

19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

11) N° de publication : **2 906 819**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

21) N° d'enregistrement national : **06 08840**

51) Int Cl<sup>8</sup> : C 12 P 19/04 (2006.01), C 08 B 37/00, A 61 K 8/73,  
A 61 Q 19/00, C 12 R 1/41

12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22) Date de dépôt : 09.10.06.

30) Priorité :

43) Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 11.04.08 Bulletin 08/15.

56) Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

60) Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

71) Demandeur(s) : AGRO INDUSTRIE RECHERCHES  
ET DEVELOPPEMENTS ARD Société anonyme — FR,  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFI-  
QUE (C.N.R.S.) — FR et COMMISSARIAT A L'ENER-  
GIE ATOMIQUE — FR.

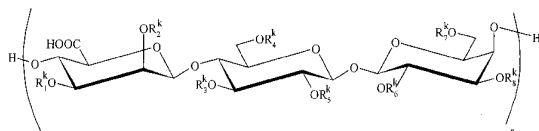
72) Inventeur(s) : HASSAN ASMA, ACHOUAK Wafa,  
BERGE ODILE, HEULIN THIERRY, HEYRAUD ALAIN,  
MILAS MICHEL, DELINE LUDOVIC, SANHAJI GHIS-  
LAIN et BRESIN ANTHONY.

73) Titulaire(s) :

74) Mandataire(s) : GROSSET-FOURNIER CHANTAL  
CATHERINE.

54) NOUVEAU POLYSACCHARIDE, SON PROCÉDE DE PREPARATION ET SES UTILISATIONS NOTAMMENT  
DANS LE DOMAINE COSMÉTIQUE.

57) La présente invention concerne l'utilisation de la sou-  
che bactérienne ALV104 de la famille des Rhizobiaceae,  
déposée à la CNCM le 21 mars 2006 sous le numéro I-  
3591, pour la préparation d'un composé polysaccharidique,  
répondant à la formule (I) suivante:



dans laquelle:  
- k varie de 1 à n,  
- n représente un nombre entier compris de 5 à 300, no-  
tamment de 8 à 270,  
- R<sup>k</sup><sub>1</sub>, R<sup>k</sup><sub>2</sub>, R<sup>k</sup><sub>3</sub>, R<sup>k</sup><sub>4</sub>, R<sup>k</sup><sub>5</sub>, R<sup>k</sup><sub>6</sub>, R<sup>k</sup><sub>7</sub> et R<sup>k</sup><sub>8</sub> représentent,  
indépendamment les uns des autres, H ou un groupe acyle  
comprenant de 1 à 6 atomes de carbone.

FR 2 906 819 - A1



## NOUVEAU POLYSACCHARIDE, SON PROCÉDÉ DE PRÉPARATION ET SES UTILISATIONS NOTAMMENT DANS LE DOMAINE COSMÉTIQUE

5 La présente invention a pour objet un nouveau polysaccharide, ainsi que son procédé de préparation à partir d'une souche bactérienne, et ses utilisations notamment dans le domaine cosmétique.

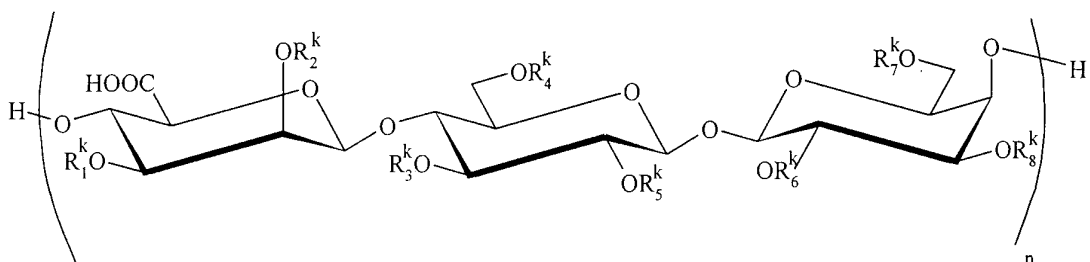
Le sol est une réserve inépuisable de micro-organismes possédant des propriétés innovantes toutes reliées à une fonction biologique. Au sein de la partie du sol appelé rhizosphère, il existe une population bactérienne spécifique présentant une aptitude à synthétiser des polysaccharides. Le rôle de ces polysaccharides au niveau du sol est de permettre une adhésion entre la bactérie et la plante ainsi que de structurer le sol au voisinage proche de cette dernière.

De nombreuses bactéries issues de la rhizosphère appartiennent au genre *Rhizobium*. Ces bactéries possèdent la capacité de former avec les végétaux des nodules symbiotiques.

La présente invention a pour objet de fournir une souche bactérienne produisant un composé polysaccharidique présentant des propriétés intéressantes pour des applications en cosmétique.

20 La présente invention a pour objet de fournir un polysaccharide présentant des propriétés intéressantes pour des applications en cosmétique.

La présente invention concerne l'utilisation de la souche bactérienne ALV104 de la famille des *Rhizobiaceae*, déposée à la CNCM le 21 mars 2006 sous le numéro I-3591, ou d'une souche dont le gène *rrs* présente un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 99,9%, de préférence égal à 100%, avec le gène *rrs* de ladite souche ALV104, pour la préparation d'un composé polysaccharidique, répondant à la formule (I) suivante :



dans laquelle :

– k varie de 1 à n,

- n représente un nombre entier compris de 5 à 300, notamment de 8 à 270,
- $R^k_1, R^k_2, R^k_3, R^k_4, R^k_5, R^k_6, R^k_7$  et  $R^k_8$  représentent, indépendamment les uns des autres, H ou un groupe acyle comprenant de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 atomes de carbone, notamment un groupe acétyle.

5 Le pourcentage d'identité entre deux gènes désigne le pourcentage de bases identiques entre ces deux gènes.

La bactérie ALV104 susmentionnée a été isolée pour ses propriétés particulières à synthétiser un polysaccharide au cours d'un criblage des microorganismes présents dans le sol d'une plante commune : *Arabidopsis thaliana*. Cette souche a été classée par le biais des outils de génétique moléculaire, comme appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* et elle a été déposée le 21 mars 2006 auprès de la CNCM selon le traité de Budapest sous le numéro d'enregistrement I-3591.

10 Le composé polysaccharidique de formule (I) susmentionnée est constitué d'une répétition de motifs comprenant 3 sucres dont 2 sucres neutres et 1 sucre acide, à savoir l'acide mannuronique, le glucose et le galactose.

15 La souche susmentionnée, déposée le 21 mars 2006 auprès de la CNCM selon le traité de Budapest sous le numéro d'enregistrement I-3591, a été identifiée après séquençage de son gène *rrs* qui code pour l'ARN ribosomal 16S.

20 L'étude phylogénétique du gène *rrs* codant pour la petite sous-unité du ribosome (ADNr 16S) montre que la souche ALV104 est une bactérie qui appartient au genre *Rhizobium*, de la famille *Rhizobiaceae*, dans l'ordre des *Rhizobiales* de la subdivision alpha des Protéobactéries.

25 Le groupe d'espèces décrites les plus proches phylogénétiquement de cette souche sont *Rhizobium sullae* (Squartini A, Struffi P, Döring H., Selenska-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velazquez E., Mateos PF, Martinez-Molina E, Dazzo FB, Casella S. and Nuti MP (2002). *Rhizobium sullae* sp. Nov. (formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1267-1276), *Rhizobium indigoferae* (Wei GH, Wang ET, Tan ZY, Zhu ME and Chen WX (2002). *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **52**, 2231-2239), *Rhizobium yanglingense* (Tan ZY, Kan FL, Peng GX, Wang ET, Reinhold-Hurek B and Chen WX (2001). *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *Int J Syst Evol Microbiol*, **51**, 909-914), *Rhizobium gallicum* (Amarger N, Macheret V and Laguerre G

(1997) *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules *Int J Syst Bact* , **47**, 996–1006), et *Rhizobium mongolense* (van Berkum, P, Beyene D, Bao G, Campbell TA and Eardly BD.1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour] *Int J Syst Bact*, **48**, 13–22). Toutefois la séquence du gène *rrs* de la souche ALV104 a un pourcentage d'identité maximal de 98,8% avec celle du gène *rrs* des souches-type de chacune de ces espèces, ce qui suggère qu'elle appartient à une autre espèce.

La séquence du gène *rrs* de la souche ALV104 est par ailleurs très proche de celles de trois autres souches, S109, USDA1920 et YAS34, présentes dans GenBank (N° d'accession respectivement AY509211, U89823 et AF23924). La souche S109, nommée par erreur *R. gallicum*, a un pourcentage d'identité de 99,7% avec ALV104 pour sa séquence *rrs*. Pour la souche *Rhizobium* sp. USDA 1920 ce pourcentage est de 99,6%. Van Berkum et coll. (1998) ont montré que la souche USDA1920 appartient à une nouvelle espèce génomique qu'ils n'ont pas formellement décrite. La souche YAS34 isolée de la rhizosphère du tournesol sur un sol français (Alami Y., Achouak W., Marol C. and Heulin T. (2000). Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflower by an EPS-producing *Rhizobium* sp. isolated from sunflower roots. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(8), 3393-3398), partage 99,5% de son gène *rrs* avec ALV104 et appartient à une espèce qu'il reste également à décrire.

L'arbre phylogénétique construit à partir des cent séquences de GenBank les plus proches de celle du gène *rrs* d'ALV104, permet de visualiser ces quatre souches qui forment un groupe monophylétique et qui représente probablement une seule et même espèce nouvelle.

La technique des empreintes génétiques a été utilisée pour montrer que la souche ALV104 est différente de la souche YAS34. Les empreintes sont obtenues par amplification de l'ADN total des souches en présence de séquences répétées de type "rep". Les amorces REP ont été utilisées avec les deux souches et les profils électrophorétiques de fragments d'ADN amplifiés sont nettement différents pour les deux souches : l'empreinte REP-PCR d'ALV104 comporte 9 bandes majeures de tailles comprises entre 500 et 4 000 paires de bases (pb) dont une bande très intense de taille approximative 2 500 pb alors que dans la même gamme, l'empreinte REP-PCR de la souche YAS34 comporte 6 bandes majeures dont une très intense de taille approximative 1 400 pb et aucune de taille 2 500 pb.

La souche déposée le 21 mars 2006 auprès de la CNCM selon le traité de Budapest sous le numéro d'enregistrement I-3591 est un bacille polymorphe, mobile, à coloration de Gram négative, aérobic stricte, catalase positive et oxydase négative.

Sa capacité à assimiler une grande diversité de substrats glucidiques autorise la production de polymère par cette souche à partir d'une grande variété de substrats glucidiques issus de la valorisation de coproduits d'origine agricole.

Cette souche présente les caractéristiques biochimiques décrites dans le tableau ci-dessous :

Test	Résultat
Gram	Gram négatif
<i>Etat Frais</i>	Bacille mobile polymorphe
<i>Oxydase</i>	Ox -
<i>Catalase</i>	Cat -
<i>Type respiratoire</i>	Aérobic stricte
<i>Gélose au sang</i>	Non hémolytique
<i>Equipement enzymatique</i>	Glucose +
	Mannose +
	Arabinose +
	Saccharose +
	Ribose +
	Xylose +
	Maltose +
	Lactose +
	Mannitol +
	Nitrate Réductase +
	$\alpha$ -glucosidase +
	$\beta$ -glucosidase +

L'appartenance de cette souche à la famille des *Rhizobiaceae* est déterminée par les résultats des tests ci-dessus, à savoir : Gram, état frais, oxydase, catalase, type respiratoire et gélose au sang.

La présente invention concerne également l'utilisation telle que définie ci-dessus, de la souche bactérienne ALV104 telle que définie ci-dessus, pour la préparation d'un composé polysaccharidique de formule (I) telle que définie ci-dessus, dans laquelle au moins 12,5% de la totalité des groupes  $R^k_1$ ,  $R^k_2$ ,  $R^k_3$ ,  $R^k_4$ ,  $R^k_5$ ,  $R^k_6$ ,  $R^k_7$  et  $R^k_8$  représente un groupe acétyle.

La présente invention concerne également l'utilisation telle que définie ci-dessus, de la souche bactérienne ALV104 telle que définie ci-dessus, pour la préparation d'un composé polysaccharidique de formule (I) telle que définie ci-dessus, dans laquelle d'environ 40% à environ 60%, notamment d'environ 43% à environ 56%, et de préférence d'environ 43,75% à environ 56,25% de la totalité des groupes  $R^k_1$ ,  $R^k_2$ ,  $R^k_3$ ,  $R^k_4$ ,  $R^k_5$ ,  $R^k_6$ ,  $R^k_7$  et  $R^k_8$  représente un groupe acétyle.

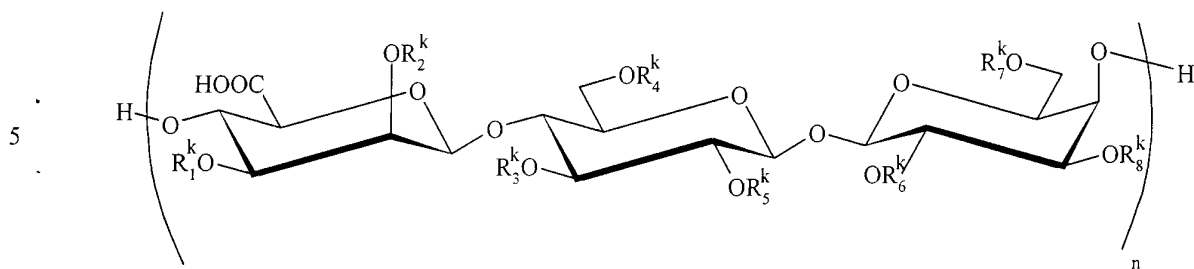
La présente invention concerne également l'utilisation telle que définie ci-dessus, de la souche bactérienne ALV104 telle que définie ci-dessus, pour la préparation d'un composé polysaccharidique de formule (I) telle que définie ci-dessus, dans laquelle au moins 12,5% de la totalité des groupes  $R^k_1$ ,  $R^k_2$ ,  $R^k_3$ ,  $R^k_4$ ,  $R^k_5$ ,  $R^k_6$ ,  $R^k_7$  et  $R^k_8$  représente un atome d'hydrogène.

La présente invention concerne également l'utilisation telle que définie ci-dessus, de la souche bactérienne ALV104 telle que définie ci-dessus, pour la préparation d'un composé polysaccharidique de formule (I) telle que définie ci-dessus, dans laquelle au moins 60% de la totalité des groupes  $R^k_1$ ,  $R^k_2$ ,  $R^k_3$ ,  $R^k_4$ ,  $R^k_5$ ,  $R^k_6$ ,  $R^k_7$  et  $R^k_8$  représente un atome d'hydrogène.

Un composé polysaccharidique de formule (I) telle que définie ci-dessus, dans laquelle au moins 60% de la totalité des groupes  $R^k_1$ ,  $R^k_2$ ,  $R^k_3$ ,  $R^k_4$ ,  $R^k_5$ ,  $R^k_6$ ,  $R^k_7$  et  $R^k_8$  représente un atome d'hydrogène, correspond à la forme désacétylée du composé polysaccharidique de l'invention.

La présente invention concerne également l'utilisation telle que définie ci-dessus, de la souche bactérienne ALV104 de la famille des *Rhizobiaceae*, déposée à la CNCM le 21 mars 2006 sous le numéro I-3591, ou d'une souche dont le gène *rrs* présente un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 99,9%, de préférence égal à 100%, avec le gène *rrs* de ladite souche ALV104, pour la préparation d'un composé de formule (I) telle que définie ci-dessus, dans un milieu de culture approprié, comprenant notamment une source d'azote, telle que de l'extrait de levure ou des protéines d'origine organique comme des peptones végétales de type peptones de blé, de luzerne, de pomme de terre, une source de carbone comme le glucose, maltose, mannose, arabinose, saccharose, ribose, xylose, lactose ou mannitol, et une source d'oligo-éléments contenant du fer, sulfate, magnésium, calcium, chlorure, zinc, bore, cuivre, cobalt ou manganèse.

La présente invention concerne également un composé polysaccharidique, répondant à la formule (I) suivante :



dans laquelle :

- k varie de 1 à n,
- 10 – n représente un nombre entier compris de 5 à 300, notamment de 8 à 270,
- $R^k_1$ ,  $R^k_2$ ,  $R^k_3$ ,  $R^k_4$ ,  $R^k_5$ ,  $R^k_6$ ,  $R^k_7$  et  $R^k_8$  représentent, indépendamment les uns des autres, H ou un groupe acyle comprenant de 1 à 6 atomes de carbone, notamment un groupe acétyle.

15 Selon un mode de réalisation avantageux, sur les 8 groupements hydroxyles de l'unité répétitive du polymère de l'invention, entre 3,5 et 4,5 groupements acétyles sont présents.

Le nombre de n de l'unité répétitive est compris entre 20 et 270, ce qui correspond à un poids moléculaire compris entre 250 000 et 3 000 000 g/mol lors de la synthèse du polymère par la souche dans le moût de fermentation.

20 La présente invention concerne également un composé tel que défini ci-dessus, dans lequel au moins 12,5% de la totalité des groupes  $R^k_1$ ,  $R^k_2$ ,  $R^k_3$ ,  $R^k_4$ ,  $R^k_5$ ,  $R^k_6$ ,  $R^k_7$  et  $R^k_8$  représente un groupe acétyle, et notamment dans lequel au moins 12,5% de la totalité des groupes  $R^k_1$ ,  $R^k_2$ ,  $R^k_3$ ,  $R^k_4$ ,  $R^k_5$ ,  $R^k_6$ ,  $R^k_7$  et  $R^k_8$ , pour une valeur de k donnée, représente un groupe acétyle.

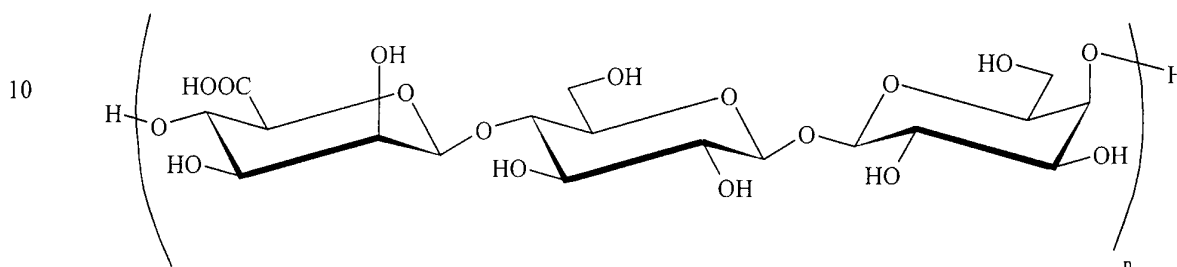
25 Un composé préféré selon la présente invention est un composé tel que défini ci-dessus, dans lequel au moins d'environ 43% à environ 56%, et de préférence d'environ 43,75% à environ 56,25% de la totalité des groupes  $R^k_1$ ,  $R^k_2$ ,  $R^k_3$ ,  $R^k_4$ ,  $R^k_5$ ,  $R^k_6$ ,  $R^k_7$  et  $R^k_8$  représente un groupe acétyle.

30 Selon un mode de réalisation particulier, les composés de l'invention tels que définis ci-dessus peuvent se présenter sous la forme d'une double hélice.

La présente invention concerne également un composé tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que au moins 12,5% de la totalité des groupes  $R^k_1$ ,  $R^k_2$ ,  $R^k_3$ ,  $R^k_4$ ,  $R^k_5$ ,  $R^k_6$ ,  $R^k_7$  et  $R^k_8$  représente un atome d'hydrogène.

Un composé préféré selon la présente invention est un composé tel que défini ci-dessus, dans lequel au moins 60% de la totalité des groupes  $R^k_1$ ,  $R^k_2$ ,  $R^k_3$ ,  $R^k_4$ ,  $R^k_5$ ,  $R^k_6$ ,  $R^k_7$  et  $R^k_8$  représente un atome d'hydrogène. Ce composé correspond à la forme désacétylée du composé de l'invention.

Selon un mode de réalisation préféré, la présente invention concerne également un composé de formule (I) telle que définie ci-dessus, dans laquelle tous les groupes  $R^k_1$ ,  $R^k_2$ ,  $R^k_3$ ,  $R^k_4$ ,  $R^k_5$ ,  $R^k_6$ ,  $R^k_7$  et  $R^k_8$  représentent un atome d'hydrogène. Un tel composé répond à la formule (I-1) suivante :



La présente invention concerne également une composition comprenant un composé tel que défini ci-dessus, en association avec une souche bactérienne telle que définie ci-dessus et/ou le milieu de culture ou une partie du milieu de culture de ladite souche, comprenant notamment une source d'azote, telle que de l'extrait de levure ou des protéines d'origine organique comme des peptones végétales de type peptones de blé, de luzerne, de pomme de terre, une source de carbone comme le glucose, maltose, mannose, arabinose, saccharose, ribose, xylose, lactose ou mannitol, et une source d'oligo-éléments contenant du fer, sulfate, magnésium, calcium, chlorure, zinc, bore, cuivre, cobalt ou manganèse.

20

Selon un mode de réalisation avantageux, la composition de l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend d'environ 0,1% à environ 8% en masse d'un composé de formule (I) telle que définie ci-dessus, et d'environ 0,05% à environ 2% en masse d'une souche bactérienne telle que définie ci-dessus.

25

La présente invention concerne également une composition comprenant un composé de formule (I) telle que définie ci-dessus, en association avec une souche bactérienne telle que définie ci-dessus, notamment la souche ALV104.

30

La présente invention concerne également une composition comprenant un composé de formule (I) telle que définie ci-dessus, en association avec un milieu de culture comprenant notamment une source d'azote, telle que de l'extrait de levure ou des protéines d'origine organique comme des peptones végétales de type peptones de

blé, de luzerne, de pomme de terre, une source de carbone comme le glucose, maltose, mannose, arabinose, saccharose, ribose, xylose, lactose ou mannitol, et une source d'oligo-éléments contenant du fer, sulfate, magnésium, calcium, chlorure, zinc, bore, cuivre, cobalt ou manganèse.

5 La présente invention concerne également une composition comprenant un composé de formule (I) telle que définie ci-dessus, en association avec une souche bactérienne telle que définie ci-dessus et le milieu de culture ou une partie du milieu de culture de ladite souche, comprenant notamment une source d'azote, telle que de l'extrait de levure ou des protéines d'origine organique comme des peptones végétales  
10 de type peptones de blé, de luzerne, de pomme de terre, une source de carbone comme le glucose, maltose, mannose, arabinose, saccharose, ribose, xylose, lactose ou mannitol, et une source d'oligo-éléments contenant du fer, sulfate, magnésium, calcium, chlorure, zinc, bore, cuivre, cobalt ou manganèse.

15 La présente invention concerne également une composition pharmaceutique, agro-alimentaire ou cosmétique, comprenant un composé de formule (I) telle que définie ci-dessus, en association avec un véhicule approprié.

La présente invention concerne également un procédé de préparation d'une composition telle que définie ci-dessus comprenant une étape de fermentation en présence d'une souche bactérienne ALV104 de la famille des *Rhizobiaceae*, déposée à  
20 la CNCM le 21 mars 2006 sous le numéro I-3591, ou d'une souche dont le gène *rrs* présente un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 99,9%, de préférence égal à 100%, avec le gène *rrs* de ladite souche ALV104, et d'un milieu de culture comprenant notamment une source d'azote, telle que de l'extrait de levure ou des protéines d'origine organique comme des peptones végétales de type peptones de blé, de luzerne, de  
25 pomme de terre, une source de carbone comme le glucose, maltose, mannose, arabinose, saccharose, ribose, xylose, lactose ou mannitol, et une source d'oligo-éléments contenant du fer, sulfate, magnésium, calcium, chlorure, zinc, bore, cuivre, cobalt ou manganèse.

30 La présente invention concerne également un procédé de préparation d'un composé de formule (I) telle que définie ci-dessus, comprenant les étapes suivantes :

– une étape de fermentation en présence d'une souche bactérienne ALV104 de la famille des *Rhizobiaceae*, déposée à la CNCM le 21 mars 2006 sous le numéro I-3591, ou d'une souche dont le gène *rrs* présente un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 99,9%, de préférence égal à 100%, avec le gène *rrs* de ladite souche ALV104, et d'un

milieu de culture comprenant notamment une source d'azote, telle que de l'extrait de levure ou des protéines d'origine organique comme des peptones végétales de type peptones de blé, de luzerne, de pomme de terre, une source de carbone comme le glucose, maltose, mannose, arabinose, saccharose, ribose, xylose, lactose ou mannitol, et une source d'oligo-éléments contenant du fer, sulfate, magnésium, calcium, chlorure, zinc, bore, cuivre, cobalt ou manganèse, afin d'obtenir une composition comprenant un composé de formule (I) telle que définie ci-dessus, en association avec une souche bactérienne telle que définie ci-dessus et le milieu de culture tel que défini ci-dessus, et

– une étape de filtration, notamment de filtration tangentielle, afin de se débarrasser de ladite souche bactérienne et dudit milieu de culture, et pour obtenir le composé polysaccharidique de l'invention de formule (I).

La présente invention concerne également un procédé de préparation tel que défini ci-dessus, comprenant, après l'étape de filtration, une étape de précipitation du composé polysaccharidique de formule (I), afin d'obtenir ledit composé sous forme de poudre.

La présente invention concerne également un procédé de préparation tel que défini ci-dessus, comprenant, après l'étape de précipitation du composé polysaccharidique, une étape consistant à mettre en solution le composé obtenu sous forme de poudre, afin de procéder à la désacétylation complète dudit composé, et d'obtenir un composé désacétylé tel que défini ci-dessus.

La présente invention concerne également un procédé de préparation tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'une étape de désacétylation complète du composé de formule (I) telle que définie ci-dessus est effectuée après l'étape de fermentation et avant l'étape de filtration, afin d'obtenir un composé désacétylé tel que défini ci-dessus.

La présente invention concerne également un procédé de préparation d'un composé désacétylé tel que défini ci-dessus, comprenant les étapes suivantes :

– une étape de fermentation en présence d'une souche bactérienne ALV104 de la famille des *Rhizobiaceae*, déposée à la CNCM le 21 mars 2006 sous le numéro I-3591, ou d'une souche dont le gène *rrs* présente un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 99,9%, de préférence égal à 100%, avec le gène *rrs* de ladite souche ALV104, et d'un milieu de culture comprenant notamment une source d'azote, telle que de l'extrait de levure ou des protéines d'origine organique comme des peptones végétales de type peptones de blé, de luzerne, de pomme de terre, une source de carbone comme le glucose, maltose, mannose, arabinose, saccharose, ribose, xylose, lactose ou mannitol,

et une source d'oligo-éléments contenant du fer, sulfate, magnésium, calcium, chlorure, zinc, bore, cuivre, cobalt ou manganèse, afin d'obtenir une composition comprenant un composé de formule (I) telle que définie ci-dessus, en association avec une souche bactérienne telle que définie ci-dessus et un milieu de culture tel que défini ci-dessus,

5           – une étape de désacétylation complète du composé de formule (I) telle que définie ci-dessus, pour obtenir une composition comprenant un composé désacétylé tel que défini ci-dessus, en association avec ladite souche bactérienne et ledit milieu de culture, et

10           – une étape de filtration, notamment de filtration tangentielle, afin de se débarrasser de ladite souche bactérienne et dudit milieu de culture, et pour obtenir le composé polysaccharidique désacétylé tel que défini ci-dessus.

La présente invention concerne également un procédé tel que défini ci-dessus comprenant une étape supplémentaire d'hydrolyse du polysaccharide de formule (I), cette étape permettant d'obtenir un polysaccharide hydrolysé de formule (I) dans laquelle n représente un nombre entier compris de 8 à 120.

15           Cette étape d'hydrolyse peut être effectuée indifféremment avant ou après l'étape de désacétylation susmentionnée.

La présente invention concerne également l'utilisation du composé polysaccharidique de formule (I) telle que définie ci-dessus, pour la préparation d'une composition cosmétique.

20           La présente invention concerne également l'utilisation du composé polysaccharidique de formule (I) telle que définie ci-dessus, en tant qu'agent de texture ou de toucher, ou en tant qu'agent stabilisateur d'émulsion.

L'expression "agent de texture ou de toucher" désigne une molécule ou un ensemble de molécules modifiant de façon significative les propriétés sensorielles de toucher d'une préparation cosmétique.

L'expression "agent stabilisateur d'émulsion" désigne une molécule ou un ensemble de molécules, permettant en présence d'une molécule tensioactive, de maintenir en une seule phase un mélange corps gras/eau naturellement instable.

30           La présente invention concerne également l'utilisation du composé polysaccharidique de formule (I) telle que définie ci-dessus, dans le domaine du diagnostic microbiologique, notamment en tant que support de croissance de micro-organismes.

La présente invention concerne également l'utilisation du composé polysaccharidique de formule (I) telle que définie ci-dessus, sous forme de gel, en substitution totale ou partielle des bases gélifiantes utilisées dans les milieux de culture, notamment pour remplacer le gel d'agarose ou d'Agar Agar.

5 La présente invention concerne également un procédé de préparation tel que défini ci-dessus, comprenant, après l'étape de fermentation de la souche bactérienne, une étape de pasteurisation de la composition telle que définie ci-dessus, comprenant un composé de formule (I) telle que définie ci-dessus, en association avec une souche bactérienne telle que définie ci-dessus et/ou le milieu de culture ou une partie du milieu  
10 de culture de ladite souche tel que défini ci-dessus, afin d'inactiver les bactéries constituant la souche bactérienne, cette étape de pasteurisation correspondant à une étape de maintien de ladite composition à une température d'environ 45°C à environ 90°C pendant d'environ 5 minutes à environ 60 minutes.

La présente invention concerne également une composition comprenant un  
15 composé de formule (I) telle que définie ci-dessus, en association avec une souche bactérienne telle que définie ci-dessus et/ou le milieu de culture ou une partie du milieu de culture de ladite souche tel que défini ci-dessus, comprenant notamment une source d'azote, telle que de l'extrait de levure ou des protéines d'origine organique comme des peptones végétales de type peptones de blé, de luzerne, de pomme de terre, une source  
20 de carbone comme le glucose, maltose, mannose, arabinose, saccharose, ribose, xylose, lactose ou mannitol, et une source d'oligo-éléments contenant du fer, sulfate, magnésium, calcium, chlorure, zinc, bore, cuivre, cobalt ou manganèse, caractérisée en ce que les bactéries constituant ladite souche bactérienne sont tuées.

25

30

### DESCRIPTION DES FIGURES

La Figure 1 représente l'évolution de la viscosité d'une solution de 1 g/L du polymère dans NaCl 0,1 M à 25°C en fonction de la vitesse de cisaillement et du temps de stockage. L'axe des ordonnées représente la viscosité en mPa.s et l'axe des abscisses la vitesse de cisaillement en  $s^{-1}$ . La courbe avec les carrés noirs (■) correspond au temps initial (pas de stockage) ; la courbe avec les losanges blancs (◇) correspond à un temps de stockage de 4 jours ; la courbe avec les croix noires (×) correspond à un temps de stockage de 6,5 jours ; la courbe avec les ronds noirs (●) correspond à un temps de stockage de 8,5 jours ; la courbe avec les triangles blancs (Δ) correspond à un temps de stockage de 11 jours ; la courbe avec les losanges noirs (◆) correspond à un temps de stockage de 39 jours ; la courbe avec les triangles noirs (▲) correspond à un temps de stockage de 46 jours ; la courbe avec les cercles (⊙) correspond à un temps de stockage de 46 jours ; la courbe avec les; la courbe avec les cercles blancs (○) correspond à un temps de stockage de 88 jours et la courbe avec les carrés blancs (□) correspond à un temps de stockage de 95 jours. L'absence de certains des symboles cités ci-dessus provient de la parfaite superposition des différents points.

La Figure 2 représente l'évolution de la viscosité d'une émulsion en fonction du pH. L'axe des abscisses représente le pH et l'axe des ordonnées représente la viscosité en mPa.s (Brookfield DVIII Ultra Aig E-Vit 12 Helipath 2 min, 20°C). La courbe en trait plein avec les losanges noirs (◆) correspond au produit Sepigel 305 ; la courbe en trait pointillé avec les carrés noirs correspond au produit Rheocare ATH (■) et la courbe en trait plein gris avec les triangles noirs correspond au produit de l'invention.

### DESCRIPTION DÉTAILLÉE DES PROCÉDÉS DE L'INVENTION

La production du polysaccharide de l'invention au niveau industriel suit deux étapes principales, une première étape de production de cellules en fioles de petite taille ; cette première culture appelée préculture sert à inoculer le fermenteur proprement dit où est réalisée la production du polymère au cours du temps (2<sup>ème</sup> étape).

La chaîne de préculture comprend la reviviscence de la souche conservée dans une cryobanque à -196°C (azote liquide) par versement du contenu d'un cryotube d'une contenance de 2 ml (noté N<sub>2</sub>) dans un erlenmeyer d'une capacité de 500 ml contenant un milieu de préculture dont la composition est décrite ci-après.

Le milieu de préculture pour la production de polymère suit la composition suivante :

3 g/l d'extrait de levure (Autolysat 106, Biospringer)	
70 ml/l de solution minérale*	
11 g/l de glucose	
Eau déminéralisée qsp 1000 ml	
* Solution Minérale	** Solution Eléments
0,44 g FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,43 g ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O
2 g MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,30 g MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O
2 g CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	2,80 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
20 ml Solution Eléments**	0,023 g CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O
	0,07 g CoSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O
qsp 1000 ml (eau déminéralisée)	qsp 1000 ml (eau déminéralisée)

Après une incubation à 30°C +/- 3°C sur une durée comprise entre 15 et 30 heures, 10 ml de cette culture sont transférés dans des erlenmeyers d'une capacité de 3 litres notés I pour Inoculum, S pour suivi et Se pour secours. Seul le récipient noté I sera utilisé pour inoculer les fermenteurs.

L'erlenmeyer noté S sert quant à lui de suivi et celui noté Se correspond au secours en cas de contamination de l'erlenmeyer noté I.

A chaque transfert un contrôle bactériologique est effectué par une observation microscopique en contraste de phase à un grossissement de 100 fois (Microscope Axioskop2 Carl Zeiss, Germany).

Les paramètres de préculture comme ceux de culture sont les suivants :

- pH : 6,8 +/- 0,3
- Température : 30°C +/- 3°C
- Durée 24 heures.

5

Lorsque la mesure de la densité optique à 600 nm de la préculture atteint 2,00 ou que la durée totale de la préculture est de 24 heures, le milieu est transféré stérilement dans un fermenteur de 450 litres dont le milieu de culture est le suivant :

Matières	Concentration
Extrait de levures	3,5 g/l
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,35 g/l
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	40 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4,5 mg/l
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	35 µg/l
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	35 µg/l
CoSO <sub>4</sub>	7 µg/l
CuSO <sub>4</sub>	7 µg/l
Anti-mousse (fourni par Struktol)	3,5 mg/l

10 Le taux d'inoculation du fermenteur est compris entre 1 et 10% et de préférence 5% volume de préculture/ volume du fermenteur.

Après stérilisation du milieu, le glucose (source de carbone) est ajouté afin d'atteindre une concentration de 25g/L au moment de l'inoculation du fermenteur.

15 Le rapport entre le carbone et l'azote présent dans le milieu de culture est un paramètre important du comportement de la souche face à une carence en éléments carbonés ou azotés. Pour vérifier l'influence de ce rapport sur la production d'EPS (exopolysaccharide - composé polysaccharidique de l'invention) et sur la production de biomasse, la densité optique à 600 nm et la viscosité finale du moût de fermentation sont analysées.

20

La densité optique à 600 nm rend compte du nombre de cellules bactériennes présentes dans le milieu de culture alors que la viscosité finale estime la quantité de polymère produite par la bactérie. Le tableau ci-dessous présente l'influence du rapport C/N sur la DO 600 nm et sur la viscosité :

Milieu testé	Rapport C/N	DO 600 nm finale	Viscosité à 26s <sup>-1</sup> (cPs) Viscosimètre Rhéomat 108 R/E
311	14,86	5,19	150
315	20,04	5,25	180
320	26,51	5,00	150
325	32,98	4,83	160
411	11,30	5,87	150
415	15,18	6,07	170
420	20,04	6,25	210
425	24,89	6,05	180
430	29,74	5,93	220

5

Les milieux testés susmentionnés ont les compositions suivantes :

Milieu	Extrait de levure	Solution minérale (voir ci-dessus)	Glucose
Milieu 311	3 g/l	70 ml	11 g/l
Milieu 315	3 g/l	70 ml	15 g/l
Milieu 320	3 g/l	70 ml	20 g/l
Milieu 325	3 g/l	70 ml	25 g/l
Milieu 411	4 g/l	70 ml	11 g/l
Milieu 415	4 g/l	70 ml	15 g/l
Milieu 420	4 g/l	70 ml	20 g/l
Milieu 425	4 g/l	70 ml	25 g/l
Milieu 430	4 g/l	70 ml	30 g/l

Afin de maximiser la viscosité du moût et donc la production du polymère, le rapport C/N pour la production du polymère doit être compris entre 10 et 50 et est de préférence égal à environ 30.

10

La qualité de l'azote présent dans le rapport C/N joue un rôle important sur la croissance de la bactérie et sur la production du polymère. Certains acides aminés sont indispensables à la croissance de la bactérie. En effet, si la souche bactérienne ne trouve pas de source d'acides aminés, elle ne pousse pas. Ainsi, les acides aminés nécessaires sont présents sous forme de peptides ou de protéines dans un extrait de levure ou dans

15

des peptones. Ainsi, le milieu de culture utilisé dans le procédé de l'invention contient notamment des peptones riches en acides aminés indispensables pour la souche bactérienne.

Une analyse des besoins qualitatifs de la souche fournit les résultats suivants :

Aminoacide manquant	Conclusion
DL-Ala	Non indispensable
L-Arg	Non indispensable
L-Asp	Non indispensable
L-Asn	Indispensable
L-Cys	Non indispensable
L-Glu	Non indispensable
L-Gln	Indispensable
L-Gly	Non indispensable
L-His	Indispensable
L-Ile	Indispensable
L-Leu	Non indispensable
L-Lys	Non indispensable
L-Met	Non indispensable
L-Phe	Non indispensable
L-Pro	Indispensable
HL-Pro	Non indispensable
L-Ser	Indispensable
L-Thr	Indispensable
L-Trp	Indispensable
L-Tyr	Non indispensable

5

À l'issue de l'étape de fermentation industrielle, on obtient les résultats suivants :

Fermentation	
DO 600 nm finale	13,5
Durée de la fermentation	32 heures
Durée de la phase de latence	5 heures
Durée de la phase de production de l'EPS	27 heures
$\mu$ max ( $h^{-1}$ ) (taux de croissance de la souche)	0,35
DS/dt Consommation moyenne en glucose	0,92 g/l.h de glucose
DP/dt Productivité moyenne en EPS	0,51 g/l.h de polymère
Concentration finale en EPS	10,54 g/kg de moût

La phase de latence est une phase pendant laquelle on n'observe rien, c'est-à-dire une phase pendant laquelle il n'y a pas de consommation de glucose et où aucun trouble n'est observé.

10

Le moût en fin de fermentation contient le milieu de culture tel que décrit précédemment n'ayant pas été consommé par les bactéries, les cellules bactériennes (ou bactéries) et le polysaccharide (ou polymère) de l'invention.

Suivant le procédé de purification mis en œuvre, il est possible d'obtenir différentes formes de la molécule :

**1) Moût brut contenant le polymère :**

À l'issue de la fermentation, les souches bactériennes sont inactivées par l'utilisation d'un biocide de nature chimique. Le moût de culture contenant le polymère peut ainsi être utilisé pour des applications dans les secteurs industriels de la cosmétique, de la pharmacie ou de l'agroalimentaire pour ses propriétés rhéologiques particulières.

Le produit final obtenu à l'issue de ce traitement contient le milieu de culture, les bactéries inactivées et le polymère. Le polymère sous cette forme présente un nombre n d'unités répétitives compris de 20 à 270.

**2) Moût de fermentation traité thermiquement :**

À l'issue de la fermentation, afin de "tuer" les bactéries, le moût (contenant le milieu de culture, les bactéries et le polymère) est chauffé à une température variant d'environ 35°C à environ 80°C et préférentiellement environ 60°C pendant une durée d'environ 25 minutes à environ 2 heures et préférentiellement environ 40 minutes. Ce traitement permet à la fois une stérilisation du moût de fermentation, mais confère aussi au polymère de nouvelles propriétés rhéologiques que la molécule native ne présente pas. Le moût de fermentation stérile peut être notamment utilisé dans les secteurs industriels de la cosmétique, de la pharmacie ou de l'agroalimentaire en raison de ses propriétés rhéologiques particulières.

Le produit final obtenu à l'issue de ce traitement contient le milieu de culture, les bactéries tuées et le polymère. Le polymère sous cette forme présente un nombre n d'unités répétitives compris de 20 à 240.

**3) Moût de fermentation purifié par filtration puis précipité :**

À l'issue de la fermentation, le moût présentant une viscosité comprise entre 550 et 1 600 Centipoises (Cps)(Viscosimètre Rhéomat 205) est dilué avec de l'eau osmosée

suyvant un facteur de dilution situé entre 1/4 et 1/10 afin d'obtenir une viscosité du moût dilué entre 15 et 150 cps. Une étape de microfiltration suit l'étape de dilution.

La purification de ce polymère peut être réalisée suivant différentes techniques : la centrifugation, la filtration frontale comme tangentielle ou tout autre méthode permettant une séparation de constituants.

La filtration permet la séparation des cellules bactériennes du milieu de culture contenant le polymère. Les seuils de coupure de filtration frontale permettant une séparation optimale du produit, se situent dans une plage de 0,6  $\mu\text{m}$  et 1,2  $\mu\text{m}$ .

Ainsi, cette première filtration permet d'éliminer les bactéries et d'obtenir un produit contenant uniquement le milieu de culture et le polymère.

Le tableau ci-dessous décrit la réponse du produit en fonction du seuil de coupure pour une filtration frontale sur filtre seringue au stade laboratoire.

Seuil de coupure	Tps de filtration par filtre (unités arbitraires)	Observations sur le filtrat
0,22 $\mu\text{m}$	$\infty$	Absence de filtrat
0,45 $\mu\text{m}$	50	Filtrat limpide, peu visqueux, beaucoup de pertes
0,6 $\mu\text{m}$	20	Filtrat limpide, visqueux, pertes � prendre en compte
0,8 $\mu\text{m}$	10	Filtrat +/- limpide, visqueux, quantité finale correcte
1,2 $\mu\text{m}$	8	Filtrat troublé, visqueux, peu de pertes
3 $\mu\text{m}$	5	Filtrat trouble, peu de pertes
5 $\mu\text{m}$	1	Filtrat très trouble, très peu de pertes

La filtration tangentielle permet une séparation compatible avec les impératifs industriels de production. Les seuils de coupure des membranes pouvant être utilisés se situent entre 0,1  $\mu\text{m}$  et 1,2  $\mu\text{m}$ . La dilution du moût doit être ajustée en fonction des paramètres de viscosité du moût de fermentation afin de diminuer la viscosité finale du moût de 1 600 cps à une viscosité comprise entre 15 et 150 cps.

Ce moût dilué est par la suite concentré afin d'obtenir une concentration en polymère conforme au cahier des charges de l'industrie cosmétique, pharmaceutique ou de l'agroalimentaire, à savoir variant d'environ 0,1 à environ 100 g/L et de préférence égale à environ 10 g/L de polymère.

Les techniques utilisées pour la concentration du moût pourront être des techniques d'évaporation comme l'évaporation sous pression réduite ou sur évaporateur couche mince ou préférentiellement par des techniques d'ultrafiltration.

L'ultrafiltration peut être effectuée par un système de filtration tangentielle faisant intervenir des membranes minérales ou organiques ayant un seuil de coupure compris entre environ 10 000 Daltons et environ 500 000 Daltons, avec un seuil de coupure préférentiellement d'environ 150 000 Daltons.

5 On utilise de préférence la filtration tangentielle par un souci d'efficacité et de coût de traitement. Le matériel utilisé pour l'étape de microfiltration est un système de filtration tangentielle avec des membranes minérales ayant un seuil de coupure compris entre 0,1 et 1,2  $\mu\text{m}$  et préférentiellement 0,22  $\mu\text{m}$ .

10 À l'issue du procédé de purification, au rétentat d'ultrafiltration, on ajoute 0,2 M de NaCl afin d'écranter la molécule, c'est-à-dire diminuer l'affinité du polymère vis-à-vis de l'eau, puis on ajoute un premier solvant alcoolique par exemple de l'éthanol pour obtenir un premier précipité. Le précipité est ensuite essoré puis mis en contact avec un mélange hydroalcoolique ayant un titre alcoolique croissant. Le solvant alcoolique est utilisé pour précipiter le polymère et donc pour éliminer le milieu de culture. Le polymère sous cette  
15 forme présente un nombre n d'unités répétitives compris de 20 à 220.

À l'issue de l'étape de précipitation, le précipité est séché sous vide et conditionné. On obtient le polymère pur sous forme de poudre présentant une grande stabilité au cours du temps. Ainsi le suivi de la viscosité d'une solution à 1g/l de polymère de l'invention stocké à 25°C sur une période de 95 jours permet d'obtenir les profils représentés dans la  
20 Figure 1. L'absence de diminution de la viscosité à faible contrainte de cisaillement (entre  $10^{-2}$  et  $10^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) met en évidence que le maintien d'une solution à 1 g/L de polymère à 25°C pendant 95 jours n'a que peu d'effet sur le polymère.

Le polymère ainsi obtenu présente des propriétés filmogènes.

#### 25 **4) Moût de fermentation hydrolysé puis purifié et précipité :**

À l'issue de la fermentation, le moût est ajusté à un pH compris entre 1,5 et 4,0 et préférentiellement 2,0 par l'ajout d'un acide fort tel que, par exemple, l'acide sulfurique. Le moût est ensuite chauffé à une température comprise d'environ 60°C à environ 95°C et préférentiellement d'environ 92°C sur une durée d'environ 3 à environ  
30 15 heures et préférentiellement d'environ 5 heures. A l'issue de ces deux étapes, le polymère est hydrolysé et les bactéries sont tuées.

À l'issue de la fermentation, le moût présentant une viscosité variant de 550 à 1 600 Centipoises (Cps) (Viscosimètre Rhéomat 205) est dilué avec de l'eau osmosée suivant un facteur de dilution situé entre 1/4 et 1/10 afin d'obtenir une viscosité du moût

dilué entre 15 et 150 cps. Une étape de microfiltration pour éliminer les bactéries du moût de fermentation suit l'étape de dilution. La filtration tangentielle est préférée par un souci d'efficacité et de coût de traitement. Le matériel utilisé pour l'étape de microfiltration est un système de filtration tangentielle avec des membranes minérales ayant un seuil de coupure compris entre 0,1 et 1,2  $\mu\text{m}$  et préférentiellement 0,22  $\mu\text{m}$ .

Ce moût hydrolysé et dilué est par la suite concentré afin d'obtenir une concentration en polymère conforme au cahier des charges de l'industrie cosmétique, pharmaceutique ou de l'agroalimentaire soit d'environ 0,1 à environ 100g/L et de préférence d'environ 10g/L de polymère.

Les techniques utilisées pour la concentration et la précipitation sont celles telles que décrites précédemment notamment dans le paragraphe 3.

À l'issue de l'étape de précipitation, le précipité est séché sous vide et conditionné. On obtient le polymère hydrolysé pur sous forme de poudre. Le polymère sous cette forme présente un nombre n d'unités répétitives compris de 8 à 120.

#### 5) Moût de fermentation désacétylé puis purifié et précipité :

À l'issue de la fermentation, le moût est refroidi à température ambiante (20°C) puis le pH est ajusté entre 10 et 14, préférentiellement à 12 par l'ajout d'une base (hydroxyde de sodium par exemple) pendant une durée de 5 heures. Les groupements acétyles sont éliminés par le biais de ce traitement. Cette étape correspond à la désacétylation du composé de l'invention, ce qui permet d'obtenir un composé désacétylé de formule (I-1) telle que définie ci-dessus.

À l'issue de la fermentation, le moût présentant une viscosité comprise entre 550 et 1 600 Centipoises (Cps) (Viscosimètre Rhéomat 205) est dilué avec de l'eau osmosée suivant un facteur de dilution situé entre 1/4 et 1/10 afin d'obtenir une viscosité du moût dilué entre 15 et 150 cps. Une étape de microfiltration pour éliminer la biomasse suit l'étape de dilution. La filtration tangentielle est préférée par un souci d'efficacité et de coût de traitement. Le matériel utilisé pour l'étape de microfiltration est un système de filtration tangentielle avec des membranes minérales ayant un seuil de coupure compris entre 0,1 et 1,2  $\mu\text{m}$  et préférentiellement 0,22  $\mu\text{m}$ .

Ce moût désacétylé et dilué est par la suite concentré afin d'obtenir une concentration en polymère conforme au cahier des charges de l'industrie cosmétique, pharmaceutique ou de l'agroalimentaire soit d'environ 0,1 à environ 100 g/L et de préférence égale à environ 10 g/L de polymère.

Les techniques utilisées pour la concentration et la précipitation sont celles telles que décrites précédemment notamment dans le paragraphe 3.

À l'issue de l'étape de précipitation, le précipité est séché sous vide et conditionné. On obtient le polymère désacétylé pur sous forme de poudre. Ce polymère présente notamment des propriétés filmogènes. Le polymère sous cette forme présente un nombre  $n$  d'unités répétitives compris de 20 à 220.

#### **6) Moût de fermentation désacétylé, hydrolysé puis purifié et précipité :**

À l'issue de la fermentation, le moût est refroidi à température ambiante (20°C) puis le pH est ajusté entre 10 et 14, préférentiellement à 12 par l'ajout d'une base (hydroxyde de sodium par exemple) pendant une durée de 5 heures. Les groupements acétyles sont éliminés par le biais de ce traitement. Cette étape correspond à la désacétylation du composé de l'invention, ce qui permet d'obtenir un composé désacétylé de formule (I-1) telle que définie ci-dessus.

Le moût désacétylé est ajusté à un pH d'environ 1,5 à environ 4,0 et préférentiellement d'environ 2,0 par l'ajout d'un acide fort tel que, par exemple, l'acide sulfurique. Le moût est ensuite chauffé à une température d'environ 95°C à environ 60°C et préférentiellement d'environ 92°C sur une durée d'environ 3 à environ 15 heures et préférentiellement d'environ 5 heures. (étape d'hydrolyse)

À l'issue de la fermentation, le moût présentant une viscosité comprise entre 550 et 1 600 Centipoises (Cps) (Viscosimètre Rhéomat 205) est dilué avec de l'eau osmosée suivant un facteur de dilution situé entre 1/4 et 1/10 afin d'obtenir une viscosité du moût dilué entre 15 et 150 cps. Une étape de microfiltration suit l'étape de dilution. On utilise de préférence la filtration tangentielle par un souci d'efficacité et de coût de traitement. Le matériel utilisé pour l'étape de microfiltration est un système de filtration tangentielle avec des membranes minérales ayant un seuil de coupure compris entre 0,1 et 1,2  $\mu\text{m}$  et préférentiellement 0,22  $\mu\text{m}$ .

Ce moût désacétylé, hydrolysé et dilué est par la suite concentré afin d'obtenir une concentration en polymère conforme au cahier des charges de l'industrie cosmétique, pharmaceutique ou de l'agroalimentaire soit d'environ 0,1 à environ 100 g/L et de préférence égale à environ 10g/L de polymère.

Les techniques utilisées pour la concentration et la précipitation sont celles telles que décrites précédemment notamment dans le paragraphe 3.

À l'issue de l'étape de précipitation, le précipité est séché sous vide et conditionné. On obtient le polymère désacétylé et hydrolysé sous forme de poudre. Le polymère sous cette forme présente un nombre n d'unités répétitives compris de 8 à 120.

5

## **PARTIE EXPÉRIMENTALE**

10

Le polymère de l'invention, contenu dans le moût de fermentation, traité thermiquement, désigné ci-après par le terme "polymère de l'invention" ou Alcos 04, apporte une amélioration notable dans le domaine de la cosmétique.

15

En effet, les propriétés viscoélastiques du produit permettent son utilisation dans la préparation d'émulsions cosmétiques en substitution des produits couramment utilisés dans ce secteur d'activité. Les molécules apportant de la viscosité comme les polyacrylates ou polyacrylamides, dérivent de l'industrie du pétrole alors que le polysaccharide de l'invention, lui, est produit de façon naturelle en utilisant des matières premières renouvelables dérivées de l'agriculture.

20

### **A - Influence du pH sur la viscosité**

25

Le polymère peut être utilisé par exemple comme gélifiant dans la confection de produit cosmétique stable. La nature chimique du polymère le rend peu sensible aux variations de pH comparé aux produits dérivés de la pétrochimie favorisant ainsi la stabilité de la formule.

30

Exemples de formules cosmétiques :

Phase		Alcos 04 (invention)	Sepigel (SEPPIC)	ATH (Cosmetics Rheologies)
A	Emuliance 05-295 (ARD)	2,5%	2,5%	2,5%
	Acide stéarique	0,5%	0,5%	0,5%
	Diméthicone 200 350cps	3%	3%	3%
	Huile de macadamia raffinée	7%	7%	7%
	Phenonip	0,4%	0,4%	0,4%
	Dry Flo PC	2%	2%	2%
B	Eau Osmosée	QSP 100%	QSP 100%	QSP 100%
	Glycérine/Sorbitol	2%	2%	2%
	ALCOS 04 Pasteurisé (MS 0,235%)	10%	–	–
C	Sepigel 305 (MS 47%)	–	0,5%	–
	Rheocare ATH (MS 60%)	–	–	0,39%
D	Acide citrique qs pH 3 Hydroxyde de Sodium qs pH 10	qsp	qsp	qsp

Viscosité Aig E Vit 12 Système Hélipath (Brookfield) 2 minutes. à 20°C en mPa.s	15700	33000	27000
pH à 20°C	5,44	4,3	5,87
Centrifugation 4*15 min. à 4080G à 20°C	RAS	RAS	RAS

Le procédé de fabrication laboratoire suit le protocole suivant :

- a. On pèse séparément les phases A et B et on chauffe à 75°C.
- 5 b. On additionne lentement la phase B sur la phase A sous émulseur à 3 000 tpm (Polytron PT 300, Prolabo) pendant 5 minutes.
- c. A 60°C, on ajoute la phase C, toujours sous émulseur.
- d. On ajoute ensuite la phase D si nécessaire.
- 10 e. On refroidit sous hélice jusqu'à température ambiante.

Les produits testés sont :

- Sepigel 305 (polyacrylamide/C13-14 isoparaffin/laureth-7) (SEPPIC)
- Rheocare ATH (sodium polyacrylate/ethylhexyl stéarate/trideceth-6)  
(Cosmetics Rheologies)
- 15 • Alcos 04 Past le polymère de l'invention.

Le polymère de l'invention est peu sensible aux variations de pH lorsque ce dernier varie d'une gamme de 2 à 12. Contrairement aux produits non naturels indiqués

ci-dessus, la variation de viscosité est faible et ne modifie pas la stabilité des émulsions formées (voir Figure 2).

L'étude de la viscosité et de la stabilité des émulsions par centrifugation de ces dernières permet de vérifier la stabilité des formules testées :

- le polymère de l'invention : émulsions stables sur toute la gamme de pH,
- Sepigel 305 : perte de stabilité à pH 12,
- Rhéocare ATH : émulsions non stables à pH 3 et 12.

La nature chimique du polymère le rend par ailleurs peu sensible à la variation de la force ionique du milieu permettant d'ajouter de sels dans une formule cosmétique comme les shampoings par exemple sans variation de stabilité ce celle-ci.

#### **B - Influence du sel (0,2-0,5-1%) sur la viscosité**

Formulations :

		Alcos 04	Sepigel	ATH
A	Emuliance 05-295 (ARD)	2,5%	2,5%	2,5%
	Acide stéarique	0,5%	0,5%	0,5%
	Diméthicone 200 350cps	3%	3%	3%
	Huile de macadamia raffinée	7%	7%	7%
	Phenonip	0,4%	0,4%	0,4%
	Dry Flo PC	2%	2%	2%
B	Eau Osmosée	QSP 100%	QSP 100%	QSP 100%
	Glycérine/Sorbitol	2%	2%	2%
	Chlorure de Sodium	0,2 –0,5- 1%	0,2 –0,5- 1%	0,2 –0,5- 1%
	ALCOS 04 Pasteurisé MS 0,235%	10%	–	–
C	Sepigel 305 (MS 47%)	–	0,5%	–
	Rheocare ATH (MS 60%)	–	–	0,39%

Le procédé de fabrication laboratoire suit le protocole suivant :

- a. Peser séparément les phases A et B et chauffer à 75°C.
- b. Additionner lentement B sur A sous émulseur à 3000 rpm (Polytron PT 300)

pendant 5 min.

- 5 c. A 60°C, ajouter la phase C, toujours sous émulseur.
- d. Refroidir sous hélice jusqu'à température ambiante

Résultats :

% NaCl	Viscosité en mPa.s (Brookfield DVIII Ultra Aig E-Vit 12 Hélipath 2 min.20°C)		
	Sépigel 305	Rheocare ATH	Alcos 04 past
0	40 000	27 000	15 700
0,2	14 500	12 500	11 500
0,5	8 500	10 700	10 900
1	4 590	2 400	8 000

10

L'étude de la viscosité et de la stabilité des émulsions par centrifugation de ces dernières permet de vérifier la stabilité des formules testées :

- polymère de l'invention : à 0,2% l'émulsion est stable, entre 0,2% et 0,5%, on observe un léger filet d'huile à la surface du tube ; à 1% de sel, un déphasage de 65% d'eau apparaît ; la variation de viscosité oscille entre 30 et 50%.

15

- Sepigel 305 : à 0,2% l'émulsion est stable ; à 0,5% et 1% on observe un déphasage d'eau de 20 à 55%, plus un re-largage d'huile ; la variation de viscosité oscille entre 60 et 90%.

- Rhéocare ATH : aucune émulsion n'est stable ; déphasage d'eau de 20 à 35% et d'huile de l'ordre de 19% ; la variation de viscosité oscille entre 55 et 90%.

20

De plus, alors qu'en conditions hydroalcooliques, certaines molécules voient leur viscosité chuter, le polymère de l'invention n'est que peu affecté.

Par exemple : 2 solutions dans 20 et 36,2% d'éthanol 96 à 1,5% en matière sèche (MS) de polymères sont préparées pour chacun des 3 polymères (Sepigel 305, Rheocare ATH, Alcos 04 Past - polymère de l'invention).

25

Les pH natifs sont compris entre 6,8 et 7,2.

	Viscosité en mPa.s (Cylindre 4, Vit 6 ou 3 à 20°C)		
	Alcos 04 Past	Sepigel 305	Rheocare ATH
Sans éthanol	10 000	86 000	91 700
20% éthanol 96	12 500	197 000	97 200
36,2% éthanol 96	12 600	65 500	500

L'étude de la viscosité permet d'obtenir les résultats suivants :

- 5
- polymère de l'invention : viscosité de l'ordre de 10 000 à 12 000 mPa.s, peu sensible à l'ajout d'éthanol 96 ;
  - Sepigel 305 : augmentation de la viscosité à 20% d'éthanol et diminution à 36,2% ;
  - Rhéocare ATH : peu d'influence à 20% mais perte totale de la viscosité à 36,2% d'éthanol.
- 10

### **C - Influence de la nature de la base huileuse**

15 L'industrie cosmétique utilise un grand nombre de bases huileuses différentes pour la confection de crèmes, de lotions ou de laits. Ces matières premières d'origine hydrophobe peuvent modifier le comportement rhéologique des molécules de type polymère présentes dans la formule.

Le polymère de l'invention n'est que peu influencé par la nature chimique de la base huileuse et ce contrairement aux autres molécules d'origine pétrochimique.

20

Dans l'exemple ci-dessous, 4 huiles sont testées : l'huile de paraffine, l'huile d'amande douce, l'isostéarate d'isostéaryle et la diméthicone 200 350cps.

La formule est la suivante :

Phase	Ingrédients	Quantités
A	Polymère	1.5% MS
	Eau Osmosée	QSP 100%
B	Phase lipidique	10%

Pour la confection de cette formule il convient de procéder comme suit :

Il faut peser séparément les phases A et B et additionner lentement B sur A sous émulseur à 3000 tpm (Polytron PT 300, Prolabo) pendant 5 minutes.

5

Résultats :

	Alcos 04 Past	Sepigel 305	Rheocare ATH
Huile de Paraffine	13 700	30 000	15 000
Huile d'amandes douces	15 500	45 000	53 800
Isostéarate d'isostéaryle	20 000	18 700	17 700
Diméthicone 200 350cps	19 200	30 700	42 900

L'étude de la viscosité des émulsions permet de déterminer l'impact de la base huileuse sur la viscosité de la formule :

10

- polymère de l'invention : viscosité de l'ordre de 10 000 à 12 000 mPa.s, peu sensible à la nature de l'huile ;

- Sepigel 305 : viscosité de l'ordre de 20 000 à 45 000 mPa.s ;

- Rhéocare ATH : viscosité de l'ordre de 15 000 à 55 000 mPa.s.

15

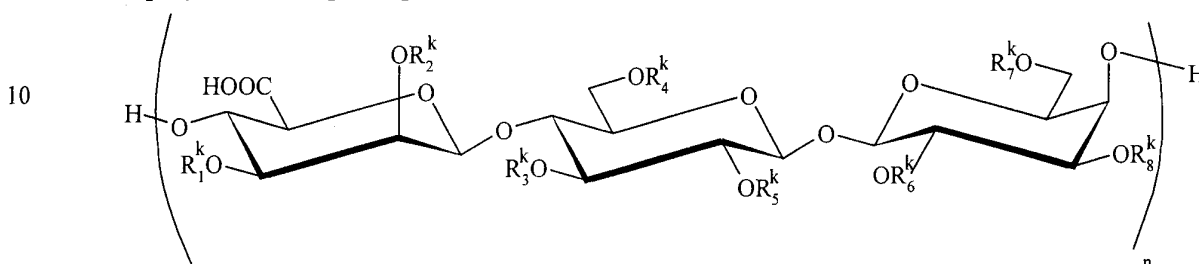
L'ensemble de ces propriétés permet de classer le polymère de l'invention comme un agent apportant de la viscosité et stabilisant les émulsions ayant des faibles taux d'émulsionnant.

20

L'utilisation du polymère de l'invention permet l'obtention d'émulsion de type lait ou sérum présentant une faible viscosité, une texture légère et un toucher doux et soyeux.

## REVENDICATIONS

1. Utilisation de la souche bactérienne ALV104 de la famille des *Rhizobiaceae*, déposée à la CNCM le 21 mars 2006 sous le numéro I-3591, ou d'une souche dont le gène *rrs* présente un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 99,9% avec le gène *rrs* de ladite souche ALV104, pour la préparation d'un composé polysaccharidique, répondant à la formule (I) suivante :



dans laquelle :

- 15
- k varie de 1 à n,
  - n représente un nombre entier compris de 5 à 300, notamment de 8 à 270,
  - $R^k_1, R^k_2, R^k_3, R^k_4, R^k_5, R^k_6, R^k_7$  et  $R^k_8$  représentent, indépendamment les uns des autres, H ou un groupe acyle comprenant de 1 à 6 atomes de carbone, notamment un groupe acétyle.

20

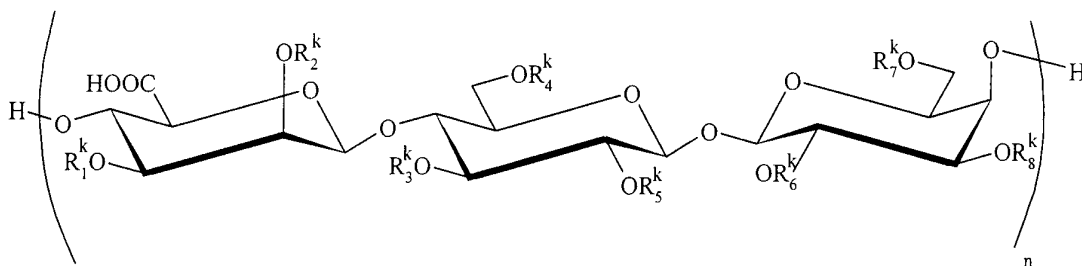
2. Utilisation selon la revendication 1, de la souche bactérienne ALV104 de la famille des *Rhizobiaceae*, déposée à la CNCM le 21 mars 2006 sous le numéro I-3591, pour la préparation d'un composé polysaccharidique de formule (I) telle que définie dans la revendication 1, dans laquelle d'environ 40% à environ 60%, notamment d'environ 43% à environ 56%, et de préférence d'environ 43,75% à environ 56,25% de la totalité des groupes  $R^k_1, R^k_2, R^k_3, R^k_4, R^k_5, R^k_6, R^k_7$  et  $R^k_8$  représente un groupe acétyle.

25

3. Utilisation selon la revendication 1, de la souche bactérienne ALV104 de la famille des *Rhizobiaceae*, déposée à la CNCM le 21 mars 2006 sous le numéro I-3591, pour la préparation d'un composé polysaccharidique de formule (I) telle que définie dans la revendication 1, dans laquelle au moins 60% de la totalité des groupes  $R^k_1, R^k_2, R^k_3, R^k_4, R^k_5, R^k_6, R^k_7$  et  $R^k_8$  représente un atome d'hydrogène.

30

4. Composé polysaccharidique, répondant à la formule (I) suivante :



dans laquelle :

- 10
- k varie de 1 à n,
  - n représente un nombre entier compris de 5 à 300, notamment de 8 à 270,
  - $R^k_1, R^k_2, R^k_3, R^k_4, R^k_5, R^k_6, R^k_7$  et  $R^k_8$  représentent, indépendamment les uns des autres, H ou un groupe acyle comprenant de 1 à 6 atomes de carbone, notamment un groupe acétyle.

15

5. Composé selon la revendication 4, dans lequel au moins d'environ 40% à environ 60%, notamment d'environ 43% à environ 56%, et de préférence d'environ 43,75% à environ 56,25% de la totalité des groupes  $R^k_1, R^k_2, R^k_3, R^k_4, R^k_5, R^k_6, R^k_7$  et  $R^k_8$  représente un groupe acétyle.

20

6. Composé selon la revendication 4, caractérisé en ce que au moins 60% de la totalité des groupes  $R^k_1, R^k_2, R^k_3, R^k_4, R^k_5, R^k_6, R^k_7$  et  $R^k_8$  représente un atome d'hydrogène.

25

7. Composition comprenant un composé selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, en association avec une souche bactérienne telle que définie dans la revendication 1 et/ou le milieu de culture ou une partie du milieu de culture de ladite souche, comprenant notamment une source d'azote, telle que de l'extrait de levure ou des protéines d'origine organique comme des peptones végétales de type peptones de blé, de luzerne, de pomme de terre, une source de carbone comme le glucose, maltose, mannose, arabinose, saccharose, ribose, xylose, lactose ou mannitol, et une source

30

d'oligo-éléments contenant du fer, sulfate, magnésium, calcium, chlorure, zinc, bore, cuivre, cobalt ou manganèse.

8. Composition pharmaceutique, agro-alimentaire ou cosmétique, comprenant un composé selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, en association avec un véhicule approprié.

5 9. Procédé de préparation d'une composition selon la revendication 8 comprenant une étape de fermentation en présence d'une souche bactérienne ALV104 de la famille des *Rhizobiaceae*, déposée à la CNCM le 21 mars 2006 sous le numéro I-3591, ou d'une souche dont le gène *rrs* présente un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 99,9% avec le gène *rrs* de ladite souche ALV104, et d'un milieu de culture  
10 comprenant notamment une source d'azote, telle que de l'extrait de levure ou des protéines d'origine organique comme des peptones végétales de type peptones de blé, de luzerne, de pomme de terre, une source de carbone comme le glucose, maltose, mannose, arabinose, saccharose, ribose, xylose, lactose ou mannitol, et une source d'oligo-éléments contenant du fer, sulfate, magnésium, calcium, chlorure, zinc, bore,  
15 cuivre, cobalt ou manganèse.

10. Procédé de préparation d'un composé selon la revendication 4, comprenant les étapes suivantes :

– une étape de fermentation en présence d'une souche bactérienne ALV104 de la  
20 famille des *Rhizobiaceae*, déposée à la CNCM le 21 mars 2006 sous le numéro I-3591, ou d'une souche dont le gène *rrs* présente un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 99,9% avec le gène *rrs* de ladite souche ALV104, et d'un milieu de culture comprenant notamment une source d'azote, telle que de l'extrait de levure ou des protéines d'origine organique comme des peptones végétales de type peptones de blé, de luzerne, de  
25 pomme de terre, une source de carbone comme le glucose, maltose, mannose, arabinose, saccharose, ribose, xylose, lactose ou mannitol, et une source d'oligo-éléments contenant du fer, sulfate, magnésium, calcium, chlorure, zinc, bore, cuivre, cobalt ou manganèse, afin d'obtenir une composition comprenant un composé selon la revendication 4, en association avec une souche bactérienne telle que définie dans la  
30 revendication 1 et le milieu de culture tel que défini ci-dessus, et

– une étape de filtration, notamment de filtration tangentielle, afin de débarrasser la susdite composition de ladite souche bactérienne et dudit milieu de culture, et pour obtenir le composé polysaccharidique selon la revendication 4.

11. Procédé de préparation selon la revendication 10, comprenant, après l'étape de filtration, une étape de précipitation du composé polysaccharidique selon la revendication 4, afin d'obtenir ledit composé sous forme de poudre, et comprenant, le cas échéant, après ladite étape de précipitation, une étape consistant à mettre en solution le composé obtenu sous forme de poudre, afin de procéder à la désacétylation complète dudit composé, et d'obtenir un composé selon la revendication 6.

12. Procédé de préparation selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'une étape de désacétylation complète du composé selon la revendication 4 est effectuée après l'étape de fermentation et avant l'étape de filtration, afin d'obtenir un composé selon la revendication 6.

13. Procédé de préparation d'un composé selon la revendication 6, comprenant les étapes suivantes :

– une étape de fermentation en présence d'une souche bactérienne ALV104 de la famille des *Rhizobiaceae*, déposée à la CNCM le 21 mars 2006 sous le numéro I-3591, ou d'une souche dont le gène *rrs* présente un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 99,9% avec le gène *rrs* de ladite souche ALV104, et d'un milieu de culture comprenant notamment une source d'azote, telle que de l'extrait de levure ou des protéines d'origine organique comme des peptones végétales de type peptones de blé, de luzerne, de pomme de terre, une source de carbone comme le glucose, maltose, mannose, arabinose, saccharose, ribose, xylose, lactose ou mannitol, et une source d'oligo-éléments contenant du fer, sulfate, magnésium, calcium, chlorure, zinc, bore, cuivre, cobalt ou manganèse, afin d'obtenir une composition comprenant un composé selon la revendication 4, en association avec une souche bactérienne telle que définie dans la revendication 1 et un milieu de culture tel que défini ci-dessus,

– une étape de désacétylation complète du composé selon la revendication 4, pour obtenir une composition comprenant un composé selon la revendication 6, en association avec ladite souche bactérienne et ledit milieu de culture, et

– une étape de filtration, notamment de filtration tangentielle, afin de débarrasser la susdite composition de ladite souche bactérienne et dudit milieu de culture, et pour obtenir le composé polysaccharidique selon la revendication 6.

14. Utilisation du composé polysaccharidique selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, pour la préparation d'une composition cosmétique.

5 15. Utilisation du composé polysaccharidique selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, en tant qu'agent de texture ou de toucher, ou en tant qu'agent stabilisateur d'émulsion, ou dans le domaine du diagnostic microbiologique, notamment en tant que support de croissance de micro-organismes.

10 16. Utilisation du composé polysaccharidique selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, sous forme de gel, en substitution totale ou partielle des bases gélifiantes dans les milieux de culture, notamment pour remplacer le gel d'agarose ou d'Agar Agar.

15 17. Procédé de préparation selon la revendication 9, comprenant, après l'étape de fermentation de la souche bactérienne, une étape de pasteurisation de la composition selon la revendication 7 afin d'inactiver les bactéries constituant la souche bactérienne, cette étape de pasteurisation correspondant à une étape de maintien de ladite composition à une température d'environ 45°C à environ 90°C pendant d'environ 5 minutes à environ 60 minutes.

20

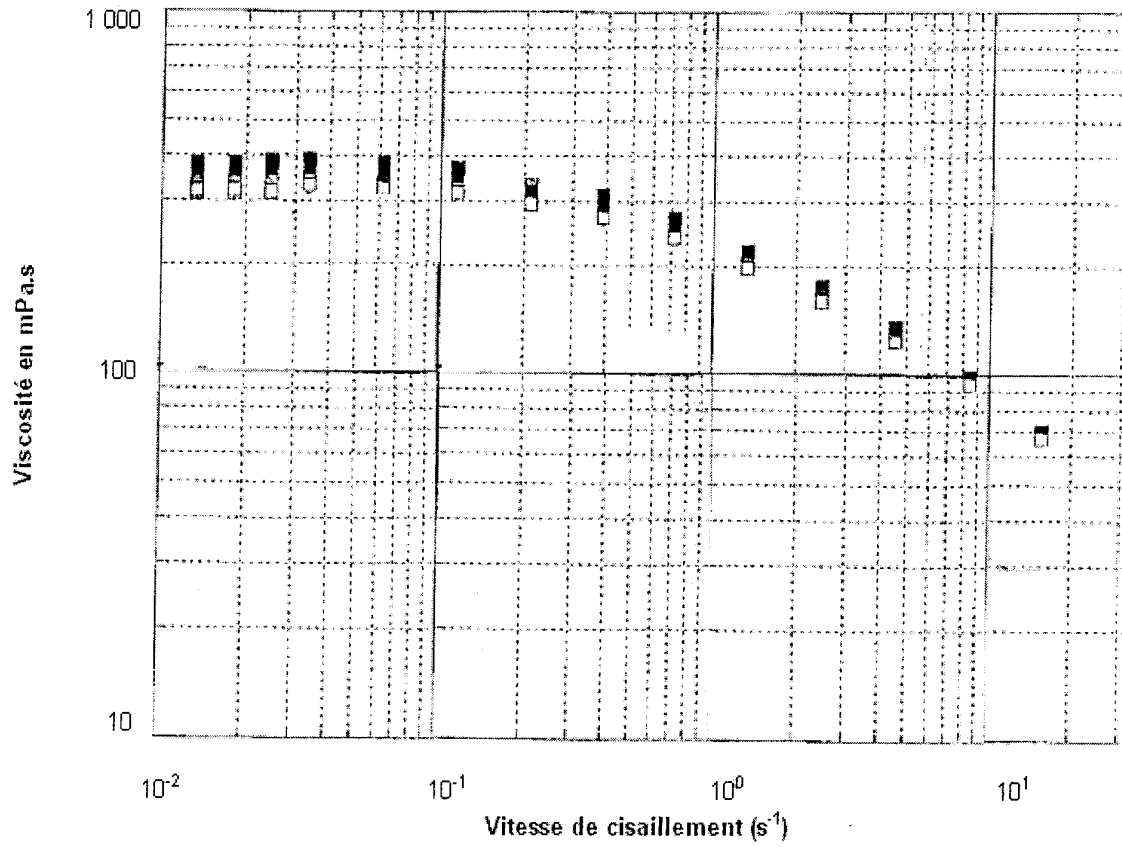


FIGURE 1

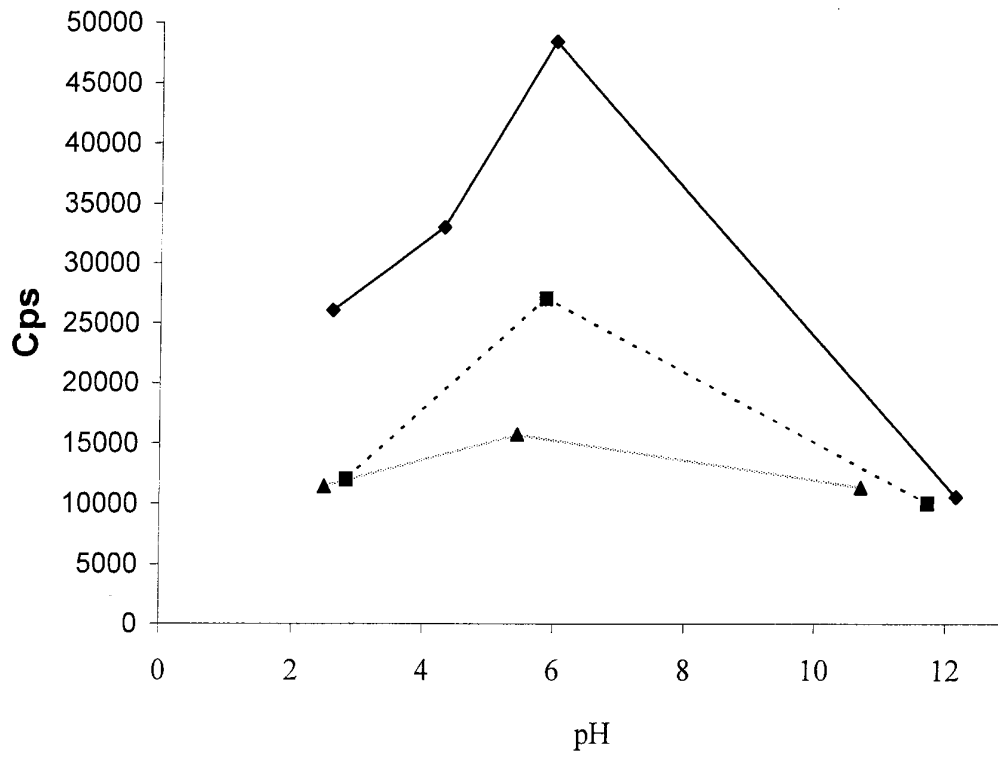


FIGURE 2



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 691047  
FR 0608840

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, des parties pertinentes		
A	<p>KACI Y ET AL: "Isolation and identification of an EPS-producing Rhizobium strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure" RESEARCH IN MICROBIOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 156, no. 4, mai 2005 (2005-05), pages 522-531, XP004872955 ISSN: 0923-2508 * abrégé * * page 524, alinéa 2.7 * * page 525, alinéa 2.9 * * page 525, colonne 2, ligne 37-46 * * page 530, colonne 1, ligne 16-41 *</p>	1-13,17	C12P19/04 C08B37/00 A61K8/73 A61Q19/00 C12R1/41
A	<p>US 3 228 855 A (CADMUS MARTIN C ET AL) 11 janvier 1966 (1966-01-11) * colonne 1, ligne 16-28 * * colonne 1, ligne 61 - colonne 2, ligne 4 * * colonne 2, ligne 52 - colonne 3, ligne 12 * * colonne 3, ligne 26-61 *</p>	4-6,8, 10-16	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)</p> <p>C12P A61K C12R</p>
A	<p>SLONEKER J H ET AL: "Structure of the extracellular bacterial polysaccharide from Arthrobacter viscosus NRRL B-1973" CANADIAN JOURNAL OF CHEMISTRY, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. OTTAWA, CA, vol. 46, no. 21, 1968, pages 3353-3361, XP008081453 ISSN: 0008-4042 * abrégé *</p>	4-6	
----- -/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
23 juillet 2007		Schröder, Gunnar	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 691047  
FR 0608840

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	FR 2 792 337 A1 (RHONE POULENC CHIMIE [FR]) 20 octobre 2000 (2000-10-20) * abrégé * * page 4, ligne 6-22 * * page 5, ligne 3-12 * * page 5, ligne 26 - page 6, ligne 28 * * page 7, ligne 12 - page 12, ligne 3 * * page 14, ligne 24 - page 16, ligne 17 * * page 19, ligne 6 - page 23, ligne 7; exemples 2,3 *	4-6,8, 10-16	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	FR 2 759 377 A1 (ARD SA [FR]) 14 août 1998 (1998-08-14) * abrégé * * page 1, ligne 25-35 * * page 4, ligne 19-35 * * page 6, ligne 18 - page 11, ligne 35 * * page 13, ligne 7-13 * * page 13, ligne 24-30 * * page 14, ligne 7-23 *	1-17	
A	FR 2 831 553 A1 (AGRO IND RECH S ET DEV ARD [FR]) 2 mai 2003 (2003-05-02) * abrégé * * page 1, ligne 14 - page 2, ligne 8 *	16	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
23 juillet 2007		Schröder, Gunnar	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

10  
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0608840 FA 691047**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 23-07-2007

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 3228855	A	11-01-1966	AUCUN
-----			
FR 2792337	A1	20-10-2000	AT 254182 T 15-11-2003
			AU 3827000 A 02-11-2000
			BR 0009789 A 08-01-2002
			CA 2370194 A1 26-10-2000
			CN 1353766 A 12-06-2002
			DE 60006511 D1 18-12-2003
			DE 60006511 T2 23-09-2004
			EP 1173601 A1 23-01-2002
			ES 2211525 T3 16-07-2004
			WO 0063412 A1 26-10-2000
			JP 3734711 B2 11-01-2006
			JP 2002542385 T 10-12-2002
			PT 1173601 T 31-03-2004
			US 7078198 B1 18-07-2006
-----			
FR 2759377	A1	14-08-1998	AT 218587 T 15-06-2002
			CA 2281594 A1 20-08-1998
			DE 69805757 D1 11-07-2002
			DE 69805757 T2 06-03-2003
			DK 960132 T3 16-09-2002
			EP 0960132 A1 01-12-1999
			WO 9835993 A1 20-08-1998
			JP 3721521 B2 30-11-2005
			JP 2001516375 T 25-09-2001
			US 6344346 B1 05-02-2002
-----			
FR 2831553	A1	02-05-2003	AUCUN
-----			