Inventeur; et


(75) Title: BIOLOGICAL CONTROL OF FUNGAL CONTAMINATION BY APPLYING GEOTRICHUM CANDIDUM

(75) Titre : CONTROLE BIOLOGIQUE DE LA CONTAMINATION FONGIQUE PAR L’APPLICATION DE GEOTRICHUM CANDIDUM

(75) Abstract: The invention concerns a method for preventing or treating cereal contamination or fungi producing mold toxins by applying a micro-organism of the Geotrichum candidum family, by field spraying. The invention also concerns the use of a micro-organism of the Geotrichum candidum family.

(75) Abrégé : L’invention a trait à un procédé de prévention ou de traitement des contaminations de céréales ou des moisissures producteurs de mycotoxines par l’application d’un micro-organisme de la famille de Geotrichum candidum, sous forme de pulvérisation en champs. Elle porte aussi sur l’utilisation d’un micro-organisme de la famille de Geotrichum candidum.
CONTROLE BIOLOGIQUE DE LA CONTAMINATION FONGIQUE PAR L'APPLICATION DE <i>GEOTrICHUM CANDIDUM</i> <b>5</b>

L'invention a trait à l'application d'un micro-organisme, <i>GEOtrichum candidum</i>, sous forme de pulvérisation en champ, pour le traitement des céréales contaminées par des moisissures, en particulier par des souches de <i>Fusarium</i>.

La présente invention trouvera son application dans le domaine de l'agriculture.

Les maladies des céréales, en particulier les fusarioses des épis sont à l'origine de dommages importants : perte de rendement, dépréciation de la qualité de la récolte avec altération des valeurs technologiques des céréales. Ces maladies des plantes sont aussi à l'origine de la biosynthèse de mycotoxines que l'on retrouve sur les grains à la récolte.

Il est en effet connu que toutes les céréales sont contaminées par des moisissures, en particulier des souches de <i>Fusarium</i>. Les principales espèces de <i>Fusarium</i> rencontrées sur les céréales sont les espèces <i>graminearum</i>, <i>culmorum</i>, <i>sambucinum</i>, <i>poae</i>, <i>proliferatum</i>, ou encore <i>nivale</i>. Les souches contaminant les céréales produisent des mycotoxines. A titre d'exemple, les principales mycotoxines produites par <i>Fusarium</i> sont les trichothécènes de type A et B (Déoxynivalénol, Nivaléno ou T2-toxine par exemple), complémentées par la zéaralénone et les fumonisines pour le maïs. La nature des mycotoxines dépend des espèces de <i>Fusarium</i> présentes. En particulier, certaines mycotoxines résistent aux conditions de transformations et peuvent se retrouver ainsi dans les produits finis. Elles présentent alors un risque pour la sécurité alimentaire.
Il est par conséquent important de prévenir la fusariose des épis, la contamination des grains par les moisissures et la production de mycotoxines au cours de la végétation des céréales.

Le principal moyen connu de lutte contre les contaminations par les moisissures est le traitement des cultures par l'utilisation de fongicides. Il reste que l'utilisation des fongicides en agriculture pose différents problèmes : Les fongicides sont des produits chimiques biologiquement actifs et leur application en champs peut donc présenter des risques toxicologiques et écologiques. D'autre part, la faible stabilité des produits fongicides nécessite le renouvellement régulier des traitements au cours de la végétation. Le traitement doit aussi avoir un spectre d'action suffisamment large tout en étant limité aux champignons. Enfin, l'efficacité de ces traitements n'est pas totale sur épis (20 à 80% d'efficacité) et faible sur grains (0 à 30% d'efficacité). De plus des observatoires menés récemment sur différents lots de céréales montrent qu'une grande partie des lots présentent après traitement une teneur en mycotoxines encore significative de plusieurs centaines de microgrammes par kg.

Il existe donc un réel besoin de développer des méthodes de traitements des contaminations par les moisissures qui constituent des alternatives aux méthodes de traitements par les fongicides.

Par l'ensemencement d'un micro-organisme non producteur de mycotoxines, la présente invention a pour but d'inhiber le développement de la flore fongique et en particulier des espèces Fusarium contaminant les épis et les grains, ainsi que la production de métabolites secondaires des champignons, tels que les mycotoxines.

Des méthodes de traitements similaires sont décrites dans l'état de la technique (WO 91/01641, US 4,842,871, US 5,668,008) sous le nom de « contrôle biologique » et comprennent l'utilisation d'un micro-organisme non pathogène et non producteur de mycotoxines sur des produits de
l'agriculture pour limiter le développement de flores microbiennes indésirables.

En particulier, l'utilisation de micro-organismes non pathogènes sélectionnés a été proposée pour réduire le développement de la flore fongique en malterie. Par exemple, des bactéries lactiques sont utilisées pour réduire le développement de la flore fongique et plus précisément de Fusarium (WO 94/16053). L'utilisation de la souche Geotrichum candidum naturellement présente sur l'orge en cours de germination et sur le malt fini a aussi été proposée, d'une part, pour inhiber le développement de la flore toxicogène au cours du maltage et d'autre part, pour améliorer la qualité biochimique et physico-chimique du malt (WO 96/34085). Un avantage de la souche Geotrichum candidum sélectionnée est qu'elle ne produit pas de substances toxiques et tératogènes pour un vertébré, ni de substances présentant des activités génotoxiques.

L'application de Geotrichum candidum en malterie n'était pas a priori transposable au champ en raison principalement des différences d'environnement et de méthodes d'ensemencement. Dans le cas de la malterie, l'ensemencement se fait en milieu liquide et en présence de nutriments organiques apportés principalement par les grains d'orge et à une température comprise entre 15 et 20°C. Au champ, l'ensemencement se fait par pulvérisation et dans des conditions atmosphériques variables.

La présente invention résulte en particulier d'études sur la contamination des épis par Fusarium en fonction d'essais de pulvérisation en champ de culture de Geotrichum candidum. De manière intéressante, ces études ont montré un effet inhibiteur de Geotrichum candidum sur la contamination par des champignons tels que Fusarium sp. Elles montrent aussi une diminution de la présence des mycotoxines et une augmentation des rendements des cultures en plein champ.
Plus précisément, l'invention fournit un procédé de prévention ou de traitements des contaminations de céréales par des champignons ou des moisissures producteurs de mycotoxines comprenant la pulvérisation en champs d'une suspension aqueuse de spores d'un micro-organisme de la famille de \textit{Geotrichum candidum} possédant les caractéristiques suivantes :

- une absence d'activité mutagène mesurée par le test d'Ames,
- une absence de production de mycotoxines,

Des champignons ou des moisissures producteurs de mycotoxines sont notamment de l'espèce \textit{Fusarium}.

Dans une forme préférée de l'invention, une suspension aqueuse de spores d'une souche de \textit{Geotrichum candidum} issue de levures utilisées en matérie est pulvérisée. De manière encore préférée, ces spores sont issues de l'une des souches déposées le 6 septembre 1994 sous les n° l.1474 et l.1975.

Selon l'invention, les spores de \textit{Geotrichum candidum} sont produites par le système SKW biosystems (BP20 77260 LA FERTE-SOUS-JOUARRE). Les spores sont conditionnées en solution à une concentration approximatives de $5 \times 10^8$ unités formant une colonie par ml, (FCU) appelée solution mère. Avant la pulvérisation, la concentration de \textit{Geotrichum candidum} est diluée dans une solution aqueuse dans un rapport de 1 à 100.

Dans une autre forme de réalisation de l'invention, d'autres micro-organismes, tels que les bactéries lactiques, ayant un effet connu dans le contrôle biologique du développement de micro-organismes pathogènes, sont associés à \textit{Geotrichum candidum} dans la suspension aqueuse.

L'ensemencement des spores de \textit{Geotrichum candidum} s'effectue par pulvérisation en champ d'une suspension aqueuse de spores à l'aide
de pulvérisateurs classiquement utilisés pour les traitements herbicides, fongicides ou insecticides des cultures en champs.

De 100 à 150 litres à l'hectare de dilution de la solution mère de spores de la famille de *Geotrichum candidum* sont pulvérisées. Ces valeurs correspondent à une pulvérisation de $10^9$ à $10^{13}$ spores par hectare. La période d'ensemencement est choisie parmi les différents stades de la végétation (tallage, début montaison, 1 nœud, 2 nœuds, 3 nœuds, gonflement, sortie dernière feuille, dernière feuille étalée, éclatement de la graine, épiaison et floraison). L'ensemencement est réalisé en une seule fois ou en plusieurs fois, aux différents stades de la végétation. De manière préférée, l'ensemencement est réalisé en une seule fois, au stade épiaison-floraison du développement des céréales.

L'invention permet ainsi de traiter les céréales contaminées par des champignons. Les céréales traitées sont en particulier le blé, l'orge, le seigle, l'avoine, le maïs ou le triticale.

Dans une mise en œuvre particulièr de la procédé de l'invention, la pulvérisation d'une suspension de spores de la famille *Geotrichum candidum* est associée à un traitement fongicide. Les résultats fournis dans la partie expérimentale du présent texte montrent un optimum d'efficacité en terme de diminution de la production de mycotoxines et de rendement des cultures en champs lorsque la pulvérisation est réalisée en association avec un traitement fongicide. Le traitement fongicide comprend l'utilisation de tout type de produit fongicide seul ou en association selon des procédés connus permettant une diminution de la contamination par la flore fongique ou de la production de mycotoxines. Des exemples de produits fongicides sont l'azoxystobine, le bromuconazole, le tébuconazole, l'époxycunazole ou le kresoxyméthyle. Bien entendu, la liste des produits fongicides utilisables présenté ici n'est pas limitative.
Le traitement fongicide est de préférence appliqué au stade dernière feuille du développement de la céréale ou au stade floraison. Un exemple de traitement fongicide réalisé au stade dernière feuille comprend du kresoximméthyl et de l'époxiconazole. Un exemple de traitement fongicide réalisé au stade floraison comprend de l'azoxystobine et du bromuconazole. Le fongicide peut être appliqué séparément à la suspension aqueuse contenant les spores ou directement ajouté à la suspension aqueuse de spores de Geotrichum candidum.

Les résultats présentés dans les exemples ont permis de montrer l'efficacité de l'utilisation de Geotrichum candidum dans la prévention des contaminations des cultures par des champignons ou moisissures. Ces champignons ou moisissures sont à l'origine de nombreuses maladies telles que le piéton verse, l'oïdium, la rouille brune, la septoriose, l'helminthosporiose, la rynchosporose et la fusariose.

L'invention porte par conséquent sur l'utilisation d'un micro-organisme de la famille de Geotrichum candidum dans la fabrication d'une préparation apte à traiter ou à prévenir les maladies résultant de la contamination des cultures par des champignons ou moisissures, notamment le piéton verse, l'oïdium, la rouille brune, la septoriose, l'helminthosporiose, la rynchosporose et la fusariose.

La contamination par le développement de moisissures concerne l'ensemble des produits de l'agriculture et plus particulièrement les céréales, les fruits, les légumes et les vignes. Ces contaminations peuvent s'accompagner d'une production de mycotoxines. La pulvérisation d'une suspension aqueuse de Geotrichum candidum permet de diminuer de manière significative la quantité de mycotoxines présentes sur les produits de l'agriculture. Par conséquent, l'invention porte également sur l'utilisation d'un micro-organisme de Geotrichum candidum dans la fabrication d'une préparation apte à diminuer d'au moins 30 % et de préférence au moins
50 % la production de mycotoxines lors de la végétation des cultures de céréales, de fruits, de légumes et des vignes.

Plus précisément, les micro-organismes de la famille de *Geotrichum candidum* sont utilisés dans la préparation de suspensions aqueuses de spores permettant la pulvérisation de $10^9$ à $10^{13}$ spores à l'hectare. De manière préférée, l'utilisation d'un micro-organisme de la famille de *Geotrichum candidum* telle que décrite plus haut est associée à un ou plusieurs fongicides. De manière encore préférée, les fongicides associés sont choisis parmi l'azoxystobine, le bromuconazole, l'époxyconazole, le krezoxy méthyle ou une association de ceux-ci.

Le contrôle biologique peut aussi être réalisé par l'utilisation d'une association de différents micro-organismes. En effet, il peut être avantageux de réunir les effets inhibiteurs de plusieurs micro-organismes lorsqu'ils sont complémentaires, notamment un champignon et une bactérie. En particulier, l'invention porte sur l'utilisation de *Geotrichum candidum* en association avec d'autres micro-organismes, tels que les bactéries lactiques, pouvant jouer un rôle bénéfique dans le contrôle biologique des contaminations ou de la production de mycotoxines.

Les exemples de mise en œuvre du procédé de l'invention permettent de montrer la faisabilité et l'efficacité du traitement en comparaison à d'autres traitements fongicides, sans en limiter la portée du procédé de l'invention. Ils permettent en particulier de comparer l'efficacité du traitement en fonction du stade de son application et en fonction de son association avec un traitement fongicide.

**Exemple 1** : Comparaison du pourcentage de contamination de *Fusarium* et *Geotrichum* présents sur les épis en fonction de la méthode de traitement choisie
Afin de quantifier l'effet de la pulvérisation d'une suspension de Geotrichum candidum, 1 litre de solution mère par hectare contenant $5 \times 10^{11}$ spores par litre (Levure de malterie IFBM, produit de SKW Biosystem) a été pulvérisé après dilution à différents stades de la végétation afin d'obtenir une implantation de Geotrichum candidum sur les épis. Les résultats en pourcentage de contamination de Fusarium et Geotrichum présents sur les épis sont présentés dans le tableau 1 en fonction du stade auquel les traitements sont réalisés (stade dernière feuille ou stade floraison) et du procédé utilisé (procédé par pulvérisation des spores uniquement « Geotrichum », ou en association avec un traitement fungicide). Le pourcentage de grains contaminés est évalué par dépôt des grains sur un milieu gélosé et incubation des boîtes permettant le développement des moisissures contaminantes. Le traitement fungicide utilisé est un traitement par pulvérisation de 0.5 litre d'azoxystobine à 250 g/l (« Amistar » de Zeneca-Sopra) et de 0.6 litre d'un mélange de bromeconazole à 167 g/l et de tébuconazole à 107 g/l (« Soleil » de Rhône-Poulen Agro).

**TABLEAU 1 :**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Stade de traitement</th>
<th>% de contamination</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>Fusarium</td>
</tr>
<tr>
<td>Dernière feuille</td>
<td>Floraison</td>
</tr>
<tr>
<td>Geotrichum</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Geotrichum</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Amistar 0,5 l + Soleil 0,6 l + Geotrichum</td>
<td>51</td>
</tr>
<tr>
<td>Geotrichum</td>
<td>Amistar 0.5 l + Soleil 0.6 l</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Il est nécessaire de rappeler que le mode d’ensemencement de *Geotrichum candidum* par pulvérisation, est différent de celui utilisé en malterie.

Les résultats montrent clairement la possibilité d’obtenir une implantation de *Geotrichum candidum* sur les épis par un mode d’ensemencement par pulvérisation. De plus, ils montrent que cette implantation s’accompagne d’une diminution de la contamination par *Fusarium*. Ils montrent aussi qu’un optimum d’efficacité est obtenu quand la pulvérisation se fait au stade floraïson. On constate enfin qu’un traitement *Geotrichum candidum* couplé avec un traitement fongicide (Amistar + soleil) au stade floraïson permet l’implantation de *Geotrichum candidum* avec une diminution plus importante de la contamination par *Fusarium*.

Ces résultats démontrent ainsi l’efficacité de l’utilisation de souches de *Geotrichum candidum* dans le traitement ou la prévention des maladies développées par la contamination des cultures par des champignons ou moisissures par pulvérisation d’une suspension aqueuse de spores.

**Exemple 2 :** Comparaison de la quantité de mycotoxines produites et des rendements des cultures en fonction de la méthode de traitement choisie

Les résultats présentés dans les tableaux 2 et 3 ont pour but de montrer l’effet du traitement de *Geotrichum candidum* sur la réduction de la production de mycotoxines lors de la végétation. Cette démonstration est effectuée au travers du dosage du déoxynivalénol, la mycotoxine produite par *Fusarium*, la plus rencontrée sur les céréales. Les expérimentations ont été réalisées sur des cultures de blé en parcelles d’essais de 100 m² (tableau 2) en association avec un traitement fongicide (Amistar et soleil) et en plein champ (plusieurs hectares) (tableau 3) en association avec un traitement fongicide par pulvérisation d’époxiconazole à 125 g/l et de kresoximméthyl à 125 g/l (traitement OGAM de BASF).
TABLEAU 2 :

<table>
<thead>
<tr>
<th>Stade de traitement</th>
<th>Mycotoxines</th>
<th>Rendement</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Traitement</td>
<td>Désoxyvalénol µg/kg</td>
<td>quintaux /ha</td>
</tr>
<tr>
<td>Dernière feuille</td>
<td>Floraison</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Amistar 0.5 l</td>
<td>2600</td>
<td>70.2</td>
</tr>
<tr>
<td>+ Soleil 0.6 l</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Geotrichum</td>
<td>Amistar 0.5 l</td>
<td>70.7</td>
</tr>
<tr>
<td>+ Soleil 0.6 l</td>
<td>2200</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>+ Geotrichum</td>
<td>Amistar 0.5 l</td>
<td>72.5</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>+ Soleil 0.6 l</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

TABLEAU 3 :

<table>
<thead>
<tr>
<th>Stade de traitement</th>
<th>Mycotoxines</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Traitement</td>
<td>Désoxyvalénol ppb</td>
</tr>
<tr>
<td>Dernière feuille</td>
<td>Floraison</td>
</tr>
<tr>
<td>OGAM 0.5 l</td>
<td>400</td>
</tr>
<tr>
<td>OGAM 0.5 l</td>
<td>Geotrichum</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>190</td>
</tr>
</tbody>
</table>
On note que les différentes associations fongicides / *Geotrichum candidum* ont un effet sur la réduction de la production de mycotoxines avec un effet amplifié quand *Geotrichum candidum* est pulvérisé à la floraison. Il convient d'observer, en outre, que cette amélioration s'accompagne d'une augmentation sensible et significative des rendements (tableau 2). Ces résultats indiquent que l'utilisation de *Geotrichum candidum* éventuellement en combinaison avec un traitement fongicide permet :

(a) de diminuer le pourcentage d'épis contaminé par *Fusarium* ;

(b) de réduire la production de mycotoxines ;

(c) d'augmenter significativement les rendements obtenus.
REVENDICATIONS

1. Procédé de prévention ou de traitement des contaminations de céréales par des champignons ou des moisissures producteurs de mycotoxines comprenant la pulvérisation en champs d'une suspension aqueuse de spores d'un microorganisme de la famille de *Geotrichum candidum* possédant les caractéristiques suivantes :
   - une absence d'activité mutagène mesurée par le test d'Ames,
   - une absence de production de mycotoxines.

2. Procédé selon la revendication 1 dans lequel *Geotrichum candidum* est une levure de matérie.


4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 dans lequel les champignons producteurs de mycotoxines sont de l'espèce *Fusarium*.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4 dans lequel la pulvérisation est réalisée à raison de $10^9$ à $10^{13}$ spores par hectare.

6. Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel la pulvérisation est réalisée en une seule fois au stade épiaison-floraison du développement des céréales ou en plusieurs fois au cours de la végétation entre le tâillage et la floraison.

7. Procédé selon la revendication 1 dans lequel les céréales sont choisies parmi le blé, l'orge, le seigle, l'avoine, le maïs ou le triticale.
8. Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lequel *Geotrichum candidum* est associé à d'autres microorganismes, notamment des bactéries lactiques.

9. Procédé selon la revendication 1 dans lequel la pulvérisation est associée à un traitement fongicide.

10. Procédé selon la revendication 9 dans lequel le fongicide est choisi parmi l'azoxytobine, le bromuconazole, le tébuconazole, l'époxyconazole, le kresoxyméthyle ou une association de ceux-ci.

11. Procédé selon la revendication 10 dans lequel le fongicide est appliqué au stade dernière feuille du développement de la céréale.

12. Procédé selon la revendication 10 dans lequel le fongicide est appliqué au stade floraison.

13. Procédé selon la revendication 12 dans lequel la pulvérisation est réalisée au stade floraison.

14. Procédé selon la revendication 10 dans lequel le fongicide est ajouté à la suspension aqueuse de spores de *Geotrichum candidum*.

15. Utilisation d'un microorganisme de la famille de *Geotrichum candidum* dans la fabrication d'une préparation apte à traiter ou prévenir les maladies résultant de la contamination des cultures par des champignons ou moisissures, notamment le piéton verse, l'oïdium, la rouille brune, la septotriose, l'helminthosporiose, la rhynchosporose et la fusariose.

16. Utilisation d'un microorganisme de la famille de *Geotrichum candidum* dans la fabrication d'une préparation apte à diminuer d'au
moins 30% et de préférence au moins 50% la production de mycotoxines lors de la végétation de cultures de céréales, de fruits, de légumes, de vigne.

17. Utilisation selon l'une des revendications 15 ou 16 dans laquelle la préparation permet une pulvérisation de $10^9$ à $10^{13}$ spores par hectare.

18. Utilisation selon l'une des revendications 15 ou 16 dans laquelle *Geotrichum candidum* est associé à d'autres microorganismes, notamment des bactéries lactiques.

19. Utilisation selon l'une des revendications 15 ou 16 dans laquelle *Geotrichum candidum* est associé à un ou plusieurs fongicides.

20. Utilisation selon la revendication 19 dans laquelle le fongicide est choisi parmi l'azoxystobine, le bromuconazole, le tébuconazole, l'époxyconazole, le kresoxygenyle, ou une association de ceux-ci.
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A01N63/04 // (A01N63/04, 63:00, 43:653, 43:54, 37:50)

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 7 A01N

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

<table>
<thead>
<tr>
<th>Category</th>
<th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th>
<th>Relevant to claim No.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>X</td>
<td>DATABASE WPI&lt;br&gt;Section Ch, Week 198642&lt;br&gt;Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C04, AN 1986-275238&lt;br&gt;XP002166912&lt;br&gt;&amp; JP 61 200193 A (KATAKURA CHIKKARIN CO LTD), 4 September 1986 (1986-09-04) abstract&lt;br&gt;&amp; PATENT ABSTRACTS OF JAPAN&lt;br&gt;vol. 110, no. 30 (C-400), 29 January 1987 (1987-01-29)&lt;br&gt;JP&lt;br&gt;abstract</td>
<td>1, 2, 4-7, 15-17</td>
</tr>
</tbody>
</table>

X Further documents are listed in the continuation of box C.

X Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

**P** document published prior to the international filing date but after the priority date claimed.

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

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

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

**Z** document member of the same patent family.

Date of the actual completion of the international search: 28 November 2001

Date of mailing of the international search report: 06/12/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Fax. 31 851 800 90, 340-3016

Authorized officer: Lamers, W
<table>
<thead>
<tr>
<th>Category</th>
<th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th>
<th>Relevant to claim No.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Y</td>
<td>WO 96 34085 A (INST FRANCAIS DES BOISSONS DE ; BOIVIN PATRICK (FR); MALANDA M BAKA) 31 October 1996 (1996-10-31) cited in the application the whole document</td>
<td>1-7, 15-17</td>
</tr>
<tr>
<td>Y</td>
<td>GB 1 274 291 A (RICARD) 17 May 1972 (1972-05-17) page 1, line 10 - line 13 page 1, line 30</td>
<td>1-7, 15-17</td>
</tr>
<tr>
<td>X</td>
<td>US 5 668 008 A (SKARIA MANI ET AL) 16 September 1997 (1997-09-16) cited in the application column 1, line 53 - line 67 column 3, line 38 - line 40</td>
<td>1-7, 15-17</td>
</tr>
<tr>
<td>Patent document cited in search report</td>
<td>Publication date</td>
<td>Patent family member(s)</td>
</tr>
<tr>
<td>---------------------------------------</td>
<td>------------------</td>
<td>-------------------------</td>
</tr>
<tr>
<td>JP 61200193</td>
<td>04-09-1986</td>
<td>JP 2076419 C</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>JP 5051038 B</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>AT 207951 T</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>AU 5697296 A</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>CA 2218413 A1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>CZ 9703380 A3</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>WO 9634085 A1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>US 5955070 A</td>
</tr>
<tr>
<td>GB 1274291</td>
<td>17-05-1972</td>
<td>CA 963387 A1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>DE 1929314 A1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>DE 1965970 A1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>FR 2044750 A5</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>FR 2158065 A1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>GB 1274292 A</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>SE 373526 B</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>FI 56764 B</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>JP 55031122 B</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>NO 127740 B</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>US 4678669 A</td>
</tr>
<tr>
<td>US 5668008</td>
<td>16-09-1997</td>
<td>NONE</td>
</tr>
</tbody>
</table>
# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMande

CIB 7 A01N63/04 // (A01N63/04, 63:00, 43:653, 43:54, 37:50)

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

## B. DOMAINEs SUR LEsQUELS L'A RECHERCHE A PORTE

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

CIB 7 A01N

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

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

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

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

<table>
<thead>
<tr>
<th>Catégorie</th>
<th>Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents</th>
<th>no. des revendications vases</th>
</tr>
</thead>
</table>

**X** Voir la liste 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 ci-dessus:

  **°** 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

  **°** document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré tel qu'indiqué

  **°** document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsqu'il 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
<table>
<thead>
<tr>
<th>Catégorie</th>
<th>Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents</th>
<th>no. des revendications visées</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Y</td>
<td>WO 96 34085 A (INST FRANCAIS DES BOISSONS DE ;BOVIN PATRICK (FR); MALANDA M BAKA) 31 octobre 1996 (1996-10-31) cité dans la demande le document en entier</td>
<td>1-7, 15-17</td>
</tr>
<tr>
<td>Y</td>
<td>GB 1 274 291 A (RICARD) 17 mai 1972 (1972-05-17) page 1, ligne 10 - ligne 13 page 1, ligne 30</td>
<td>1-7, 15-17</td>
</tr>
<tr>
<td>Document brevet cité au rapport de recherche</td>
<td>Date de publication</td>
<td>Membre(s) de la famille de brevet(s)</td>
</tr>
<tr>
<td>------------------------------------------</td>
<td>-------------------</td>
<td>-----------------------------------</td>
</tr>
<tr>
<td>JP 61200193</td>
<td>04-09-1986</td>
<td>JP 2076419 A</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>JP 5051038 B</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>AT 207951 T</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>AU 5697296 A</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>CA 2218413 A1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>CZ 9703630 A1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>WO 9634085 A1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>US 55955070 A</td>
</tr>
<tr>
<td>GB 1274291</td>
<td>17-05-1972</td>
<td>CA 963387 A1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>DE 1929314 A1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>DE 1965970 A1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>FR 2044750 A5</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>FR 2158065 A1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>GB 1274292 A</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>SE 373526 B</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>FI 56764 B</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>JP 55031122 B</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>NO 127740 B</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>US 4678669 A</td>
</tr>
</tbody>
</table>

US 5668008 A 16-09-1997 AUCUN