

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
31 août 2017 (31.08.2017)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2017/144500 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 1/14 (2006.01) C12N 3/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2017/053994

(22) Date de dépôt international :
22 février 2017 (22.02.2017)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
2016/5120 22 février 2016 (22.02.2016) BE

(71) Déposant : ARTECHNO SA [BE/BE]; rue Herman Meganck 21, B-5032 Gembloux-Les-Isnes (BE).

(72) Inventeurs : ZAKI, Omran; c/o Artechno SA, rue Herman Meganck 21, B-5032 Gembloux-Les-Isnes (BE). SA-BRI, Ahmed; c/o Artechno SA, rue Herman Meganck 21, B-5032 Gembloux-Les-Isnes (BE). THONART, Philippe; c/o Artechno SA, rue Herman Meganck 21, B-5032 Gembloux-Les-Isnes (BE). WEEKERS, Frédéric; c/o Artechno SA, rue Herman Meganck 21, B-5032 Gembloux-Les-Isnes (BE). JACQUES, Philippe; c/o Artechno SA, rue

Herman Meganck 21, B-5032 Gembloux-Les-Isnes (BE). LABE, Caroline; c/o Artechno SA, rue Herman Meganck 21, B-5032 Gembloux-Les-Isnes (BE). BELANGER, Richard; c/o Artechno SA, rue Herman Meganck 21, B-50032 Gembloux-Les-Isnes (BE).

(74) Mandataire : PRONOVEM - OFFICE VAN MALDEREN; Ave. Josse Goffin 158, B-1082 Bruxelles (BE).

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

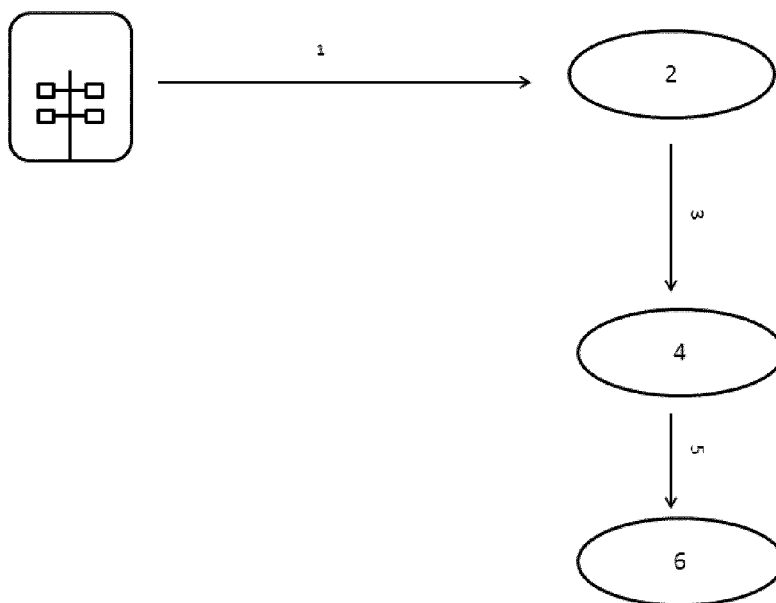
(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : RESISTANT AERIAL CONIDIA OF FILAMENTOUS FUNGUS STRAINS AND METHOD FOR OBTAINING SAME

(54) Titre : CONIDIES AÉRIENNES ET RÉSISTANTES DE SOUCHES DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX ET LEUR PROCÉDÉ D'OBTENTION

Fig.1



(57) Abstract : The present invention relates to a method for obtaining conidia or spores of filamentous fungus strains, to the thus obtained conidia or spores, and to their uses in agriculture and the agri-food industry.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à un procédé d'obtention de conidies ou spores de souches de champignons filamenteux, aux conidies ou spores obtenues et à leurs applications agronomiques et agro-alimentaires.

WO 2017/144500 A1



TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h)

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)

5

**Conidies aériennes et résistantes de souches de champignons
filamenteux et leur procédé d'obtention**

10 Objet de l'invention

[0001] La présente invention se rapporte au domaine de la lutte biologique ou à la bio-fertilisation, et a trait en particulier à des conidies ou des spores, aériennes et résistantes, de souches de champignons filamenteux, en
15 particulier des conidies ou des spores de *Pseudozyma*, de *Trichoderma* ou de *Penicillium* sous forme de poudre, ainsi qu'à leur procédé d'obtention et leurs applications, en tant qu'agent de lutte biologique ou dans l'agroalimentaire.

20 Arrière-plan technologique à la base de l'invention

[0002] La lutte biologique, encore appelée bio-contrôle, est une méthode connue pour la protection des végétaux contre par exemple des nuisibles, ravageurs de culture, comme les insectes, les acariens ou les nématodes,
25 la protection ou le traitement contre des maladies, en particulier les maladies fongiques, bactériennes ou virales, ou une méthode de lutte contre les mauvaises herbes, plantes adventices, par l'utilisation, soit d'organismes vivants antagonistes, soit de produits biodégradables constitutifs
30 de ces organismes, ou bien de métabolites produits par ces organismes, appelés agents de lutte biologique.

[0003] Comme cette lutte met en jeu des organismes vivants, comme des prédateurs tels les nématodes, arthropodes, vertébrés, ou mollusques, ou à des agents

pathogènes, tels des bactéries ou champignons, ou phytophages, ou à des constituants ou métabolites produits par ces organismes vivants, elle présente l'avantage de se faire sans recours à des pesticides chimiques.

5 [0004] En ce qui concerne la bio-fertilisation, les mêmes types d'organismes sont utilisés, non pas pour leur effet sur les ennemis d'une plante, mais pour leur effet bénéfique sur la croissance d'une plante ou de certaines des parties d'une plante (ex. racines), voire sur la santé
10 écologique de la plante (santé écologique = reproduction x survie).

[0005] En effet, avec toute la problématique provoquée par les pesticides chimiques sur l'environnement, il y a un intérêt croissant à exploiter des nouvelles
15 matières biologiques, ou des nouveaux organismes vivants, tels que par exemple des champignons filamenteux, ou leurs métabolites primaires ou secondaires, pour le contrôle des parasites, des mauvaises herbes et/ou des maladies.

[0006] De plus, il est à noter que, pour ce qui
20 concerne en particulier la lutte biologique fongique, cette dernière s'articule autour de multiples disciplines, telle que la pathologie de la souche utilisée, l'écologie, la physiologie, la production de masse, la formulation et les stratégies d'application. Cette précision s'applique aussi
25 à la bio-fertilisation.

[0007] Il existe un grand nombre de souches de champignons, en particulier des champignons filamenteux, qui ont un grand intérêt agroalimentaire et agronomique, en particulier comme agents de bio-contrôle, notamment comme
30 fongicides, mais qui ne sont pas encore pleinement exploitées en raison de la difficulté à les faire sporuler en culture liquide.

[0008] Par exemple, *Pseudozyma flocculosa* est une souche connue de champignon phyllosphère épiphyte, faisant

partie de la classe des Basidiomycètes et appartenant à l'ordre des Ustilaginales.

[0009] Sa classification définitive a été établie en 1995 par Boekhout sur la base d'analyses approfondies sur le plan génétique. Actuellement, ce champignon est classé dans le genre *Pseudozyma* apparenté aux Ustilaginales du phylum des Basidiomycètes (Boekhout 1995). La taxonomie complète de ce champignon est consignée dans le tableau 1.

10 Tableau 1. Description taxonomique de *Pseudozyma flocculosa* (Taxonomy ID: 84751).

Rangs taxonomiques	
Domaine	Eukaryota
Règne	Fungi
Embranchement ou phylum	Basidiomycota
Sous-embranchement	Ustilaginomycotina
Classe	Ustilaginomycetes
Ordre	Ustilaginales
Famille	Ustilaginaceae
Genre	<i>Pseudozyma</i>
Espèce	<i>Flocculosa</i>

[0010] Ce champignon est reconnu comme agent de lutte biologique très efficace contre le blanc induit par *Erysiphe poligoni*, de plusieurs plantes dont le rosier et le concombre.

[0011] Par ailleurs, le genre *Trichoderma* est également connu pour regrouper un ensemble de champignons qui se retrouvent couramment dans le sol, sur le bois mort, les débris végétaux et la partie aérienne des plantes.

[0012] De nombreuses espèces de *Trichoderma* se sont avérées efficaces comme agents biologiques contre par exemple *Pythium*, *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* et *Cryphonectria parasitica*. Ces

champignons pathogènes causent d'importants dégâts dans les cultures fruitières, légumières, en serre et ornementales.

[0013] Les performances de *Trichoderma atroviride* comme agent de lutte biologique est due en partie à la production d'endochitinase et il a également été montré que ce champignon intervient, selon divers mécanismes et à divers niveaux, dans la stimulation de la croissance racinaire par l'utilisation de minéraux fertilisants et la stimulation des défenses naturelles des plantes.

10 [0014] Par ailleurs, il est connu que les champignons des divisions de Zygomycètes, Ascomycètes et Basidiomycètes produisent des spores asexuées appelées conidies, leur permettant une propagation végétative rapide. Par contre, chez les Deutéromycètes, dits aussi champignons imparfaits, le cycle sexuel n'a jamais été observé et la reproduction se fait uniquement par voie asexuée, via la production de conidies.

[0015] Les conidies ou spores sont les principaux moyens de protection, et de conservation, des génomes fongiques, grâce à leur résistance aux traitements de conditionnement et aux conditions environnementales hostiles, telles que les températures extrêmes, les rayons ultraviolets et les faibles valeurs d'humidité relative. A titre d'exemple, une partie des conidies ou spores d'*Aspergillus niger* maintiennent leur capacité de germination après passage dans un autoclave pendant une heure à 120°C (Morozova et al 2001).

[0016] En outre, la production de ces spores asexuées, ou conidies, est essentielle dans le cycle de vie de nombreux champignons. Elle forme le principal moyen de dispersion pour le génome fongique dans des conditions environnementales défavorables.

[0017] De nombreux obstacles restent à surmonter afin de pouvoir commercialiser des agents de lutte biologique

fongique à base de champignons filamenteux, notamment du fait de leur faible aptitude à être stocké sur des longues périodes, en particulier à cause de la faible viabilité des conidies ou spores issues d'une fermentation liquide.

5 [0018] De nombreux champignons, y compris les filamenteux, peuvent être cultivés dans des milieux liquides, c'est-à-dire au cours d'une phase de fermentation dite liquide. Toutefois, la fermentation liquide est particulièrement problématique.

10 [0019] Dans cet environnement liquide, selon les espèces, les Hyphomycètes peuvent être amenés à se développer sous des formes diverses, y compris, les organismes hyphes unicellulaires à paroi mince, quelques formes dénommées blastospores, et les conidies ou spores submergées. Ces **15** dernières sont obtenues soit directement à partir de blastospores microcycles, par conidiation, ou soit à partir de cellules conidiogènes qui se forment sur les hyphes submergées.

[0020] En général, la méthode préférée pour la **20** production de conidies ou spores à grande échelle est la culture submergée en raison d'une part de sa bonne rentabilité, sa courte durée de production, et la disponibilité de tous les matériaux nécessaires pour une fermentation liquide.

25 [0021] Malgré tous ses avantages, les conidies ou spores produites par cette technique ont une trop courte durée de vie dans des conditions environnementales défavorables. C'est pourquoi, la plupart des agents de bio-contrôle, à base de conidies ou spores submergées, **30** nécessitent une utilisation immédiate sur les plantes et les terrains infestés par les ravageurs, qu'ils soient fongiques ou d'insectes.

[0022] Il est également possible de produire des conidies par fermentation sur un support ou un substrat

solide, selon une production dénommée phase ou fermentation solide.

[0023] Bien que la fermentation solide soit connue depuis longtemps, elle n'a jamais connu un véritable essor
5 industriel et a souvent été délaissée pour la culture en milieu liquide.

[0024] La fermentation solide présente plusieurs difficultés pour ce qui concerne de nombreuses espèces de champignons. *Paecilomyces fumosoroseus*, par exemple, a
10 besoin de lumière pour une production optimale de conidies aériennes (Wraight et al. 2001), et la production efficace de conidies de cette souche de champignon nécessite donc une culture en surface, ou une agitation périodique des supports ou substrats solides particulières, pour augmenter
15 l'exposition à la lumière. Les conidies ou spores de *Verticillium* se développent, quant à elles, en globules collantes produites à des densités relativement faibles sur une croissance d'hyphes, alors que celles d'*Aschersonia* doivent être produites en circonvolutions, ou sous forme de
20 fosses dans un stroma dense.

[0025] Par ailleurs, l'augmentation de la température et le changement de pH durant la phase de croissance végétative est un problème critique dans le domaine de fermentation solide (Smits et al. 1998).

[0026] L'intérêt pour la fermentation en milieu solide n'est pas nouveau, pourtant ce mode de culture n'a jamais été développé à cause des difficultés de contrôle des paramètres physico-chimiques de la culture. En effet, la production massive de conidies ou spores doit être initiée
25 à un stade de développement végétatif du mycélium, durant lequel il faut non seulement maintenir les conditions optimales de croissance (température, aération, humidité, pH), mais également contrôler la différenciation du mycélium et empêcher un phénomène de sporulation précoce qui peut
30

réduire fortement le rendement de production (Raimbault & Durand 1980).

[0027] De plus, le problème d'évacuation de la chaleur, produite lors de la fermentation solide, semble particulièrement difficile à résoudre. En effet, la chaleur dégagée par les réactions métaboliques, lors de la phase de croissance végétative, peut être délétère si la température dépasse les seuils limites permis. Il en est de même pour l'évolution du pH qui est quasiment impossible à réguler en l'absence de circulation de liquide (Pandey 2003).

[0028] A ces difficultés, liées à la fermentation s'ajoute un autre inconvénient, aussi important, lié au fait qu'en fin de culture on se trouve avec des conidies ou spores mélangées à de grandes quantités de mycélium et de résidus du support ou substrat solide, ce qui peut réduire la qualité du produit final obtenu et les possibilités d'application de celui-ci, notamment dans le domaine agroalimentaire.

Etat de la technique

[0029] La demande de brevet WO2009/037399 décrit un procédé de production de conidies ou spores, et de leurs métabolites, sur un support, ou substrat, solide par une fermentation classique, la phase de croissance se faisant également sur un tel support. Le milieu solide doit comporter un support ou substrat solide adéquat, c'est-à-dire un support ou substrat absorbant de faible densité et pratiquement non fermentable, mais imprégné d'un milieu de culture approprié à la croissance des conidies ou spores de champignons. Le procédé consiste en l'application d'un stress hydrique durant la phase de production des spores.

[0030] La demande de brevet EP2390345 décrit la production de métabolites et autres molécules d'intérêt par fermentation en milieu solide sur de multiples supports ou substrats solides, tels que de la biomasse végétale, en

particulier des produits agricoles comme des céréales, des sous-produits de l'industrie agroalimentaire forestière, papetière ou des boues d'épuration.

[0031] Le brevet US 4 837 155 décrit une méthode de production de la souche *Trichoderma* en phase liquide et en condition aérobie à des températures comprises entre environ 25°C et environ 30°C et à un pH compris entre environ 5,8 et environ 7,0, pour générer à partir d'un inoculant, une densité de conidies d'au moins 5×10^8 par ml, mais sans aucune phase de maturation sur support solide.

[0032] Le document EP0223809 décrit un procédé de production de conidies ou spores de champignons filamenteux dans un fermenteur à disques rotatifs en phase liquide.

[0033] Il est aussi connu d'obtenir un compostage accéléré grâce à une combinaison d'une fermentation liquide et solide générant une grande quantité de biomasse sur un support non inerte fermentable, qui sera dégradé par le développement des souches et qui peut devenir un compost comprenant des conidies de *Trichoderma sp.*

[0034] La publication de U. Hölker et (Applied Microbiology and Biotechnology, VO.64, N°2, pages 175-186 (2004)) décrit que la meilleure méthode de production de spores de champignons filamenteux est une fermentation sur support solide (solid state (substrate) fermentation (SSF)) et qu'il est possible de combiner une fermentation en phase liquide (submerged fermentation technology (SMF)) pour générer de la biomasse, avec une fermentation sur support solide (SSF) pour obtenir un grand nombre de spores.

[0035] La publication de Z.OMRAN et al (Séminaire international des biotechnologies (2015)) compare les conidies de *P. flocculosa* produites par fermentation en phase liquide (SMF) et sur support solide (SSF) et compare les différences morphologiques et anatomiques obtenues.

[0036] Ainsi, il apparait que les procédés connus de

l'état de technique effectuent toutes les étapes de production de souches de champignons, ou de métabolites issus de ces souches de champignons, soit par fermentation en phase liquide, soit par fermentation en phase solide sur un
5 substrat adéquat.

Buts de l'invention

[0037] La présente invention vise à obtenir des souches de champignons filamenteux présentant un intérêt
10 agronomique ou agroalimentaire, utilisables sous forme solide, en particulier sous forme d'une poudre, ainsi qu'un nouveau procédé d'obtention de ces souches, en particulier sous forme de poudre et qui ne présentent pas les inconvénients de l'état de la technique.

15 [0038] En particulier, la présente invention vise à fournir des souches de champignons filamenteux qui soient aisément manipulables, présentent une viabilité améliorée, en particulier après des longues durées de conservation, et éventuellement d'une haute pureté, c'est dire des souches
20 essentiellement dépourvues de contaminants et/ou de résidus du support de culture, afin de pouvoir les utiliser pour des applications agronomiques ou agroalimentaires, en particulier pour la préparation de fromages ou de charcuteries.

25 [0039] Un autre but de la présente invention est d'obtenir un procédé d'obtention desdits champignons filamenteux, de préférence sous forme de poudre de conidies ou spores ou de leurs métabolites primaires ou secondaires, en particulier un procédé qui soit rapide, de conception
30 simple, qui présente un rendement efficace et dont les paramètres physico-chimiques de chaque étape soient aisément contrôlables.

[0040] Un dernier but de l'invention vise à obtenir un

support ou substrat solide adéquat pour la maturation de conidies ou spores de champignons filamenteux.

Eléments caractéristiques de l'invention

- 5 [0041] La présente invention concerne un procédé d'obtention de conidies ou spores de souches de champignons filamenteux comprenant les étapes suivantes :
- croître (par fermentation) des champignons filamenteux durant une première phase de croissance mycélienne
 - 10 (fermentation) en phase liquide, pour générer une biomasse mycélienne,
 - mélanger ladite biomasse mycélienne obtenue avec un support solide inerte,
 - générer essentiellement sans fermentation des conidies
 - 15 ou spores durant une seconde phase de maturation, en particulier de différenciation cellulaire, de ladite biomasse mycélienne sur ledit support solide inerte,
 - éventuellement sécher les conidies ou les spores obtenues, et
 - 20 - éventuellement extraire une ou plusieurs molécules d'intérêt des conidies ou des spores obtenues.

- [0042] Dans le procédé de l'invention, on entend par « générer des conidies ou spores durant une phase de maturation, en particulier de différenciation cellulaire,
- 25 essentiellement sans fermentation » une génération sur un support solide inerte d'origine organique ou non organique, tel que le son d'une céréale, en particulier du son de blé, de préférence un tissu dans lequel les cellules du son de la céréale formant le support solide inerte sont dépourvues de
- 30 leurs fractions fermentescibles, en particulier d'amidon, aptes à permettre uniquement une maturation, en particulier de différenciation cellulaire, en absence de croissance cellulaire de la biomasse mycélienne en des conidies ou spores, sans provoquer de fermentation ou seulement une

fermentation de moins de 10%, de préférence moins de 5%, plus préférentiellement moins de 1% des cellules. De préférence, dans ce processus de maturation, en particulier dans ce processus de différenciation cellulaire, on observe
5 tel que présenté dans l'exemple 4 ci-dessous, essentiellement une absence de la multiplication cellulaire et une individualisation ou différenciation cellulaire à partir de la biomasse mycélienne, ainsi qu'une modification morphologique des cellules, en particulier de leur paroi
10 cellulaire et qui deviennent des conidies ou spores.

[0043] Dans le procédé de l'invention, la phase de maturation (essentiellement sans fermentation) génère une concentration en conidies ou spores comprise, de préférence entre 3×10^8 et 5×10^9 conidies/g pour *Pseudozyma flocculosa*,
15 et entre 1×10^9 et 5×10^{10} conidies/g, pour *Trichoderma atroviride* et entre 5×10^8 et 1×10^{10} conidies/g de conidies de *Trichoderma harzianum*.

[0044] Dans le procédé de l'invention, la durée d'obtention des conidies ou des spores est avantageusement
20 inférieure à trois semaines, de préférence inférieure à deux semaines, plus particulièrement inférieure à une semaine.

[0045] Selon l'invention, le champignon filamenteux est de préférence du genre *Pseudozyma* sp., en particulier *Pseudozyma flocculosa*, du genre *Trichoderma* sp., en
25 particulier *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma hamatum*, et *Trichoderma viride*, du genre *Penicilium* sp., en particulier *Penicilium camemberti* et *Penicilium nalgiovense*, du genre *Metarhizium* sp. ou du genre *Bauveria* sp.

[0046] Un autre aspect de l'invention concerne les
30 conidies ou les spores de souches de champignons filamenteux obtenues par le procédé de l'invention, résistantes à la dessiccation et se conservant à l'état sec durant une période supérieure à trois mois, de préférence comprise entre trois

mois et vingt-quatre mois, voire plus de vingt-quatre mois, à une température ambiante, c'est à dire une température comprise entre environ 15°C et environ 30°C, plus particulièrement une température comprise entre environ 20°C et environ 30°C.

5

[0047] L'invention concerne aussi les conidies ou des spores de souches de champignons filamenteux matures, du genre *Pseudozyma* sp., en particulier *Pseudozyma flocculosa*, dont la fraction cytoplasmique est chargée de réserve et enrichie en mélanine.

10

[0048] Un autre aspect de l'invention concerne une poudre de conidies ou spores de l'invention, en particulier une poudre de conidies ou de spores obtenue par le procédé de l'invention.

15

[0049] L'invention concerne aussi des compositions alimentaires, en particulier des charcuteries et des fromages comprenant les conidies, les spores ou la poudre de conidies ou de spores de l'invention.

20

[0050] Un dernier aspect de l'invention concerne l'utilisation des conidies, spores et de la poudre de conidies ou spores de l'invention, contre la prolifération de nuisibles, en particulier des champignons, des bactéries, des virus ou d'insectes, affectant des plantes ou des fruits, en particulier leur utilisation pour favoriser le rendement de production desdites plantes ou fruits, c'est à dire la croissance des plantes, en particulier la croissance des racines de plantes, la germination et le taux de croissance cellulaire desdites plantes. De préférence, cette plante ou ce fruit est choisi parmi le groupe constitué par le rosier, les cucurbitacées, en particulier le concombre, la courge ou le melon, la tomate, la fraise, la framboise, la groseille, la vigne, le raisin, la pomme, le pommier, la poire, le poirier, la prune, le prunier et la pomme de terre.

30

[0051] Un dernier aspect de la présente invention concerne l'utilisation des conidies, des spores ou la poudre de conidies ou de spores de l'invention pour la préparation de compositions alimentaires, en particulier des charcuteries et des fromages.

[0052] La présente invention sera décrite dans la description détaillée ci-dessous en référence aux figures annexées et présentées à titre d'illustrations non limitatives de l'invention.

10

Brève description des figures

[0053] La figure 1 représente schématiquement la procédure de production de poudre de conidies ou spores selon l'invention combinant avantageusement une première étape fermentation en phase liquide générant de la biomasse mycélienne suivie d'une seconde étape de maturation, dite phase de sporulation, en phase solide.

[0054] La figure 2 en A) est une observation au microscope binoculaire G:40x et qui représente la structure d'une particule de son de blé ayant subi un curetage enzymatique. Ces cellules sont vidées de leurs contenus et acquièrent une structure alvéolaire en nid d'abeilles fortement aérée ; en B) et C) sont des coupes histologiques d'environ 50 µm d'un tissu imprégné dans une résine époxy, après une fixation au glutaraldehyde et au tétroxyde d'osmium et une révélation au bleu de toluidine B) est la coupe transversale d'une particule de son avant traitement enzymatique. Les cellules sont chargées de réserves, et C) est la coupe transversale d'une particule du dérivé du son formant le support ou substrat solide inerte de l'invention et utilisé dans le procédé de l'invention. Les cellules sont vidées de leurs contenus suite aux traitements enzymatiques successifs, cette nouvelle structure du support

ou substrat solide inerte l'invention est propice à une grande capacité d'absorption de liquides.

[0055] La figure 3 représente une photographie en microscopie optique à contraste de phase des spores de bio-
5 fongicide produite en milieu liquide (A) et par l'invention (B).

[0056] La figure 4 représente des photos de la microscopie électronique à balayage mettant en évidence les différences morphologiques des deux types de conidies chez
10 *Pseudozyma flocculosa*. Les flèches, en A, montrent les conidies produites en culture liquide, avec leurs structures lisses sans ornements et leurs bords arrondis. Les figures B et C montrent les conidies obtenues par maturation sur support solide avec des structures concaves, liées à une
15 déshydratation poussée, et une ornementation verruqueuse propice à une dissémination par voie aérienne.

[0057] La figure 5 inclut des photos de la microscopie électronique à transmission mettant en évidence les différences au niveau des cytoplasmes des deux types de
20 conidies chez *Pseudozyma flocculosa*. A et A' : conidies issues de la culture liquide sont riches en mitochondrie (mi) et en ribosomes libres (ri). B et B' : celles obtenues avec la nouvelle procédure de culture ont des cytoplasmes chargés de réserves (res) dispersées tout le long de la
25 conidie sous forme d'inclusions diverses. Les ribosomes sont beaucoup moins présents et les mitochondries sont indétectables ce qui témoigne d'un métabolisme ralenti.

[0058] Les figures 6 A, B et C sont photos prises en microscopie à fluorescence, où on voit que les
30 conidies produites en milieu liquide (A) ne présentent pas d'auto-fluorescence. Les conidies ayant subi une maturation sur support solide (B et C) présentent une couche fluorescente à leurs surfaces. En microscopie électronique

à transmission, le composé fluorescent se manifeste, à la surface de la paroi (P), en précipitant l'agent de contraste le tétroxyde d'osmium (têtes de flèches en E). Ce composé est quasi inexistant chez les conidies issues de la culture
5 liquide (D).

[0059] La figure 7 représente la viabilité d'une bactérie Gram- dans différentes conditions de conservation après traitement selon le procédé décrit dans l'exemple 4.

10 Description détaillée de l'invention

[0060] De nombreuses souches de champignons ne sporulent que faiblement, de façon aléatoire et non stable dans le temps en culture liquide, ce qui représente un frein majeur à leur commercialisation et leurs applications.

15 [0061] Le procédé selon la présente invention combine, pour la première fois, une première étape dite de croissance (en fermentation) pour générer une biomasse mycélienne en milieu ou en phase liquide et une seconde étape dite de maturation, de préférence de différenciation (et
20 essentiellement sans fermentation) en milieu ou en phase solide sur un support ou substrat solide inerte adéquat, qui soit de préférence naturel, c'est-à-dire obtenu à partir de matière biologique renouvelable, ou qui soit de synthèse, en particulier des billes de gel de dextrane ou d'agarose ou un
25 dérivé plastique du pétrole, de préférence recyclable, tel que du polystyrène expansé sous forme de billes ou sous une forme alvéolaire adéquate.

[0062] En effet, ce support ou substrat solide doit présenter les caractéristiques suivantes :

- 30 - être inerte, non dégradabile et sans nutriments, c'est-à-dire non ou peu fermentable et donc non ou peu accessible au développement du mycélium et à la dégradation bactérienne ;
- présenter une structure alvéolaire, très aérée propice

- à des échanges gazeux optimaux et à l'évaporation de l'eau, c'est à dire un substrat ou support solide ayant des cellules ou alvéoles vides avec des diamètres compris entre environ 2 μm et environ 1000 μm , de préférence
- 5 entre environ 10 μm et environ 500 μm ;
- présenter une grande capacité d'absorption et de rétention de liquides, en particulier de l'eau ; c'est à dire avoir la capacité d'absorber entre environ 5 fois et environ 15 fois, de préférence entre environ 8 fois
- 10 et environ 10 fois, plus particulièrement environ 9 fois son propre poids en ces liquides.

[0063] De préférence, ce substrat ou support solide inerte d'origine végétale, comprend essentiellement des tissus, dont les cellules ont conservées leurs parois, mais

15 dont l'amidon et les fractions des cellules les plus accessibles à une fermentation par le champignon et au développement bactérien (cellulose et hémi-cellulose) ont été éliminés. Ce substrat ou support solide inerte peut se présenter sous forme de billes ou de fibres, et être produit

20 à partir de déchets végétaux, tels que de la paille, de la sciure de bois, de la pulpe de betterave, de grognons d'olives, de la pulpe de café, de la bagasse de canne à sucre et leur mélanges.

[0064] Avantagement, ce substrat ou support solide

25 inerte est un dérivé de céréales, de préférence un dérivé du blé, ou de riz, plus particulièrement de son de blé ou de riz, qui se trouve dépourvu de toute trace d'amidon et d'une grande partie de sa fraction fibreuse cellulosique et hémi-cellulosique, en particulier suite à un traitement

30 enzymatique séquentiel de ce son de blé qui présentera les caractéristiques susmentionnées et dont des coupes histologiques sont représentées dans les figures 2A à 2C. Ce substrat ou support solide inerte de l'invention, en particulier ce dérivé du son de blé, est utilisé comme

support ou substrat solide inerte pour une seconde étape dite de maturation, en l'absence de nutriments, de plusieurs espèces des champignons filamenteux, en particulier des conidies ou spores de *Pseudozyma flocculosa*, de *Trichoderma*

5 *Atroviride*, *Trichoderma Hazianum*, *Penicillium camemberti* et *Penicillium nalgiovense*, *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae*, ou d'autres espèces de champignons filamenteux.

[0065] L'utilisation du substrat ou support solide inerte (essentiellement non fermentable) selon l'invention

10 présente l'avantage d'apporter des solutions aux problèmes majeurs que connaît la fermentation en milieu solide. L'inoculation massive d'un tel dérivé de céréales, en particulier d'un tel dérivé de son de blé, et la faible teneur en eau du mélange, mais surtout le fait que ce produit

15 de préférence naturel et dérivé de céréales, en particulier ce dérivé du son de blé, soit aussi dépourvu de nutriments, y compris de toute partie fermentescible présente dans les cellules du tissu végétal comme de l'amidon, permet de réduire considérablement les contaminations microbiennes, en

20 particulier bactérienne, en phase solide.

[0066] Selon l'invention, la combinaison de deux modes ou étapes de cultures successifs, à savoir une première phase ou fermentation liquide, suivie d'une seconde phase de maturation (sans fermentation) en phase solide sur un tel

25 substrat ou support solide inerte adéquat tel que sus-décrit, permet de contrôler avantageusement les paramètres de croissance et de les maintenir à leurs valeurs optimales, sans générer de risques liés aux croissances excessives obtenues dans les procédés de l'état de la technique et

30 présentant les inconvénients de générer des modifications importantes de la température et du pH.

[0067] En effet, tel que décrit dans la figure 1, la première phase de croissance végétative, dite phase liquide 1, d'une durée généralement comprise entre environ deux jours

et environ quatre jours, génératrice de chaleur et d'acides organiques, est réalisée en un fermenteur selon des conditions (température, pH, choix et quantité des nutriments ajoutés, stress induit ou non, ...) bien connues de l'homme de l'art et adaptables en fonction du type de champignon filamenteux produit. Le mycélium de la souche de ce champignon filamenteux génère massivement une biomasse mycélienne 2. Les paramètres physicochimiques suivis du fermenteur sont de préférence les suivants:

- 10 - Température : maintenue entre environ 20°C et environ 40°C.
- Vitesse d'agitation : comprise entre environ 70 rpm et environ 250 rpm, avec une PO₂ supérieur à 30%, de préférence supérieur à 50% et plus particulièrement supérieur à 80%.
- 15 - pH : maintenu entre environ 4 et environ 7.8 (pas de régulation de pH nécessaire dans cette production).
- Pas de stress induit durant la fermentation.
- Plusieurs milieux de culture connus de l'homme de l'art peuvent être utilisés comme:
- 20 - MA1 (extrait de malt 10 g).
- MA2 (Extrait de malt 20 g).
- MEA (Extrait de malt 20 g, Extrait de levure 2 g)
- YMPD (Extrait de malt 5 g, Extrait de levure 3 g, Dextrose 15 g, peptone de soja 6 g)
- 25

[0068] La biomasse mycélienne 2 obtenue est ensuite récoltée et mélangée, comme représenté par l'étape 3 de la figure 1, avec un substrat ou support solide inerte, de préférence constitué d'un dérivé de son de blé dépourvu d'amidon, pour subir une étape de maturation, de préférence de différenciation 4 en phase solide, d'une durée généralement comprise entre environ deux jours et environ neuf jours, mais variable en fonction du type de champignon

30

filamenteux utilisé, afin de générer ces conidies ou ces spores à partir de la biomasse mycélienne 2. Ces conidies ou spores peuvent ensuite avantageusement être soumis à une étape de séchage 5, généralement d'une durée comprise entre environ un jour et environ huit jours, et une étape de génération des conidies ou spores aériennes 6, avant un éventuel traitement final de séparation ou purification du produit final obtenu sous forme d'une poudre de conidies ou de spores. Comme le substrat ou le support solide inerte selon l'invention est avantageusement non fermentescible, la phase de maturation 4 ne nécessite pas de régulation de pH et le peu de chaleur produite en phase solide peut être facilement contrôlée, via une ventilation. En outre, ce procédé est particulièrement efficace et génère de manière avantageuse une grande quantité de ces conidies ou ces spores dans des délais courts, de préférence de moins de trois semaines, de moins de deux semaines, de moins d'une semaine, voire de quelques jours. De manière optionnelle, le procédé de l'invention peut aussi comporter une étape d'extraction et de purification de métabolites primaires ou secondaires ou de toute molécule d'intérêt produits par ces conidies ou spores, en particulier des enzymes, telles que des amylases, des phosphatases, des protéases, des vitamines, des alcaloïdes, des acides organiques, des arômes, des pigments, des lactones, de la mélanine ou des antibiotiques.

[0069] Par conséquent, la présente invention apporte une solution aux problèmes de la culture sur substrat ou support solide, y compris à l'inconvénient éventuel de l'hétérogénéité du produit final obtenu sous forme de poudre. En effet, il est possible qu'en fin d'étape de séchage 5, on se retrouve avec des conidies aériennes mélangées à de grandes quantités de mycélium et de résidus de support solide, par exemple le son de blé dépourvu d'amidon, qui sont éliminés, voire recyclés pour une nouvelle étape de

maturation, de préférence de différenciation, par une étape de séparation ou de purification supplémentaire.

[0070] Un autre aspect de l'invention concerne les conidies ou spores obtenues par le procédé de l'invention, en particulier des conidies ou spores de *Pseudozyma flocculosa*, dont la fraction cytoplasmique est complètement transformée et se charge de vésicules de réserve, et dont les mitochondries et ribosomes sont non détectables ce qui n'a jamais été observé auparavant en mode de culture liquide des mêmes souches de champignons filamenteux qui sont généralement enrichies en mitochondries et en ribosomes libres marqueurs d'une activité métabolique et synthèse protéique intense, non propice à une conservation.

[0071] L'analyse par microscopie à fluorescence révèle également qu'en employant le procédé de l'invention, les conidies ou spores obtenues produisent une substance fluorescente, il s'agit d'une accumulation à la surface de la conidie ou spore de mélanine, ce qui serait un mode de protection contre les rayons ultraviolets. Cette caractéristique n'a jamais été observée auparavant chez les conidies ou spores produites en mode de culture liquide. Au contraire, les conidies ou spores issues du milieu submergé présentent un amincissement de leur paroi.

[0072] Par ailleurs, une autre caractéristique structurale est l'aspect essentiellement concave de la forme extérieure de la conidie ou de la spore obtenue, qui est spécifique à son haut degré de maturation, de préférence de différenciation, en lien avec le mode de dissémination des conidies ou spores par voie aérienne. Ces caractéristiques présentent des avantages en termes de récolte, de purification et de dispersion des conidies ou spores. En particulier, l'étape finale de séparation et de purification du produit final sous forme de poudre, présente l'avantage de réduire considérablement la présence de possibles

contaminants, tels que du mycélium ou des résidus du support ou substrat solide inerte utilisé.

Exemples

5

Exemple 1: Production de conidies de *Pseudozyma flocculosa*

[0073] Pour la production de conidies ou spores de *Pseudozyma flocculosa*, des mycéliums issus de la fermentation liquide sont mis à maturation avec le support ou substrat solide inerte de l'invention, qui est un dérivé du son de blé.

[0074] L'étape de maturation ou de conidiation, c'est-à-dire d'obtention de conidies, ou de sporulation, d'une durée de deux jours à sept jours est suivie d'une étape de séchage pour obtenir une concentration finale de conidies ou spores de *Pseudozyma flocculosa* après maturation d'environ de 3×10^8 à 5×10^9 conidies/g. Des tests de protection de plantes ou de lutte biologique contre des nuisibles de plantes, effectués avec ces conidies ou spores ont montré une efficacité similaire à celle obtenue avec des conidies ou spores obtenues par les procédés de l'état de la technique.

25 Exemple 2: Production de *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma atroviride*

[0075] L'étape de fermentation liquide de deux jours est suivie d'une étape de condition sur le dérivé du son pendant quatre à huit jours, pour obtenir une concentration finale, après maturation, d'environ 1×10^9 à 3×10^{10} conidies/g, de conidies de *Trichoderma atroviride* et de 5×10^8 à 1×10^{10} conidies/g de conidies de *Trichoderma harzianum*.

Exemple 3 : Etude comparative des spores produites en milieu liquide et sur support solide

[0076] Chez la plupart des champignons filamenteux, la production massive de conidies ou de spores commence d'abord par un stade de développement végétatif du mycélium. Lors de cette phase, il faut non seulement maintenir les conditions optimales de croissance (température, aération, humidité, pH), mais également contrôler la différenciation du mycélium et empêcher le phénomène de sporulation précoce qui réduit fortement les rendements.

[0077] Le problème d'évacuation des calories semble particulièrement difficile à résoudre. En effet, la chaleur dégagée par les réactions métaboliques lors de la phase de croissance végétative peut atteindre des niveaux tels que la température s'élève rapidement au-dessus des températures permissives. Il en est de même pour l'évolution du pH qui est quasi impossible à réguler en l'absence de circulation de liquide.

[0078] A ces difficultés liées à la fermentation s'ajoute un autre inconvénient, aussi important, lié au fait qu'en fin de culture, on se trouve avec des conidies mélangées à de grandes quantités de mycélium et de résidus du support. Ceci réduit fortement la qualité du produit et les possibilités de son utilisation.

[0079] Le procédé de l'invention combine une phase de croissance végétative, génératrice de chaleur et d'acides organiques en culture liquide, ce qui permet de contrôler tous les paramètres de croissance et de les maintenir à leurs valeurs optimales ; ensuite le mycélium produit massivement est ensuite mélangé au support solide adéquat pour subir une seconde phase de sporulation ou de maturation. Cette phase de maturation est uniquement une phase de différenciation cellulaire sans croissance qui ne nécessite que très peu

d'énergie qui provient essentiellement des réserves accumulées dans la phase de culture liquide. Par conséquent, cette phase de maturation sans aucune fermentation ne nécessite pas de régulation de pH et le peu de chaleur
5 produit peut être facilement contrôlé.

Anatomie et morphologie

[0080] Comme étude préliminaire, les inventeurs ont réalisé une analyse en microscopie optique à contraste de
10 phases et en microscopie électronique à balayage. Les figures suivantes (3 et 4) montrent des différences morphologiques et anatomiques observées.

[0081] Au niveau anatomique, on constate des différences majeures entre les deux types de spores. Les
15 spores issues de la culture liquide ont des cytoplasmes assez rugueux avec beaucoup d'organites et d'inclusions qui laissent penser à une forte activité métabolique. Ceci n'est pas le cas des spores obtenues par le procédé de l'invention dont les cytoplasmes sont dépourvus d'inclusions visibles et
20 témoignent d'une absence d'activité métabolique.

[0082] Au niveau morphologique on voit clairement une différence importante dans la taille. Les spores issues de la culture submergée sont beaucoup plus allongées avec une moyenne de taille aux environs de 10 μm et avec des bords
25 arrondis qui forment des hiles cicatrisés bombés. Les spores obtenues par le procédé de l'invention, par contre, sont plus petites d'environ 3 μm à environ 5 μm de long. Leurs bords se terminent avec un ou deux hiles apiculés qui ressemblent plus à une cicatrice conidienne.

30 [0083] La présence de ces hiles témoigne que la conidiogénèse s'est déroulée dans des conditions optimales et représente une bonne indication sur le mode de conidiation de ce champignon. Les conidies obtenues en culture liquide

ne présentent pas ces caractéristiques, ce qui témoigne d'une absence de maturation.

Cytologie

5 [0084] L'une des différences les plus spectaculaires, qui distingue les conidies obtenues par le procédé de l'invention, concerne les fractions cytoplasmiques. En effet, on observe dans les figures 4 à 6, que le cytoplasme des conidies issues de la culture liquide montre des signes
10 d'une forte activité métabolique liée à l'abondance d'organites cellulaires (mitochondrie et ribosomes), celui des conidies obtenues par une fermentation sur support solide, semble avoir une activité ralentie comme en témoigne l'absence d'organites et la richesse en réserves sous forme
15 d'inclusions dispersées dans toute la fraction cytoplasmique. L'abondance de ces réserves témoigne d'une excellente maturation et garantit une bonne longévité à la conservation et un bon taux de germination lorsque les conditions deviennent favorables.

20

Fluorescence

[0085] Cette analyse montre également Dans la figure 6, une différence majeure entre les cellules obtenues par le procédé de l'invention et selon le procédé de l'état de la
25 technique. Alors que les cellules issues de la culture submergée ne fluorescent que très faiblement, celles produites par le procédé de l'invention sont très fluorescentes. Cette auto-fluorescence se localise autour de la spore, vraisemblablement au niveau de membrane et/ou de
30 la paroi (têtes de flèches en E). Elle se concentre particulièrement au niveau de la cicatrice conidienne (flèches en E).

[0086] Ce phénomène d'auto-fluorescence est le plus souvent observé au niveau des matrices extracellulaires à

cause de la présence certaines molécules protectrices. Ici, il s'agit de la protéine mélanine qui est impliquée dans la résistance des conidies aux conditions de conservation.

5 Exemple 4 : Production d'Azospirillum Brasilense

[0087] Un autre aspect de l'invention concerne un procédé d'obtention de bactéries séchées, de préférence de bactéries GRAM négatif (gram-), en particulier du genre
10 Azospirillum, tel qu'Azospirillum brasilense, qui est une des bactéries les plus étudiées, car elle favorise la croissance des plantes, mais qui présente une grande fragilité liée à sa caractéristique structurale de bactérie gram -. En effet, une bactérie gram - contrairement aux
15 bactéries gram + ne comporte pas une épaisse paroi composée de peptidoglycanes et sa membrane phospholipidique externe ne résiste pas aux contraintes physiques de séchage.

[0088] La bactérie Aeospirillum brasilense, vivant dans le sol, a la capacité d'influencer la croissance de
20 nombreuses cultures agricoles par l'excrétion de différentes phytohormones (telles que l'acide indole acétique, dénommé également Auxine) et la capacité de fixer l'azote de l'air dans le sol. Cette bactérie peut être utilisée comme inoculant de croissance des plantes, éventuellement en
25 combinaison avec d'autres bactéries favorisant la croissance des plantes.

[0089] De manière avantageuse, le procédé d'obtention de différents microorganismes, tels que des bactéries, des moisissures ou des levures, voire des virus, en particulier
30 de bactéries gram -, de préférence des bactéries du genre Azospirillum, plus particulièrement des bactéries Azospirillum brasilense, selon l'invention comprend les étapes suivantes :

- croître les dits microorganismes pendant une phase de croissance en phase liquide, c'est-à-dire par fermentation, pour générer une biomasse de ces microorganismes,
- 5** - mélangez la dite biomasse des microorganismes obtenue avec un support solide inerte, en particulier le support décrit ci-dessus (pour la maturation des conidies ou spores de souches de champignons filamenteux),
- générer ces microorganismes séchés durant une seconde
- 10** phase de séchage, essentiellement sans fermentation de la dite biomasse sur ledit support solide inerte, ce support étant avantageusement apte à déshydrater partiellement cette biomasse, sans contrainte thermique et donc réduire ou stopper le métabolisme cellulaire
- 15** afin d'obtenir avantageusement une augmentation du taux de matière sèche de cette biomasse, de préférence d'environ 3% à plus de 35%, de préférence supérieur à 40%,
- éventuellement poursuivre cette déshydratation de
- 20** ladite biomasse des microorganismes à une température ambiante, de préférence sur un lit fluidisé ou fixe présent à la surface de plateaux aérés et avantageusement conservés dans une enceinte ou un local à taux d'humidité contrôlé, pour obtenir à nouveau un
- 25** taux de matière sèche de cette biomasse, de préférence à un taux supérieur à 85% de préférence d'environ 88%, après moins de 3 semaines, de préférence entre environ 15 jours et 20 jours et
- éventuellement extraire une ou plusieurs molécules
- 30** d'intérêt, en particulier des phytohormones, telle que de l'auxine (acide indole acétique) des microorganismes obtenus.

[0090] Dans le procédé de l'invention, le support solide inerte est de préférence le son d'une céréale, en particulier le son de blé, c'est-à-dire un tissu dans lequel les cellules du son de la céréale, formant le support solide inerte sont dépourvues de leurs fractions fermentescibles en particulier d'amidon. Cependant, ce support solide inerte peut également être un support polymérique tel que décrit ci-dessus.

[0091] Dans ce procédé d'obtention de la biomasse, la durée d'obtention des dits microorganismes séchés est avantageusement inférieure à 4 semaines ou inférieure 3 semaines, de préférence est une durée comprise entre environ 1 et 2 semaines, et permet la production de microorganismes particulièrement sensibles et fragiles.

[0092] L'invention concerne également les microorganismes, de préférence les bactéries, les moisissures ou les levures, en particulier les bactéries gram -, notamment du genre Azospirillum, de préférence Azospirillum brasilense, obtenus par le procédé de l'invention, résistantes à la dessiccation ainsi qu'à la conservation et aptes à être utilisées pour favoriser la croissance des cultures agricoles, de préférence par l'excrétion des phytohormones conservées, en particulier l'auxine, ainsi que pour leur capacité de fixation d'azote. Ces microorganismes, de préférence ces bactéries, levures ou moisissures, obtenus peuvent être sous forme d'une poudre desdits microorganismes, de préférence desdites bactéries, levures ou moisissures, obtenus par le procédé de l'invention et incluse à une composition phytosanitaire. Comme représenté à la figure 7, ces microorganismes en particulier ces bactéries peuvent être avantageusement conservées pendant des longues durées, même dans des conditions de conservation extrêmes.

Références

- Boekhout, T., 1995. *Pseudozyma Bandoni* emend. Boekhout, a
5 genus for yeast-like anamorphs of Ustilaginales. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 41(4), pp.359-366. Available at:
https://vpn.gw.ulg.ac.be/article/jgam1955/41/4/41_4_359/, DanaInfo=www.jstage.jst.go.jp, SSL+_article.
- 10 Morozova et al, 2001, Peculiarities of exogeneous dormancy of *Aspergillus niger* conidia. *Microbiology* 70(5), pp. 527-534.
- 15 Pandey, A., 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13 (2-3), pp. 81-84.
- Raimbault, M. & Durand, G., 1980. *Fermentation en milieu solide - Croissance de champignons filamenteux sur*
20 *substrat amylicé*, Available at:
http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_5/pt5/travaux_d/00626.pdf.
- 25 Smits, J.P. et al., 1998. The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(1), pp.50-57.
- 30 Wraight, S.P. et al, 2001. *Production, Stabilization and Formulation of Fungal Biocontrol Agents*,

REVENDICATIONS

1. Procédé d'obtention de conidies de souches de champignons filamenteux comprenant les étapes suivantes :
 - 5 - croître des champignons filamenteux durant une première phase de croissance mycélienne en phase liquide, pour générer une biomasse mycélienne,
 - mélanger ladite biomasse mycélienne obtenue avec un support solide inerte, et
 - 10 - générer essentiellement sans fermentation des conidies et/ou des spores durant une seconde phase de maturation de ladite biomasse mycélienne sur ledit support solide inerte.
 2. Le procédé selon la revendication 1, comprenant en outre une étape de séchage des conidies.
 - 15 3. Le procédé selon la revendication 1 ou 2, comprenant en outre une étape d'extraction d'une ou de plusieurs molécule(s) d'intérêt des conidies.
 4. Le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le support solide
 - 20 inerte est du son d'une céréale.
 5. Le procédé selon la revendication 4 dans lequel la céréale est du blé.
 6. Le procédé selon la revendication 4 ou la revendication 5, dans lequel les cellules du son de la
 - 25 céréale formant le support solide inerte, sont dépourvues de leur fraction fermentescible, en particulier d'amidon.
 7. Le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la phase de maturation génère une concentration en conidies comprise
 - 30 entre 3×10^8 conidies/g et 5×10^9 conidies/g pour *Pseudozyma flocculosa*, et entre 1×10^9 conidies/g et 5×10^{10} conidies/g, pour *Trichoderma atroviride* et entre 5×10^8 conidies/g et 1×10^{10} conidies/g de conidies de *Trichoderma harzianum*.

8. Le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dont la durée d'obtention des conidies est inférieure à 3 semaines, de préférence moins de deux semaines, plus particulièrement moins de 1 semaine.

5 9. Le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le champignon filamenteux est du genre *Pseudozyma sp.*, en particulier *Pseudozyma flocculosa*.

10 10. Le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 8, dans lequel le champignon filamenteux est du genre *Trichoderma sp.*, en particulier *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma hamatum* et *Trichoderma viride*

15 11. Le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 8, dans lequel le champignon filamenteux est du genre *Penicillium sp.*, en particulier *Penicilium camemberti* et *Penicilium nalgiovense*.

20 12. Le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 8, dans lequel le champignon filamenteux est choisi parmi le groupe constitué par *Metarhizium sp.* et *Bauveria sp.*

25 13. Conidies de souches de champignons filamenteux obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, résistantes à la dessiccation et se conservant à l'état sec à température ambiante, durant une période supérieure à un mois ou deux mois, de préférence durant une période comprise entre trois mois et vingt-quatre mois.

30 14. Conidies de souches de champignons filamenteux matures du genre *Pseudozyma sp.*, en particulier de *Pseudozyma flocculosa*, dont la fraction cytoplasmique est chargée de réserves, en particulier en mélanine et dont la cicatrice conidiennne est auto-fluorescente.

15. Conidies de souches de champignons filamenteux selon la revendication 14, présentant une taille comprise entre 3 microns et 15 microns, présentant de préférence un ou plusieurs hile(s) apiculé(s) et de
5 préférence obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

16. Poudre de conidies et/ou des spores selon l'une quelconque des revendications précédentes 13 à 15.

17. Composition alimentaire comprenant les
10 conidies ou la poudre de conidies selon l'une quelconque des revendications précédentes 13 à 16.

18. Composition alimentaire selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi le groupe constitué par les charcuteries et les
15 fromages.

19. Utilisation de conidies ou d'une poudre de conidies selon l'une quelconque des revendications précédentes 13 à 16, contre la prolifération de nuisibles de plantes ou de fruits.

20. Utilisation de conidies ou d'une poudre de conidies selon l'une quelconque des revendications précédentes 13 à 16, pour favoriser la croissance de plantes.

21. Utilisation selon la revendication 20, pour favoriser la croissance des plantes, en particulier la
25 germination et le taux de croissance cellulaire et racinaire de plantes.

22. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes 19 à 21, dans laquelle la plante ou le fruit est choisi parmi le groupe constitué par le
30 rosier, les cucurbitacées, en particulier, le concombre, la courge ou le melon, la tomate, la fraise, la framboise, la groseille, la vigne, le raisin, la pomme, le pommier, la poire, le poirier, la prune, le prunier et la pomme-de-terre.

23. Utilisation de conidies ou d'une poudre de conidies selon l'une quelconque des revendications précédentes 13 à 16 pour la préparation d'une composition alimentaire.

5 24. Utilisation selon la revendication 23, dans laquelle la composition alimentaire est choisie parmi le groupe constitué par les charcuteries et les fromages.

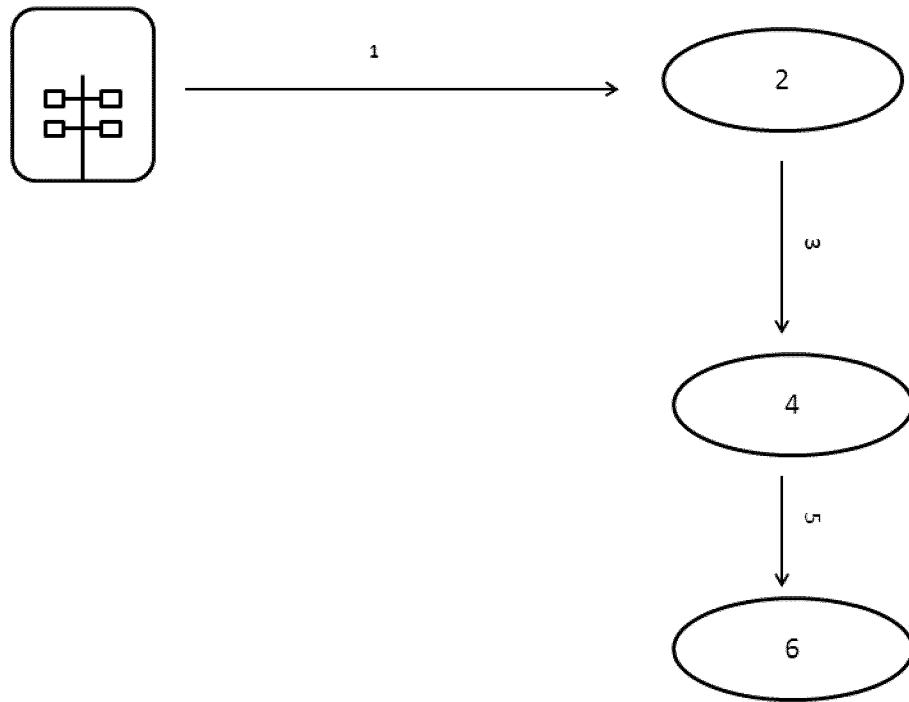
 25. Utilisation du son de céréales comme support solide inerte de maturation de conidies de souches
10 de champignons filamenteux.

 26. L'utilisation du son de céréales selon la revendication 25, dans laquelle des cellules du son de céréales, en particulier de son de blé, formant le support solide inerte, sont dépourvues de leur fraction
15 fermentescible, en particulier d'amidon.

 27. L'utilisation selon les revendications 25 ou 26, dans laquelle le champignon filamenteux est choisi parmi le groupe constitué par les souches de *Pseudozyma sp.*, de *Trichoderma sp.*, de *Penicilium sp.*, de *Metharizium sp.* et de *Beauveria sp.*
20

 28. L'utilisation selon l'une quelconque des revendications 25 à 27, dans laquelle le champignon filamenteux est choisi parmi le groupe constitué par les souches de *Pseudozyma flocculosa*, de *Trichoderma harzianum*,
25 de *Trichoderma atroviride*, de *Trichoderma conidia*, de *trichoderma*, de *Trichoderma hamatum*, de *Trichoderma viride*, de *Penicilium camemberti* et de *Penicilium nalgiovensie*.

Fig.1



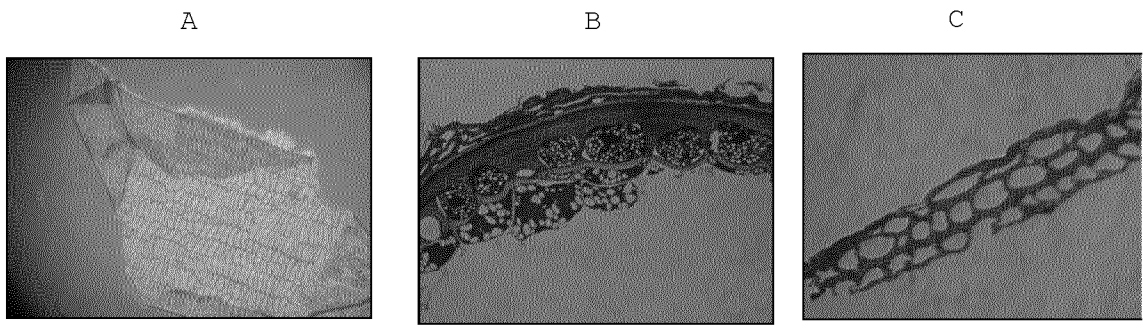


Fig. 2

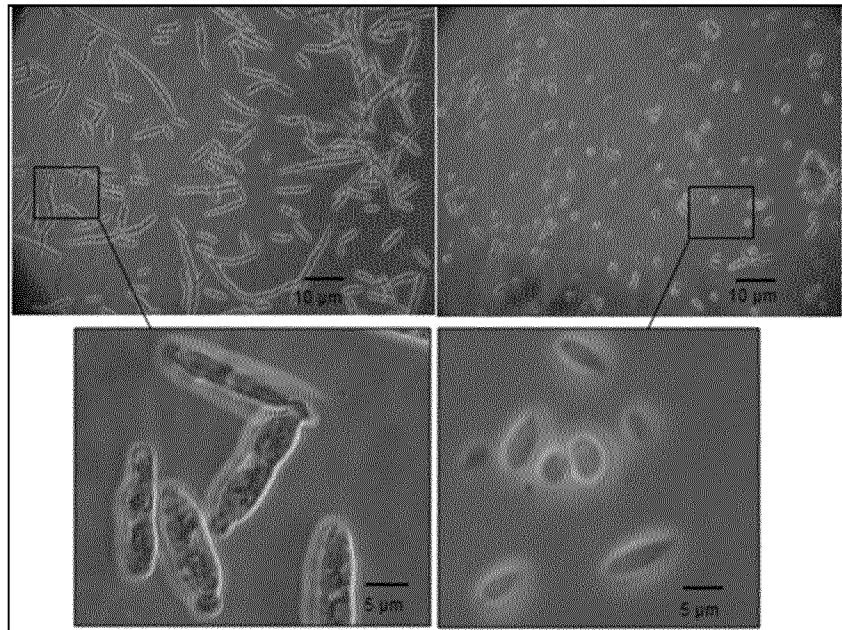


Fig. 3

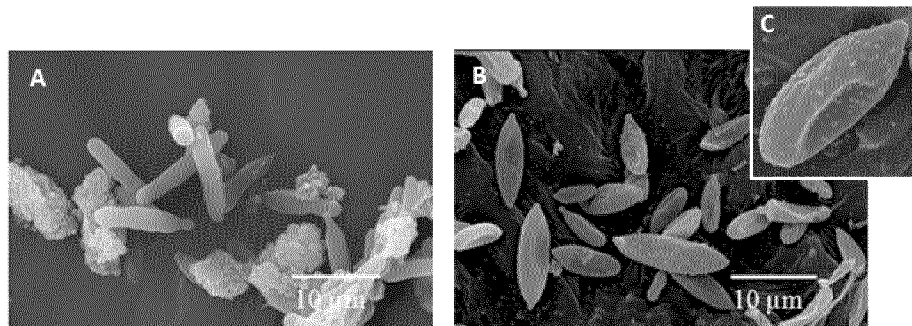


Fig. 4

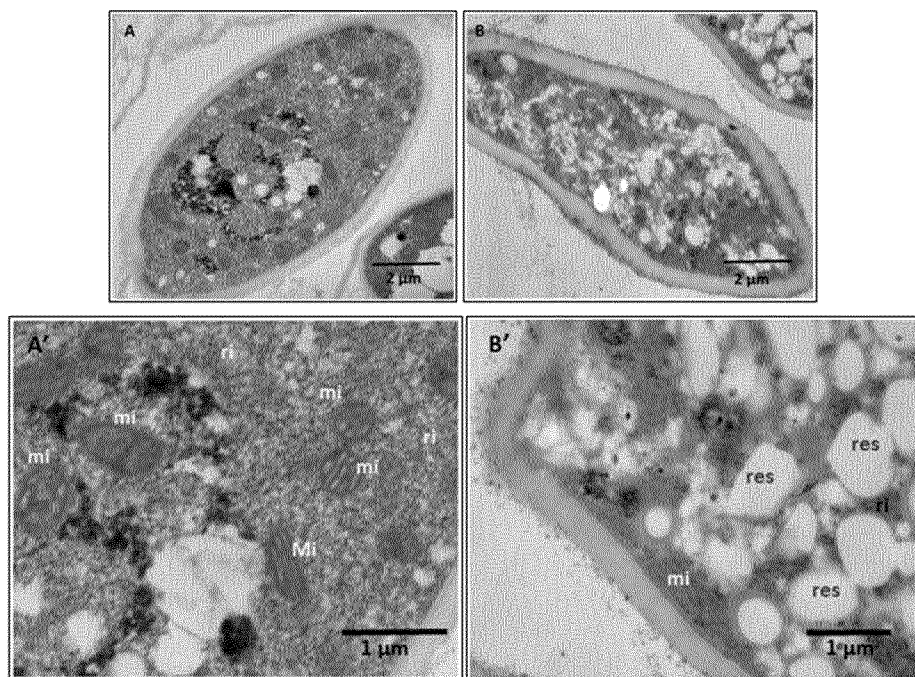


Fig. 5

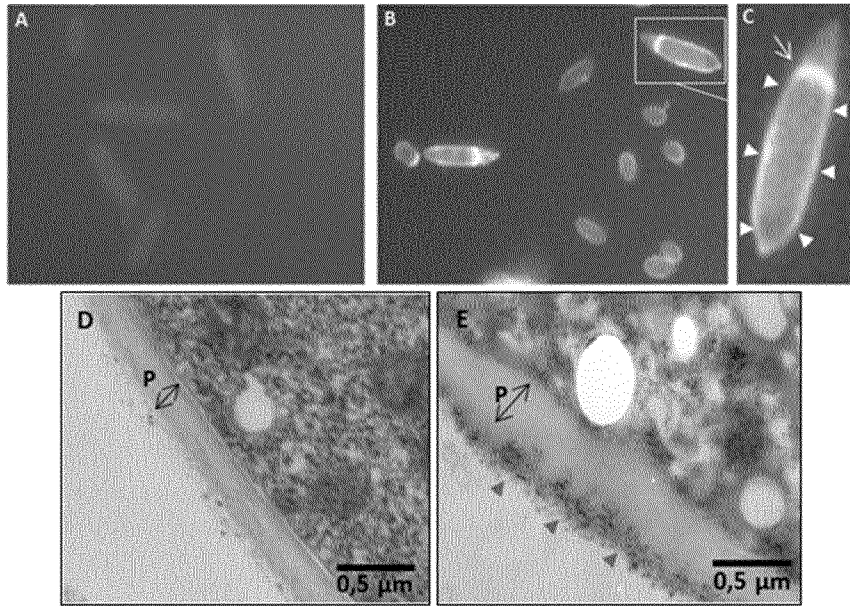


Fig. 6

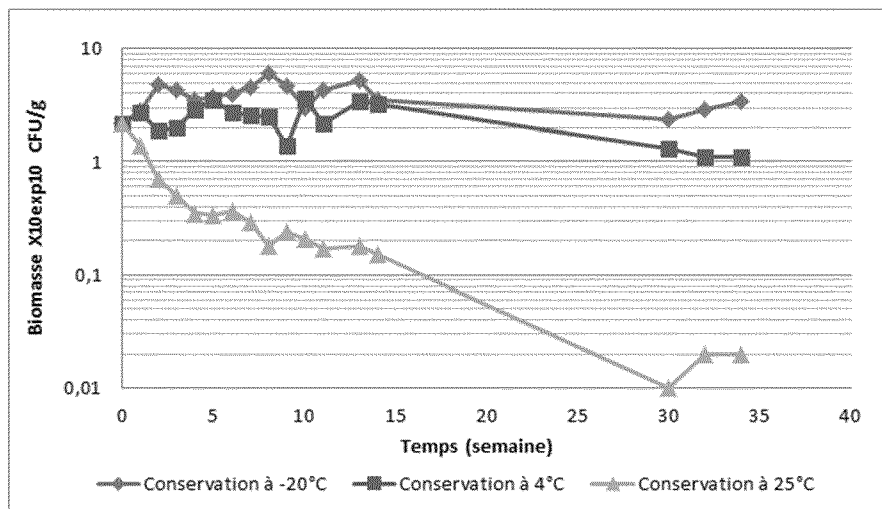


Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/053994

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N1/14 C12N3/00
ADD.
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)
C12N
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 practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	U. HÖLKER ET AL: "Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 64, no. 2, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 175-186, XP055314806, DE ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/s00253-003-1504-3 page 183 ----- -/--	1-13, 16-24

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family 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 application or patent 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 17 May 2017	Date of mailing of the international search report 24/07/2017
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Lejeune, Robert
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/053994

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>Z. Omran et al.: "Morphological difference of aerial and submerged conidia of the bio-fungicide fungus <i>Pseudozyma flocculosa</i>.", Séminaire International des Biotechnologies - Constantine (SIBC)19-21 Octobre 2015</p> <p>19 October 2015 (2015-10-19), page 38, XP002763648, Retrieved from the Internet: URL:http://www.umc.edu.dz/index.php/fr/component/k2/item/download/39_5049daa69fba1262589142338c1aeb6d [retrieved on 2016-10-28] the whole document</p>	14-16
A	<p>-----</p> <p>WO 2009/037399 A2 (INST LA RECH POUR LE DEV IRD [FR]; INST AGRONOMIQUE ET VETERINAIR [MA]) 26 March 2009 (2009-03-26) cited in the application the whole document</p>	1-24
A	<p>-----</p> <p>ROSANE S. CAVALCANTE ET AL: "Effect of Moisture on <i>Trichoderma</i> Conidia Production on Corn and Wheat Bran by Solid State Fermentation", FOOD AND BIOPROCESS TECHNOLOGY, vol. 1, no. 1, 21 November 2007 (2007-11-21), pages 100-104, XP055315004, New York, NY ISSN: 1935-5130, DOI: 10.1007/s11947-007-0034-x the whole document</p>	1-24
A	<p>-----</p> <p>CN 102 676 445 A (UNIV GANSU AGRICULTURAL) 19 September 2012 (2012-09-19) the whole document</p> <p>-----</p>	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2017/053994

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-24

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-24

Method for obtaining conidia of filamentous fungi, comprising a liquid-phase growth stage and a stage of generation of conidia and/or spores on an inert solid substrate, and spores of *Pseudozyma* in which the cytoplasmic fraction has accumulated reserves and is melanin-rich.

2. Claims 25-28

Use of cereal bran as an inert, solid substrate for the maturation of conidia of filamentous fungi.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/053994

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009037399	A2	26-03-2009	
		BR PI0814321 A2	21-10-2014
		EP 2173871 A2	14-04-2010
		FR 2919304 A1	30-01-2009
		MA 31544 B1	01-07-2010
		TN 2010000042 A1	26-09-2011
		WO 2009037399 A2	26-03-2009

CN 102676445	A	19-09-2012	NONE

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2017/053994

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N1/14 C12N3/00 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) 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 cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	U. HÖLKER ET AL: "Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 64, no. 2, 1 avril 2004 (2004-04-01), pages 175-186, XP055314806, DE ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/s00253-003-1504-3 page 183 ----- -/--	1-13, 16-24
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> 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 17 mai 2017		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 24/07/2017
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, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Lejeune, Robert

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>Z. Omran et al.: "Morphological difference of aerial and submerged conidia of the bio-fungicide fungus <i>Pseudozyma flocculosa</i>.", Séminaire International des Biotechnologies - Constantine (SIBC)19-21 Octobre 2015</p> <p>19 octobre 2015 (2015-10-19), page 38, XP002763648, Extrait de l'Internet: URL:http://www.umc.edu.dz/index.php/fr/component/k2/item/download/39_5049daa69fba1262589142338c1aeb6d [extrait le 2016-10-28] le document en entier</p>	14-16
A	<p>-----</p> <p>WO 2009/037399 A2 (INST LA RECH POUR LE DEV IRD [FR]; INST AGRONOMIQUE ET VETERINAIR [MA]) 26 mars 2009 (2009-03-26) cité dans la demande le document en entier</p>	1-24
A	<p>-----</p> <p>ROSANE S. CAVALCANTE ET AL: "Effect of Moisture on Trichoderma Conidia Production on Corn and Wheat Bran by Solid State Fermentation", FOOD AND BIOPROCESS TECHNOLOGY, vol. 1, no. 1, 21 novembre 2007 (2007-11-21), pages 100-104, XP055315004, New York, NY ISSN: 1935-5130, DOI: 10.1007/s11947-007-0034-x le document en entier</p>	1-24
A	<p>-----</p> <p>CN 102 676 445 A (UNIV GANSU AGRICULTURAL) 19 septembre 2012 (2012-09-19) le document en entier</p> <p>-----</p>	1-12

Cadre n° II Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Le rapport de recherche internationale n'a pas été établi en ce qui concerne certaines revendications conformément à l'article 17.2)a) pour les raisons suivantes :

1. Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration chargée de la recherche internationale n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir :

2. Les revendications n^{os} parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier :

3. Les revendications n^{os} parce qu'elles sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre n° III Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. Comme toutes les taxes additionnelles exigées ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. Comme toutes les revendications qui se prêtent à la recherche ont pu faire l'objet de cette recherche sans effort particulier justifiant des taxes additionnelles, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucunes taxes de cette nature.

3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}:

4. Aucune taxes additionnelles demandées n'ont été payées dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}:
1-24

- Remarque quant à la réserve**
- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant et, le cas échéant, du paiement de la taxe de réserve.
 - Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant mais la taxe de réserve n'a pas été payée dans le délai prescrit dans l'invitation.
 - Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-24

Procédé d'obtention de conidies de champignons filamenteux comprenant une phase de croissance en phase liquide et une phase de génération de conidies et/ou de spores sur support solide inerte et des spores de *Pseudozyma* dont la fraction cytoplasmique est chargée de réserves et riche en mélanine.

2. revendications: 25-28

Utilisation du son de céréales comme support solide inerte de maturation de conidies de champignons filamenteux.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2017/053994

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
WO 2009037399	A2	26-03-2009	BR PI0814321 A2	21-10-2014
			EP 2173871 A2	14-04-2010
			FR 2919304 A1	30-01-2009
			MA 31544 B1	01-07-2010
			TN 2010000042 A1	26-09-2011
			WO 2009037399 A2	26-03-2009

CN 102676445	A	19-09-2012	AUCUN	
