parmi la surfactine, l'iturine, la fengycine et les mélanges de ceux-ci, comprenant l'étape de transfecter ladite souche avec un plasmide ayant au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO :1.

De préférence, dans ce procédé, la souche choisie parmi *Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus velezensis, et Bacillus licheniformis*, comprend au moins 90% d'identité avec SEQ ID NO :5, ladite identité étant calculée sur toute la longueur de ladite SEQ ID NO :5.

Un autre aspect de la présente invention porte sur une utilisation d'une souche choisie parmi *Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus velezensis, et Bacillus licheniformis*, ayant

incorporé un plasmide ayant au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO :1 pour accroitre la croissance de végétaux.

De préférence, dans cette utilisation, le plasmide encode SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3 et/ou SEQ ID NO :4.

De préférence, dans cette utilisation, la souche a au moins 90% d'identité avec la SEQ ID NO :5, ladite identité étant calculée sur toute la longueur de ladite SEQ ID NO :5.

Brève description des dessins

Les figures 1-4 sont une comparaison entre la souche AG002/2 et le produit SERENADE (hauteur des plants : maïs, blé, tomate, concombre).

Les figures 1-4 sont une comparaison entre la souche AG002/2 et le produit RhiZoBas (hauteur des plants : maïs, blé, tomate, concombre).

Description détaillée d'une réalisation de l'invention

Les inventeurs ont remarqué que leur souche AG002/2 possède des propriétés biostimulantes supérieures. Ceci les a encouragés à caractériser davantage cette souche de *Bacillus amyloliquefaciens* : génétique, métabolisme et interaction avec le végétal d'intérêt.

Ainsi, un premier aspect de la présente invention porte sur une composition biostimulante comprenant une souche vivante de *Bacillus amyloliquefaciens* ayant incorporé un plasmide ayant au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO :1. Avantageusement, il s'agit de la souche de *Bacillus* ayant au moins 90% d'identité avec la SEQ ID NO :5, de préférence au moins 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 voire même au moins 99% d'identité avec SEQ ID NO :5.

Dans le contexte de la présente invention, la mesure de cette identité de séquence se réalise, de préférence, par comparaison d'une séquence à tester par rapport à SEQ ID NO :1 et/ou à SEQ ID NO :5 complètes.

Ainsi, les algorithmes de comparaison de séquence ou d'alignement global entre deux séquences peuvent avantageusement être utilisés. De préférence, dans cette comparaison, un « gap » sera comptabilisé comme une absence d'identité pour le nucléotide en question. De même, en ce qui concerne la comparaison avec SEQ ID NO :5, dans le contexte de la présente invention, de préférence, une réorganisation d'opérons au niveau du chromosome bactérien sera comptabilisée comme une absence d'identité, même si les gènes en question sont hautement similaires. Ceci implique qu'une valeur de 90%, au niveau d'une comparaison entre deux séquences nucléotidiques, est très élevée.

Dans le contexte de la présente invention, de préférence, la nomenclature des nucléotides est celle établie par IUPAC. Ainsi, « R » signifie « A » ou « G » ; « Y » signifie « C » ou « T » ; « S » signifie « G » ou « C » ; « W » signifie « A » ou « T » ; « K » signifie « G » ou « T » ; « M » signifie « A » ou « C »,...Ainsi, de préférence, dans le contexte de la présente invention, l'identité à une position donnée entre un nucléotide d'une séquence cible, par rapport à un caractère renseignant plusieurs possibilités pour la position correspondante (ex. de la SEQ ID NO :5), sera considérée comme vérifiée si un des nucléotides couvert par le caractère en question (de SEQ ID NO :5) correspond à celui de la séquence cible (ex. « Y » à la position en question de SEQ ID NO :5 et « T » à la position correspondante d'une séquence cible).

Les inventeurs ont remarqué des homologies significatives avec le génome d'autres bactéries du groupe *Bacillus sp.* (c'est-à-dire

regroupant *Bacillus amyloliquefaciens*, ou *Bacillus velezensis*) Cependant, ces autres bactéries procurent un effet biostimulant moindre, ou erratique (variant selon les conditions). Les inventeurs attribuent donc ceci à la synergie entre le génome de la souche en question, y compris de souches très proches, avec le plasmide en question.

De préférence, cette souche de *Bacillus* a incorporé une copie unique du plasmide ayant au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO:1. Il s'agit avantageusement d'une incorporation stable du plasmide, mais pas de son intégration dans le chromosome bactérien.

En outre, ou alternativement, de manière avantageuse, ce plasmide ayant au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO :1 permet l'expression d'un peptide ayant au moins 95 %, au moins 96%, 97, 98, 99, voire 100% d'identité avec SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3 et/ou SEQ ID NO :4.

De préférence, ou alternativement, une protéine qui ne serait pas totalement identique à ces SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3 et/ou SEQ ID NO :4 reste avantageuse si la protéine en question en conserve l'activité. Par exemple, des substitutions dites « conservatives » sont tolérées, telles que l'acide aspartique avec l'acide glutamique, l'asparagine avec la glutamine, la phénylalanine avec la tyrosine, la sérine avec la thréonine ou la cystéine, l'isoleucine avec la leucine, l'arginine avec la lysine, ... Une manière avantageuse de déterminer si une substitution est conservative est d'effectuer la comparaison entre les séquences sur base d'un alignement en utilisant l'algorithme BLASTp avec les paramètres par défaut tels qu'une matrice BLOSUM62, une « taille de mot » de 5 et une pénalité « de Gap » de 10, pour une pénalité d'extension de Gap de 1. Les résidus marqués par un symbole « + », suite à un tel alignement, sont de préférence considérés comme correspondant à une substitution conservative.

Selon une alternative avantageuse, la composition biostimulante est une poudre sèche ré hydratable comprenant le microorganisme selon l'invention (sous forme de spores), un agent de charge ou un mélange d'agents de charges, et un ou plusieurs agent(s) tensioactifs.

Le ou les agent(s) tensioactif(s) permet(tent) une mise en solution facile dans l'eau.

De préférence, au moins un agent tensioactif « mouillant » et/ou au moins un agent tensioactif « dispersant », de préférence un tensioactif anionique, est présent.

Dans le contexte de la présente invention, l'on entend de préférence par tensioactif «mouillant » une molécule ayant une valeur selon l'échelle HLB comprise entre 7 et 9.

Typiquement, le ou les agents tensioactifs sont incorporés en une teneur pondérale comprise entre 1 et 10%, de préférence entre 2 et 9%, de préférence entre 5 et 8% en poids (poids des tensioactifs : poids total de la poudre sèche ré hydratable).

Avantageusement, la poudre sèche ré hydratable a une teneur (pondérale) en eau inférieure à 10%, de préférence inférieure à 5%, de préférence inférieure à 2%.

Un agent de charge préféré est un silicate, un aluminosilicate et/ou un polysaccharide, par exemple du talc, du kaolin ou une maltodextrine.

Une maltodextrine avantageuse a une teneur équivalente en dextrose (DE) comprise entre 15 et 25.

Avantageusement, le microorganisme selon l'invention est présent dans cette poudre sèche ré hydratable en une teneur d'au moins

10^8 CFU/g, de préférence d'au moins 10^9 CFU/g, de préférence d'au moins $5*10^9$ CFU/g, de préférence d'au moins 10^{10} CFU/g.

Typiquement, 100 grammes de cette poudre sèche ré hydratable sont appliqués sur une surface d'1 Ha.

En d'autres termes, ceci implique une quantité du microorganisme selon l'invention d'au moins 10^{10} CFU/Ha, de préférence moins 10^{11} CFU/Ha, de préférence au moins $5*10^{11}$ CFU/Ha, de préférence au moins 10^{12} CFU/Ha.

Selon une autre alternative avantageuse, dans la composition biostimulante selon l'invention, mais également dans les procédés de biostimulation (qui sera décrit ultérieurement), les spores du microorganisme de l'invention sont formulées dans une dispersion huileuse (huile végétale), de préférence en conditions anhydre (moins de 10% en poids d'eau, de préférence moins de 2% en poids en eau).

Ceci permet le maintien du microorganisme selon l'invention sous forme sporulée, ce qui augmente la durée de conservation, de préférence au moins 6 mois.

Ceci permet également une formulation homogène pour le produit destiné à être appliqué, sans devoir varier la concentration : selon les besoins, une dilution plus ou moins forte de la composition huileuse comprenant le microorganisme selon l'invention sera pratiquée avant l'application. En outre, ceci permet l'application de volumes réalistes, compatibles avec les instruments agricoles ou horticoles, par unité de surface.

De préférence, dans cette formulation huileuse, le microorganisme selon l'invention est présent en une teneur d'au moins 10^8 CFU/ml, de préférence d'au moins $2*10^8$ CFU/ml, de préférence d'au moins $5*10^8$ CFU/ml, de préférence d'au moins 10^9 CFU/ml.

Les inventeurs ont remarqué qu'une application de 100 ml de cette suspension (après dilution) sur une surface d'un hectare permettait un effet biostimulant.

En d'autres termes, ceci implique une quantité d'au moins 10^{10} CFU/Ha, de préférence au moins 2* 10^{10} CFU/Ha, de préférence au moins 5*10^{10} CFU/Ha, de préférence au moins 10^{11} CFU/Ha.

Ainsi, une forme avantageuse de la composition biostimulante est une suspension du microorganisme dans l'huile en présence d'agents tensioactifs, de manière à permettre une dilution dans l'eau sous forme d'une émulsion (huile dans l'eau), et un volume de cette émulsion, qui est le multiple de la dilution réalisée, sera appliqué au champ (facteur de dilution *100 ml/Ha).

Selon une variante de cette alternative, la formulation (suspension) huileuse est appliquée directement pour l'enrobage des graines ou de tubercules, soit telle quelle, soit sous forme d'une émulsion dans l'eau.

Les inventeurs ont remarqué que des teneurs du microorganisme selon l'invention dans l'enrobage d'au moins 10^{9} CFU/Ha fonctionnent bien, de préférence des teneurs comprises entre 10^{9} CFU/Ha et 10^{12} CFU/Ha, de préférence entre 10^{10} CFU/Ha et 10^{11} CFU/Ha.

Avantageusement, cette teneur est définie par unité de surface. Ainsi, dans ce cadre, la quantité de microorganisme par graine du végétal à semer est adaptée, selon la densité de graines à l'hectare.

En effet, les inventeurs ont remarqué que, selon les végétaux (ex. la chicorée), des teneurs trop fortes du microorganisme selon l'invention risquent de ralentir la germination.

La composition biostimulante est ainsi avantageusement adsorbée à la graine du végétal d'intérêt, ou appliquée sur le tubercule du végétal d'intérêt (pomme de terre, topinambour), ce qui permet à la fois d'assurer la proximité entre le microorganisme biostimulant selon l'invention et le végétal d'intérêt, mais également de ne pas dupliquer les travaux agricoles (i) d'application de la composition biostimulante et (ii) des semailles. En effet, l'enrobage des graines d'un végétal d'intérêt est une pratique répandue. L'addition du microorganisme selon l'invention se fera donc avantageusement à l'occasion de cette étape, tout en s'assurant que cette technique soit pratiquée dans des conditions compatibles avec la survie du microorganisme. Un enrobage préféré comprend l'application d'une formulation huileuse comprenant le microorganisme selon l'invention (voir ci-dessus). De préférence, l'enrobage augmente la résistance des spores, même dans des conditions extrêmes (acidité, alcalinité, stress hydrique prolongé, toxicité au niveau du sol), tout en permettant le passage en forme végétative dès que les conditions sont favorables à la germination.

Ainsi, avantageusement, le microorganisme selon l'invention est incorporé dans l'enrobage de graines de poacées (graminées), par exemple le maïs, le blé dur, le blé tendre, l'orge, le seigle, le triticale, l'avoine ; dans l'enrobage de graines de légumineuses, par exemple le soja, le haricot, le petit pois, la fève des marais, la cacahuète, la lentille ; dans l'enrobage de graines de cucurbitacées, par exemple la courge, le melon, la pastèque, le potiron, le potimarron ; dans l'enrobage de graines de astéracées, par exemple, la salade, la chicorée, le tournesol, l'artichaud, le cardon ; dans l'enrobage de graines de solanacées, par exemple la tomate, l'aubergine, le piment ; dans l'enrobage de graines de crucifères, par exemple le colza ou le choux ; ou dans l'enrobage de graines de betterave, de carotte et de fraise.

En outre, de manière similaire, les tubercules, par exemple de pomme de terre ou de topinambour, sont avantageusement combinés au microorganisme selon l'invention lorsqu'ils sont placés en terre, par exemple par aspersion directe dans les sillons.

Selon l'autre alternative, le microorganisme selon l'invention est avantageusement formulé en granules, en particulier des microgranules, où des spores du microorganisme selon l'invention sont mélangées et/ou incorporées à des particules comprenant au moins 40% en poids de carbonate de calcium et/ou de magnésium (ex. calcite et/ou dolomie), de préférence au moins 60% en poids de carbonate de calcium et/ou de magnésium. Une teneur avantageuse en poids de carbonate de calcium et/ou de magnésium est ainsi comprise entre 40 et 80% en poids. Dans le contexte de la présente invention, la teneur en poids de carbonate de calcium et/ou de magnésium dans les granules signifie de préférence le ratio entre le poids de carbonate de calcium et/ou de magnésium dans les granules divisé par le poids total des constituants des granules, hormis le microorganisme selon l'invention.

Les granules (microgranules) selon l'invention ont avantageusement un diamètre compris entre 0,5 et 2 mm, de préférence entre 1 et 1,5 mm.

Ceci permet, avantageusement, l'application des microorganismes directement dans le sillon du semis : les granules selon l'invention peuvent être appliqués en même temps que les graines du végétal d'intérêt.

De préférence ces granules permettent l'application d'une quantité d'au moins 10^{10} CFU/Ha, de préférence au moins 10^{11} CFU/Ha, de préférence au moins $5*10^{11}$ CFU/Ha, de préférence au moins 10^{12} CFU/Ha de microorganismes selon l'invention.

Ainsi, ces granules ont une teneur en microorganismes selon l'invention, avantageusement, d'environ 10^8 CFU/ gramme de granule.

Ainsi, comme cela sera décrit plus loin, l'application d'au moins 1, au moins 2, au moins 5 kg de ces granules par Ha permet une teneur suffisante en microorganismes que pour obtenir l'effet biostimulant, par exemple une quantité comprise entre 1 et 20 kg, de préférence entre 2 et 10 kg est avantageusement appliquée à un Ha de culture.

En outre, de préférence, les produits incorporés via les granules sont essentiellement naturels (carbonate de calcium et/ou de magnésium comme décrit ci-dessus et à une teneur d'au moins 40% en poids, voir un hydrogéno-carbonate de potassium, aluminosilicates, polymères naturels tels que des polysaccharides (ex. maltodextrines, dérivés de l'amidon, des dérivés de la chitine, des arabinoxylans, des glucosaminoglycans, des beta glucans), des dérivés de lignine, des polyols (ex. le mannitol), des disaccharides, des trisaccharides, des biostimulants naturels, des oligoéléments, des acides aminés), ce qui est totalement compatible avec la biologie du sol.

De plus, ces bactéries restent sous forme de spore jusqu'à ce qu'une teneur en eau dans l'environnement dépasse un certain seuil, ce qui va correspondre avec la croissance des racines du végétal d'intérêt et donc assurer une bonne synergie, vu la concordance temporelle.

Avantageusement, grâce à cette formulation, la viabilité des spores est longue, de préférence au moins 9 mois.

Enfin, les spores, faisant partie des granules, vont être activées de manière progressive, du fait de la résorption de ces granules au cours du temps.

Tout ceci permet une activation robuste, durable et à un moment offrant une synergie avec le métabolisme du végétal d'intérêt.

Un autre aspect lié de la présente invention porte sur un procédé pour accroitre la croissance d'un végétal comprenant l'étape d'administration de la composition biostimulante décrite ci-dessus (ayant un plasmide ayant au moins 95%, 96, 97, 98, 99% d'identité avec SEQ ID NO :1, voire 100% d'identité).

Dans ce procédé, avantageusement, la souche a au moins 90% (de préférence au moins 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%) d'identité avec SEQ ID NO :5, voire 100% d'identité.

Avantageusement, la croissance accrue est celle des racines, de la tige et/ou du poids du végétal.

De préférence, dans ce procédé, la croissance accrue est mesurée au moins 40, 45, 50, 55, 60, 65 jours après l'administration de la composition biostimulante au végétal.

Avantageusement, selon une alternative de ce procédé, la composition biostimulante est appliquée sur le sol lors des semailles (via l'enrobage des graines ou via l'addition des granules).

Avantageusement, outre l'application concomitante, ou selon l'autre alternative de ce procédé, la composition biostimulante est appliquée sur le sol après que ledit végétal ait été planté ou que la graine dudit végétal ait été semée.

Ainsi, comme décrit ci-dessus, le microorganisme selon l'invention est appliqué dans l'enrobage de la graine du végétal, ou par aspersion du tubercule et/ou est appliqué lors des semailles via les granules décrites ci-dessus, et/ou est ensuite appliqué au végétal, postémergence, via pulvérisation de la suspension huileuse ou de l'émulsion comprenant la suspension huileuse décrites ci-dessus, voire via l'irrigation.

Les inventeurs ont remarqué que ceci permet de réduire la charge en microorganisme selon l'invention qui est appliquée à l'enrobage de la graine (ou du tubercule), tout en administrant une quantité suffisante de microorganismes. Ainsi, cela permet d'offrir l'effet biostimulant maximal.

De préférence, le végétal est choisi parmi :

Les poacées (graminées), par exemple le maïs, le blé dur, le blé tendre, l'orge, le seigle, le triticale, l'avoine ;

Les légumineuses, par exemple le soja, le haricot, le petit pois, la fève des marais, la cacahuète, la lentille ;

Les cucurbitacées, par exemple la courge, le melon, la pastèque, le potiron, le potimarron, le concombre ;

Les astéracées, par exemple, la salade, la chicorée, le tournesol, le topinambour, l'artichaud, le cardon ;

Les solanacées, par exemple la tomate, la pomme de terre, l'aubergine, le piment ;

Les crucifères, par exemple le colza ou les choux ;

La betterave, la carotte, la fraise, la banane, le kiwi ;

Les plantes d'horticulture (géranium, pélargonium, chrysanthème), et

Les plantes d'arboriculture (pommier, poirier, abricotier, cerisier, pêcher, vigne). Le gazon (graminées, trèfle ; production fourragère ou horticole) bénéficie également de la composition selon l'invention, de préférence via pulvérisation.

Ainsi, dans ce procédé, l'application de la formulation liquide, donc de la suspension huileuse ou de l'émulsion décrites ci-dessus, peut se faire avantageusement via pulvérisation ou via l'irrigation. Comme décrit ci-dessus, la formulation du microorganisme dans l'huile est avantageuse, et cette formulation peut ensuite être diluée dans l'eau (y compris pour y former une émulsion).

Dans ce procédé, de préférence, la souche en suspension dans l'huile (voir ci-dessus) ou diluée dans l'émulsion huile dans l'eau (voir ci-dessus) est appliquée au végétal (enrobage de la graine et/ou pulvérisation) à la concentration de au moins 10^9 CFU/millitre, de préférence au moins 10^{10} CFU/millitre, au moins de au moins 10^{11} CFU/millitre, par exemple à une concentration d'environ 10^{12} CFU/militre.

Avantageusement, selon une alternative, ou en outre, une quantité de 0,1 à 20 kg/Ha de la composition biostimulante sous forme de granules (voir ci-dessus) est appliquée par hectare, de préférence de 0,5 à 10 kg/Ha, de préférence de 1 à 5 kg/Ha.

Un autre aspect lié de la présente invention porte sur une utilisation d'une souche choisie parmi *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, et *Bacillus licheniformis*, ayant incorporé un plasmide ayant au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO :1 pour accroitre la croissance de végétaux.

Un autre aspect lié de la présente invention porte sur une utilisation d'une souche choisie parmi *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, et *Bacillus licheniformis*, ayant incorporé un plasmide encodant SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3 et/ou SEQ ID NO :4 pour accroitre la croissance de végétaux.

Un autre aspect lié de la présente invention porte sur un procédé pour accroitre la production, par une souche choisie parmi

Bacillus subtilis, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, et *Bacillus licheniformis*, de cyclopeptides lipidiques, de préférence choisis parmi la surfactine, l'iturine, la fengycine et les mélanges de ceux-ci, comprenant l'étape de transfecter cette souche avec un plasmide ayant au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO :1.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention seront tirés de la description non limitative qui suit, et en faisant référence aux dessins et aux exemples.

Exemples.-

Il est bien entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux formes de réalisations décrites ci-dessus et que bien des modifications peuvent y être apportées sans sortir du cadre des revendications annexées.

Exemple 1 :

Les inventeurs ont identifié une souche de *Bacillus amyloliquefaciens* qui présente des propriétés intéressantes en termes de biostimulation et l'ont dénommée AG002/2.

Les inventeurs ont réalisé une analyse génétique. Cette souche comporte le plasmide de SEQ ID NO :1, et ce plasmide est stable. Les inventeurs considèrent ceci comme un événement rare, les plasmides pouvant plutôt être soit incorporés dans le génome, soit être perdus, ce qui est plus fréquent lorsqu'il n'y a qu'un faible nombre de copies par cellule.

En outre, les inventeurs ont démontré qu'il n'y avait qu'un seul plasmide par cellule.

Example 2 :

Les inventeurs ont formulé la souche selon l'invention à 10^{12} CFU/kg. Ensuite, entre 0,25 et 4 kg de cette formulation ont été appliqués par hectare, et comparé à l'effet de 1 L/Ha du produit Serenade® (également 10^{12} CFU/l), qui est une autre souche spécifique de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Les plantes testées ont été le maïs (variété LG30258), le blé (variété Quintus), le concombre (variété Sonja) et la tomate (variété Prestige F1).

Différents paramètres de la croissance des végétaux ont été mesurés, tels que la hauteur, la vigueur ou la teneur en chlorophylle.

Les résultats sont montrés aux Figures 1-4 par rapport au produit SERENADE, et 5-8 par rapport au produit RhiZoBas (dose, 1 kg/Ha ; hauteur des plants en cm).

La composition selon l'invention a causé l'accroissement de la taille des végétaux testés (maïs, Figures 1 et 5 ; blé, Figures 2 et 6, tomate, Figures 3 et 7 ; concombre Figures 4, 8), de 10 à 50% pour la dose à 4% (moins pour les doses plus faibles). Cet accroissement est plus marqué pour la souche AG002/2 que pour le produit Serenade®.

En outre, la vigueur des végétaux a été mesurée, et est fortement accrue par la souche AG002/2, et un accroissement marginal, seulement, a été observé dans le contrôle où le produit biostimulant est le Serenade®.

Les mêmes formulations ont été testées en synergie avec une composition fertilisante minérale comprenant de l'azote, du phosphore et du potassium. Le contrôle est la formulation Rhizobas (à 1 kg/Ha). L'effet bénéfique sur la croissance se retrouve pour les végétaux testés, mais l'effet spécifique de la souche AG002/2 est réduit. Il y a également un

effet bénéfique de la souche AG002/2 pour la vigueur du blé. Cependant, l'effet dose-réponse est moins évident.

Exemple 3 :

Un test en condition réelles a été pratiqué sur la chicorée en mesurant l'émergence (%) et la croissance (exprimée en % de la croissance désirée). A nouveau, la composition à base d'AG002/2 a permis une augmentation de l'émergence (par exemple de 51,5 à 56% à 22 jours, puis de 54 à 59% à 29 jours), ainsi que de la croissance (de 42 à 46% à 22 jours et de 39 à 47% à 29 jours).

REVENDICATIONS

1. Une composition biostimulante comprenant une souche de *Bacillus amyloliquefaciens* ayant incorporé un plasmide ayant au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO :1.
2. La composition biostimulante selon la revendication 1 dans laquelle la souche de *Bacillus* a au moins 90% d'identité avec SEQ ID NO :5, ladite identité étant calculée sur toute la longueur de ladite SEQ ID NO :5.
3. La composition biostimulante selon la revendication 1 ou 2 dans laquelle la souche de *Bacillus* a incorporé une copie unique du plasmide ayant au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO :1.
4. La composition biostimulante selon une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle la souche de *Bacillus* a incorporé le plasmide ayant au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO :1 et ledit plasmide en outre encodant un peptide ayant 100% d'identité avec SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3 et/ou SEQ ID NO :4.
5. La composition biostimulante selon une quelconque des revendications précédentes, étant une huile végétale comprenant la souche de *Bacillus amyloliquefaciens* ou une émulsion huile dans l'eau comprenant la souche de *Bacillus amyloliquefaciens*.
6. La composition biostimulante selon une quelconque des revendications précédentes 1 à 4 étant sous forme de granules, lesdites granules comprenant au moins 40% en poids de carbonate de calcium et/ou de carbonate de magnésium (poids des carbonates de calcium et/ou de magnésium : poids des granules exempts du *Bacillus amyloliquefaciens*), de préférence lesdites granules ayant un diamètre compris entre 0,5 mm et 2 mm.
7. La composition biostimulante selon une quelconque des revendications précédentes 1 à 4 étant sous forme d'une poudre

sèche ré hydratable, comprenant en outre un agent de charge et un agent tensioactif.

8. La composition biostimulante selon la revendication 7 dans laquelle l'agent de charge est choisi parmi un silicate, de préférence le talc ou le kaolin, et/ou un polysaccharide, de préférence une maltodextrine.
9. Une graine d'un végétal d'intérêt enrobée par la composition biostimulante selon une quelconque des revendications précédentes 1 à 5.
10. Un procédé pour accroitre la croissance de végétaux comprenant l'étape d'administrer auxdits végétaux la composition biostimulante selon une quelconque des revendications précédentes 1 à 8, ou la graine enrobée selon la revendication 9.
11. Le procédé selon la revendication 10 dans lequel la composition biostimulante est appliquée dans ou sur le sol avant que ledit végétal ne soit planté ou que la graine dudit végétal ne soit semée ou, avantageusement, substantiellement en même temps que la graine dudit végétal est semée.
12. Le procédé selon la revendication 10 ou 11 dans lequel la composition biostimulante est appliquée sur le sol après que ledit végétal ait été planté ou que la graine dudit végétal ait été semée.
13. Le procédé selon une quelconque des revendications 10 à 12 dans lequel le végétal est choisi parmi les poacées, les légumineuses, les cucurbitacées, les solanacées, les astéracées, les crucifères, la betterave, la carotte, la tomate, la fraise, la banane, le kiwi, le géranium, le pélargonium, le chrysanthème, le pommier, le poirier, l'abricotier, le pêcher et la vigne, de préférence la tomate, le maïs, le blé la chicorée ou le concombre.

14. Le procédé selon une quelconque des revendications 10 à 13 dans lequel la croissance accrue est celle des racines, de la tige et/ou le poids du végétal.

15. Le procédé selon une quelconque des revendications 10 à 14 dans lequel la croissance accrue est mesurée au moins 40, 45, 50, 55, 60, 65 jours après l'administration de la souche de *Bacillus*.

16. Procédé pour accroitre la production, par une souche choisie parmi *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, et *Bacillus licheniformis*, de cyclopeptides lipidiques, de préférence choisis parmi la surfactine, l'iturine, la fengycine et les mélanges de ceux-ci, comprenant l'étape de transfecter ladite souche avec un plasmide ayant au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO :1.

17. Le procédé selon la revendication 16 dans lequel la souche comprend au moins 90% d'identité avec SEQ ID NO :5, ladite identité étant calculée sur toute la longueur de ladite SEQ ID NO :5.

18. Utilisation d'une souche choisie parmi *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, et *Bacillus licheniformis*, ayant incorporé un plasmide ayant au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO :1 pour accroitre la croissance de végétaux.

19. Utilisation d'une souche choisie parmi *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, et *Bacillus licheniformis*, ayant incorporé un plasmide encodant SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3 et/ou SEQ ID NO :4 pour accroitre la croissance de végétaux.

20. Utilisation d'une souche selon la revendication 18 ou 19 dans laquelle la souche a au moins 90% d'identité avec SEQ ID NO :5, ladite identité étant calculée sur toute la longueur de ladite SEQ ID NO :5.

21. Utilisation selon une quelconque des revendications précédentes 18 à 20, dans laquelle le végétal est choisi parmi les poacées, les légumineuses, les cucurbitacées, les solanacées, les astéracées, les

crucifères, la betterave, la carotte, la tomate, la fraise, la banane, le kiwi, le géranium, le pélargonium, le chrysanthème, le pommier, le poirier, l'abricotier, le pêcher et la vigne, de préférence la tomate, le maïs, le blé la chicorée ou le concombre.

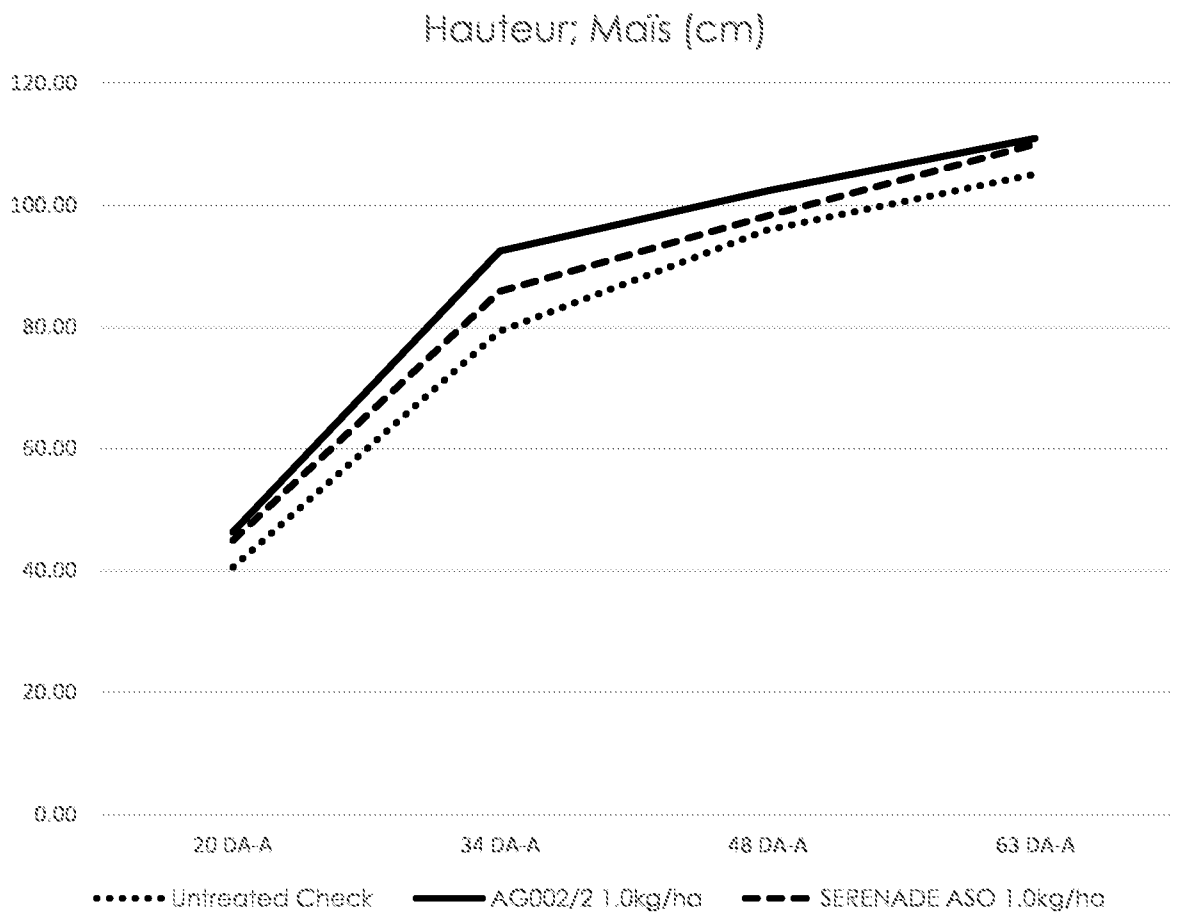

Hauteur; Maïs (cm)
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
20 DA-A
34 DA-A
48 DA-A
63 DA-A
Untreated Check
AG002/2 1.0kg/ha
SERENADE ASO 1.0kg/ha

Fig. 1

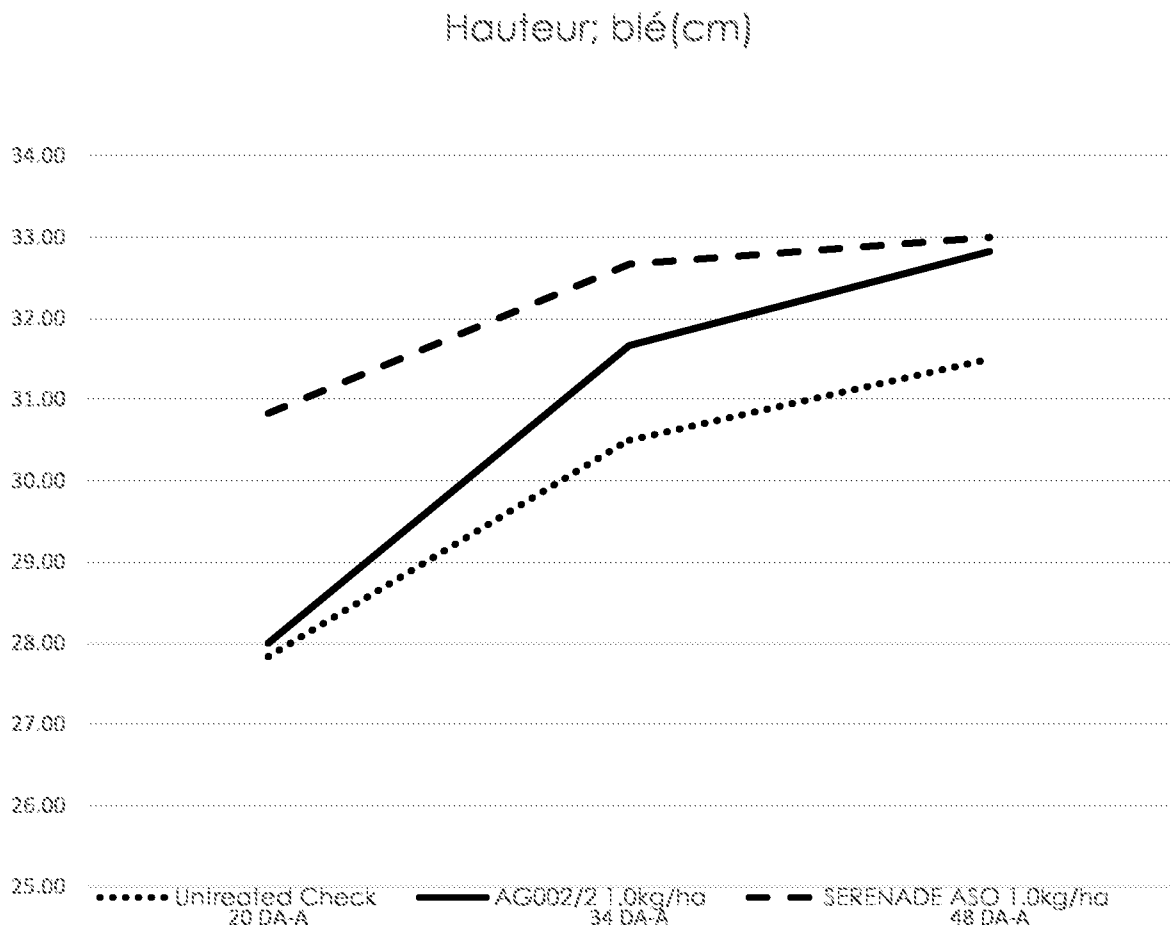

Hauteur; blé(cm)
34.00
33.00
32.00
31.00
30.00
29.00
28.00
27.00
26.00
25.00
Untreated Check
20 DA-A
AG002/2 1.0kg/ha
34 DA-A
SERENADE ASO 1.0kg/ha
48 DA-A

Fig. 2

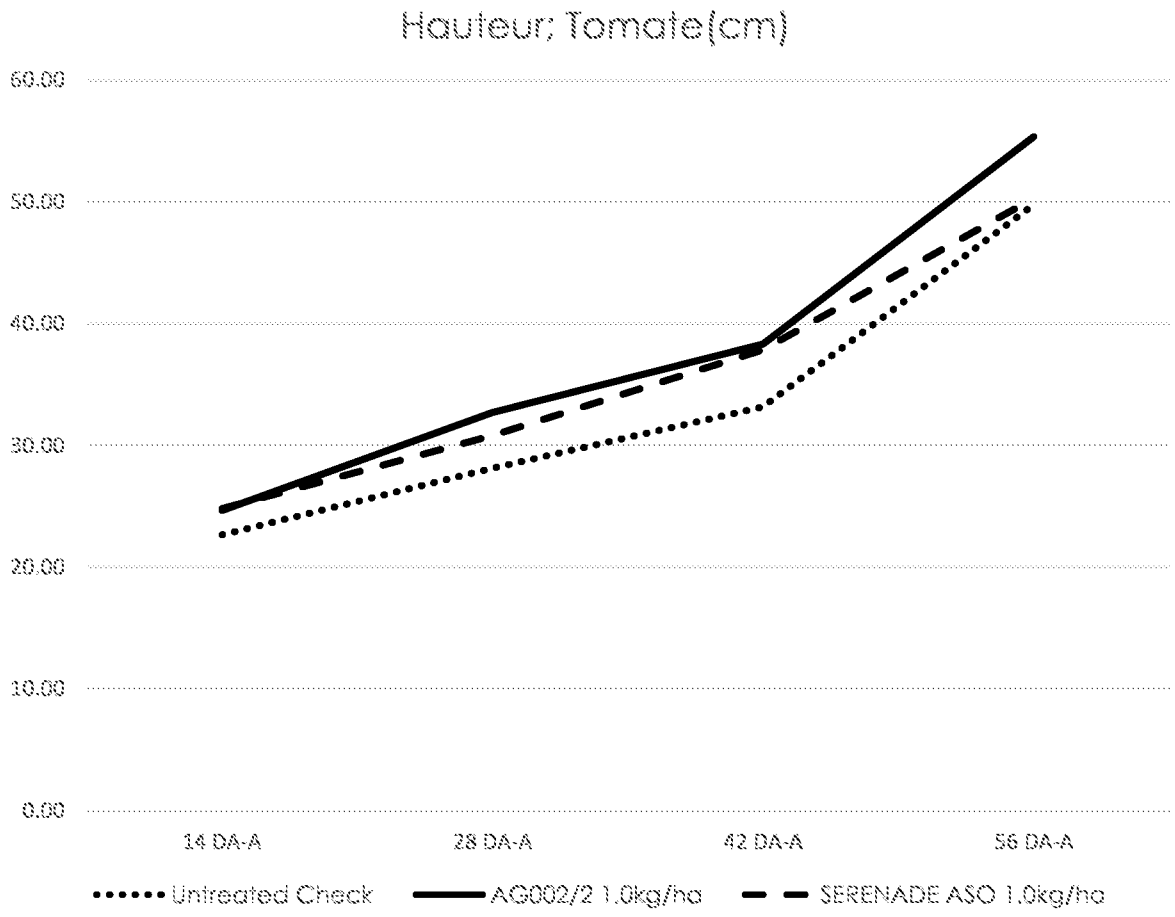

Hauteur; Tomate(cm)
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
14 DA-A
28 DA-A
42 DA-A
56 DA-A
Untreated Check
AG002/2 1.0kg/ha
SERENADE ASO 1.0kg/ha

Fig. 3

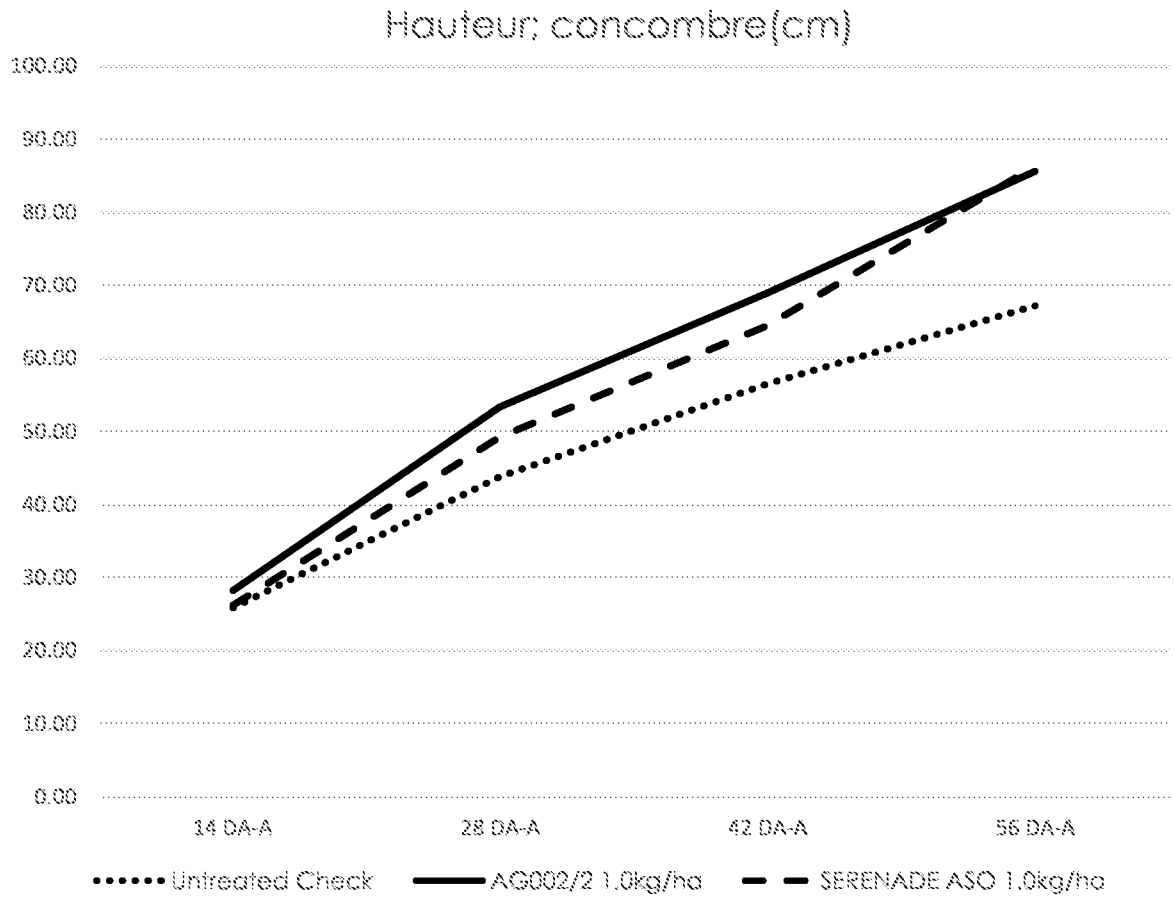

Hauteur; concombre(cm)
100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
14 DA-A
28 DA-A
42 DA-A
56 DA-A
Untreated Check
AG002/2 1.0kg/ha
SERENADE ASO 1.0kg/ha

Fig. 4

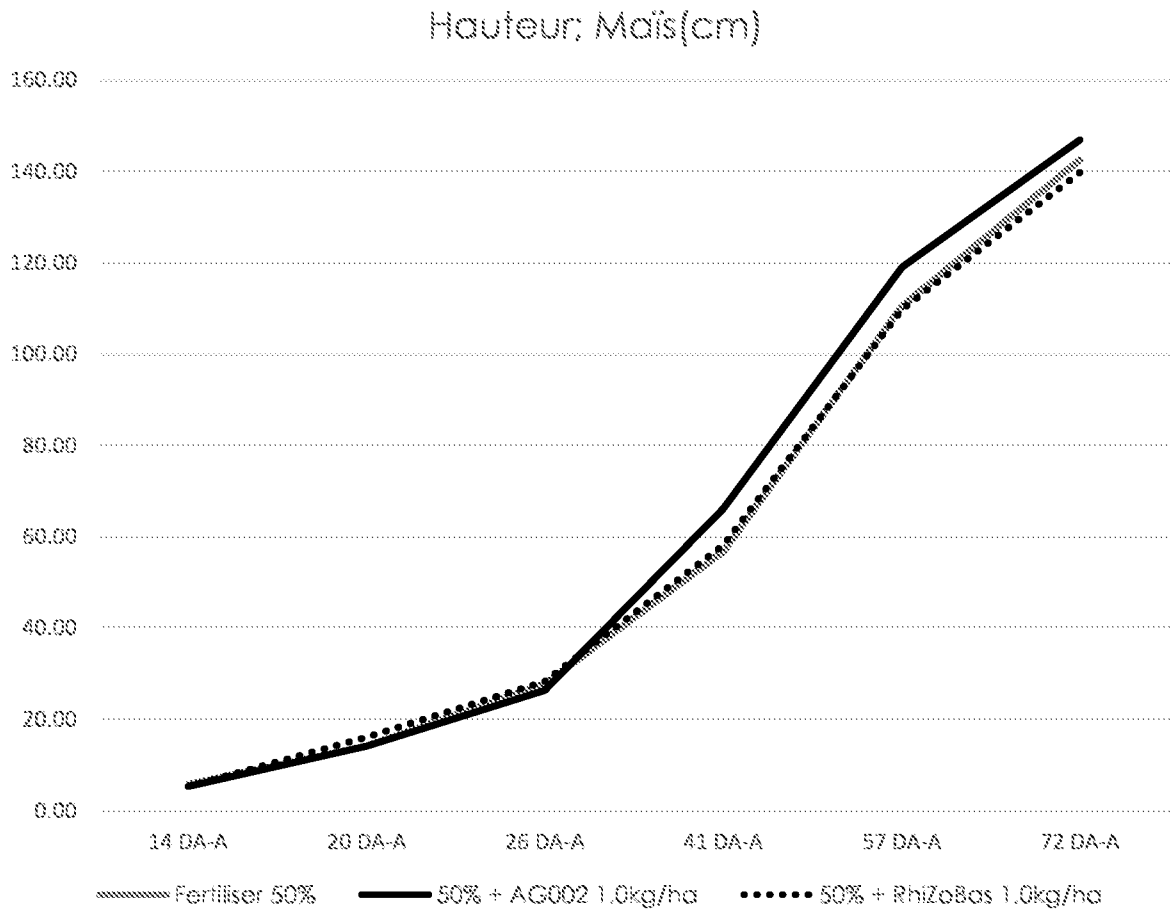

Hauteur; Maïs(cm)
160.00
140.00
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
14 DA-A
20 DA-A
26 DA-A
41 DA-A
57 DA-A
72 DA-A
Fertiliser 50%
50% + AG002 1.0kg/ha
50% + RhiZoBas 1.0kg/ha

Fig. 5

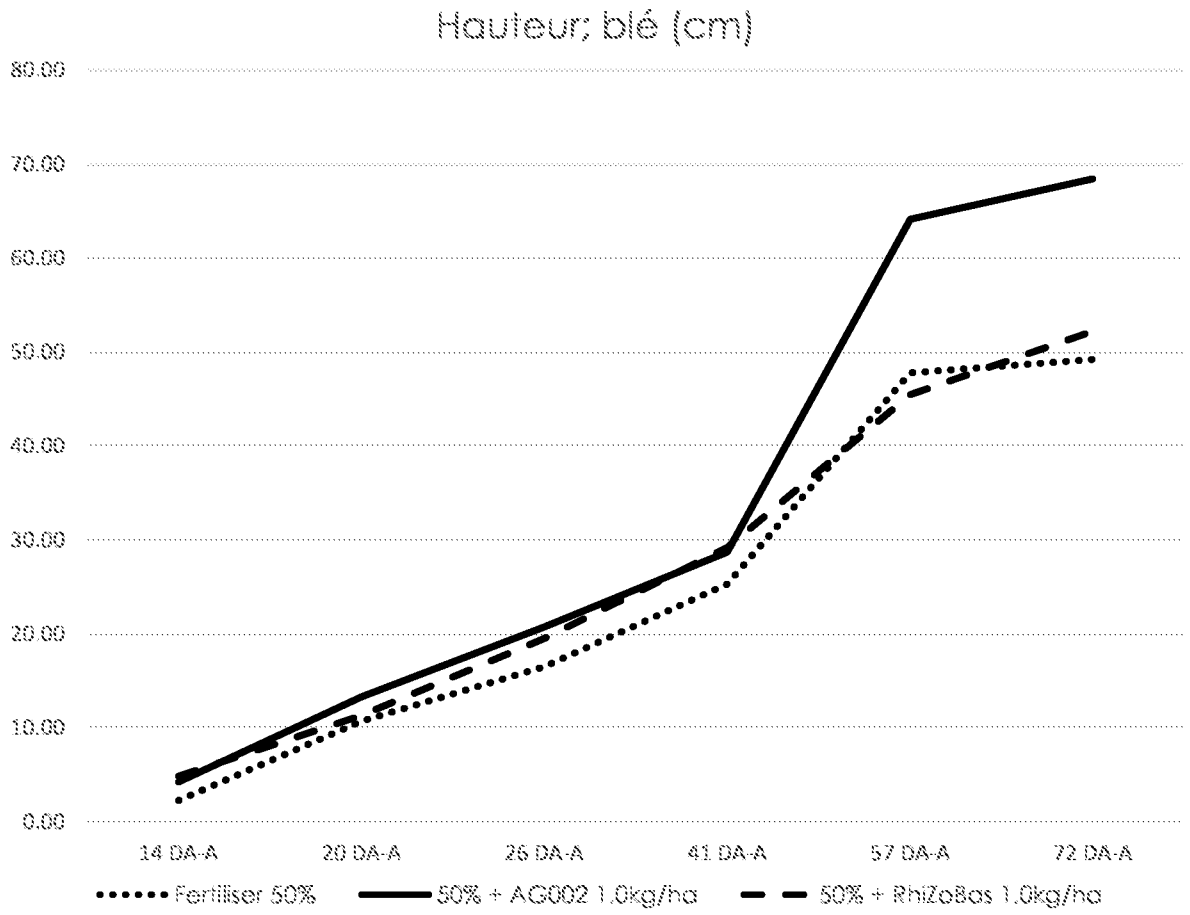

Hauteur; blé (cm)
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
14 DA-A
20 DA-A
26 DA-A
41 DA-A
57 DA-A
72 DA-A
Fertiliser 50%
50% + AG002 1.0kg/ha
50% + RhiZoBas 1.0kg/ha

Fig. 6

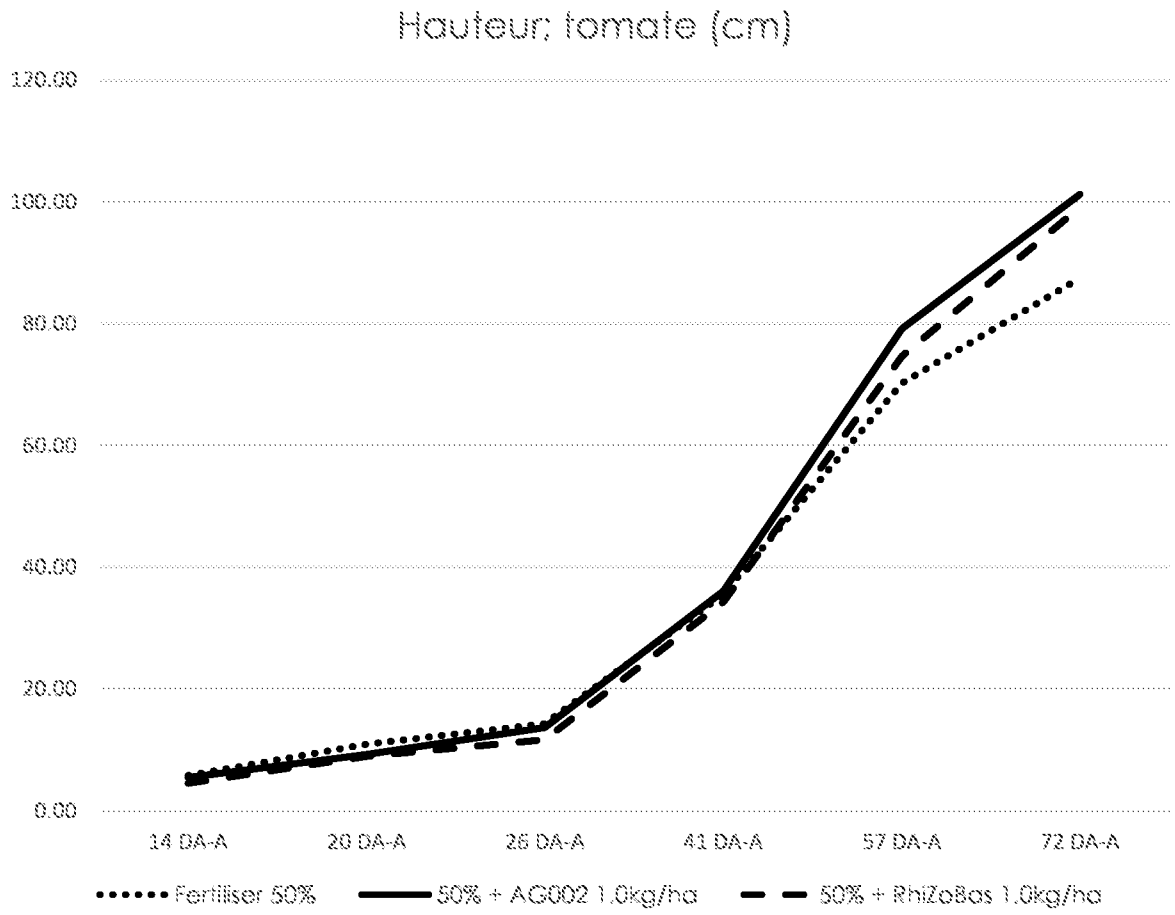

Hauteur; tomate (cm)
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
14 DA-A
20 DA-A
26 DA-A
41 DA-A
57 DA-A
72 DA-A
Fertiliser 50%
50% + AG002 1.0kg/ha
50% + RhiZoBas 1.0kg/ha

Fig. 7

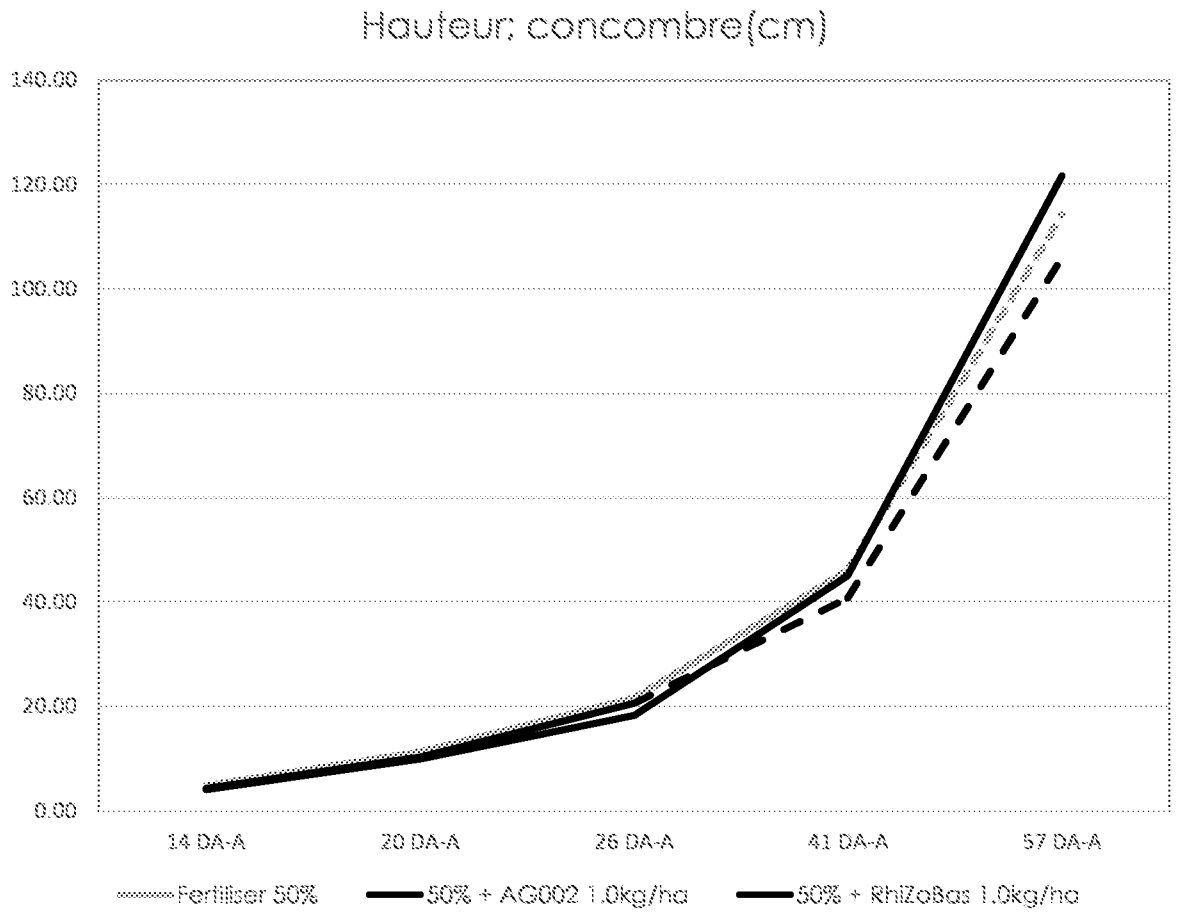

Hauteur; concombre(cm)
140.00
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
14 DA-A
20 DA-A
26 DA-A
41 DA-A
57 DA-A
Fertiliser 50%
50% + AG002 1.0kg/ha
50% + RhiZoBas 1.0kg/ha

Fig. 8

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ÉTABLI EN VERTU DE L'ARTICLE XI.23., §10 DU CODE DE DROIT ÉCONOMIQUE BELGE

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE	REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE
	PAT-20533-BE00
Demande nationale belge n°	Date du dépôt
202305565	06-07-2023
	Date de priorité revendiquée
Déposant (Nom)	
AGRICELLS	
Date de la requête d'une recherche de type international	Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international
15-07-2023	SN84281

I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous)

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

Voir rapport de recherche

II. DOMAINES RECHERCHES

Documentation minimale consultée	
Système de classification	Symboles de la classification
IPC	Voir rapport de recherche

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents fort partie des domaines consultés

III. ☐ **IL A ETE ESTIME QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE** (Observations sur la feuille supplémentaire)

IV. ☐ **ABSENCE D'UNITE DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE A L'ETENDUE DE LA RECHERCHE** (Observations sur la feuille supplémentaire)

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No

BE 202305565

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. A01N63/22 A01P21/00 C12N1/20

ADD.

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

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

A01N C12R A01P C12N

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 réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A,D	**ARGUELLES-ARIAS ANTHONY ET AL: "Bacillus amyloliquefaciens GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens", MICROBIAL CELL FACTORIES, SPRINGER, vol. 8, no. 1, 26 novembre 2009 (2009-11-26), page 63, XP021063197, ISSN: 1475-2859, DOI: 10.1186/1475-2859-8-63 cité dans la demande * le document en entier * -----** **-/--**	**1-21**

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

[X] 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 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, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt 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 de type international a été effectivement achevée	Date d'expédition du rapport de recherche de type international
16 janvier 2024	

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	**Bertrand, Franck**

1

Formulaire PCT/ISA/201 (deuxième feuille) (Janvier 2004)

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No

BE 202305565

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	KOUMOUTSI A ET AL: "Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in Bacillus amyloliquefaciens strain FZB42", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 186, no. 4, 1 février 2004 (2004-02-01), pages 1084-1096, XP002301555, ISSN: 0021-9193, DOI: 10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004 * le document en entier *	1-21
A	JP 2002 360264 A (SAKAI TAKUO) 17 décembre 2002 (2002-12-17) * le document en entier *	1-21
X	US 10 888 593 B2 (UNIV AUBURN [US]) 12 janvier 2021 (2021-01-12) * le document en entier *	1-21
X	CN 101 475 944 A (UNIV NANJING AGRICULTURAL [CN]) 8 juillet 2009 (2009-07-08) * le document en entier *	1-21

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n

BE 202305565

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP 2002360264 A	17-12-2002	JP 4869501 B2	08-02-2012
		JP 2002360264 A	17-12-2002
US 10888593 B2	12-01-2021	BR 112017006629 A2	03-07-2018
		CA 3000621 A1	07-04-2016
		CN 107205403 A	26-09-2017
		EP 3200590 A1	09-08-2017
		ES 2835731 T3	23-06-2021
		US 2017202888 A1	20-07-2017
		US 2020009200 A1	09-01-2020
		US 2022095628 A1	31-03-2022
		WO 2016054222 A1	07-04-2016
CN 101475944 A	08-07-2009	AUCUN	

OPINION ÉCRITE

Dossier N°	Date du dépot *(jour/mois/année)*	Date de priorité *(jour/mois/année)*	Demande n°
SN84281	06.07.2023		BE202305565

Classification internationale des brevets (CIB)
INV. A01N63/22 A01P21/00 C12N1/20

Déposant
AGRICELLS

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- ☒ Cadre n° I Base de l'opinion
- ☐ Cadre n° II Priorité
- ☐ Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- ☐ Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- ☒ Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- ☐ Cadre n° VI Certains documents cités
- ☐ Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- ☐ Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

Examinateur
Bertrand, Franck

Demande n°

OPINION ÉCRITE

BE202305565

Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.

2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, la présente opinion a été effectuée sur la base d'un listage des séquences

   a. ☐ faisant partie de la demande telle que déposée.

   b. ☐ remis postérieurement à la date du dépôt aux fins de la recherche,

      ☐ accompagné d'une déclaration selon laquelle le listage des séquences ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée.

3. ☐ En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande, la présente opinion a été effectuée dans la mesure où une opinion valable pouvait être formulée en l'absence d'un listage des séquences conforme à la norme ST.26 de l'OMPI.

4. Commentaires complémentaires :

   voir feuille séparée

Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui :	Revendications	1-21
	Non :	Revendications	
Activité inventive	Oui :	Revendications	
	Non :	Revendications	1-21
Possibilité d'application industrielle	Oui :	Revendications	1-21
	Non :	Revendications	

2. Citations et explications

   voir feuille séparée

Ad point I

Base du rapport

Il est fait référence aux documents suivants :

D1 ARGUELLES-ARIAS ANTHONY ET AL: "Bacillus amyloliquefaciens GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens", MICROBIAL CELL FACTORIES, vol. 8, no. 1, 26 novembre 2009, page 63, XP021063197

D2 KOUMOUTSI A ET AL: "Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in Bacillus amyloliquefaciens strain FZB42", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 186, no. 4, 1 février 2004, pages 1084-1096, XP002301555

D3 JP 2002 360264 A (SAKAI TAKUO) 17 décembre 2002

D4 US 10 888 593 B2 (UNIV AUBURN [US]) 12 janvier 2021

D5 CN 101 475 944 A (UNIV NANJING AGRICULTURAL [CN]) 8 juillet 2009

Ad point V

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ; citations et explications à l'appui de cette déclaration

La présente invention concerne la biostimulation de plantes au moyen d'un bacille modifié par un vecteur de séquence donnée, en particulier pour produire une iturine, une fengycine ou une surfactine.

Seul D3 décrit un bacille portant une séquence pertinente, mais ne mentionne pas la production des actifs ci-dessus ni la stimulation des plantes. Ce bacille selon D3 étant un *B.subtilis* et non un *B.amyloliquefasciens* comme présentement requis dans la présente revendication 1, l'objet des présentes revendications 1-21 est considéré comme nouveau.

D2, D4 ou D5 peuvent constituer l'état de la technique le plus proche. Le déposant a choisi de comparer une souche précise, AG002/2 (qui n'est pas disponible pour le public), avec un bacille biostimulant emblématique contenu dans le produit Serenade®.

Cependant, celui-ci n'est pas le seul connu pour ces effets, ni même nécessairement le plus efficace. De plus, l'effet mesuré était le développement des plantes, mais sans préciser si le milieu de croissance était stérile. Or les métabolites envisagés sont des biocides notoires. Ainsi, l'homme du métier s'attendra à ce qu'une culture moins affectée par les pathogènes (du fait d'un traitement plus efficace à base d'iturine, fengycine et/ou surfactine visant à les éliminer) se développe mieux.

En outre, rien ne permet de déduire des expériences que c'est la séquence sur le plasmide qui conduit à l'effet observé, ni même que la similarité de séquence requise soit suffisante dans tous les cas pour conserver cet effet.

Le plasmide est décrit comme stable dans le cas d'espèce, mais si cette observation devait être surprenante, il devient de même impossible d'extrapoler à d'autres combinaisons génome-plasmide, puisque les plasmides et les hôtes peuvent tous deux être variés.

Enfin, en page 7, ligne 4, le déposant évoque une synergie entre le génome et le plasmide conduisant à l'effet observé. Une synergie est par nature imprévisible, ce qui implique par ailleurs qu'on ne peut généraliser un cas particulier (et encore moins en attribuant l'effet à des caractéristiques précises parmi d'autres sans preuve de leur implication essentielle, voir ci-dessus).

Ainsi, aucune amélioration n'a été rendue plausible sur l'ensemble de la portée des présentes revendications et le problème technique objectif à résoudre se conçoit par conséquent comme la mise à disposition d'autres moyens biostimulants. Au vu des documents cités, l'introduction d'un plasmide impliqué dans la production des métabolites pertinents dans un bacille d'un genre déjà employé dans le même but s'impose à l'évidence. Aucun lien de cause à effet n'a été mis en évidence non plus pour aucune des caractéristiques techniques selon les présentes revendications dépendantes. L'objet des présentes revendications 1-21 n'implique donc pas d'activité inventive.