

## (12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 47663 A1**
- (51) Cl. internationale : **A01N 63/02; C12N 1/20; C05F 11/08**
- (43) Date de publication : **29.05.2020**
- 
- (21) N° Dépôt : **47663**
- (22) Date de Dépôt : **22.05.2018**
- (30) Données de Priorité : **21.06.2017 ES P201730818**
- (86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/ES2018/070369 22.05.2018**
- (71) Demandeur(s) : **FUNDACION UNIVERSITARIA SAN PABLO , C/ Isaac Peral nº 58 28040 Madrid (ES)**
- (72) Inventeur(s) : **GUTIERREZ ALBANQUEZ ENRIQUE ; GUTIERREZ MANERO, FRANCISCO JAVIER ; LUCAS GARCIA, JOSE ANTONIO ; RAMOS SOLANO, BEATRIZ**
- (74) Mandataire : **BOUTAHAR OMAR**
- 
- (54) Titre : **BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS QV15 STIMULANT DU MÉTABOLISME SECONDAIRE POUR LE MÉTABOLISME SECONDAIRE DES COMPOSES phénoliques ET LA CAPACITÉ INHIBITRICE D'EXTRAIT DE FRAMBOISES ET FRAISES POUR LES ENZYMES LIÉES AU SYNDROME MÉTABOLIQUE.**
- (57) Abrégé : L'invention concerne une souche bactérienne *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), micro-organisme du groupe des bactéries Gram +, genre *Bacillus*, stimulant du métabolisme secondaire des composés phénoliques, améliorateur des extraits de fruit et de feuille de framboise et de fraise sur les enzymes associés à la régulation du glucose sanguin (alpha glucosidase), de l'hypertension (enzyme de conversion de l'angiotensine ACE), et de l'inflammation (cyclo-oxygénase COX2). Cette souche a été isolée à partir de la rhizosphère de *Pinus pinea*, dans la gélose nutritive (PCA), et a été caractérisée du point de vue morphologique, biochimique et génétique au moyen du séquençage du gène 16s. Ladite souche peut être utilisée dans le but d'améliorer les propriétés des extraits par rapport à leur application sur des enzymes associés au syndrome métabolique ou afin de modifier le métabolisme secondaire pour améliorer les composés phénoliques dans des espèces végétales d'intérêt agronomique, pharmacologique et alimentaire, et obtenir

une plus grande quantité de principes actifs et/ou de nouveaux aliments avec une teneur standard en phénols.

### Abrégé

La Souche bactérienne *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371) est un micro-organisme du groupe des bactéries Gram +, genre *Bacillus*, stimulant du métabolisme secondaire des composés phénoliques, activateur des extraits et feuilles de framboise et fraise pour les enzymes liées à la régulation de la glycémie (*alpha-glucosidase*), l'hypertension (enzyme de conversion de l'angiotensine, ECA) et l'inflammation (*cyclooxygénase*, COX2). Cette souche a été isolée de la rhizosphère de *Pinus pinea*, dans une gélose nutritive (PCA), et a été caractérisée d'un point de vue morphologique, biochimique et génétique par séquençage du gène 16s. Elle peut être utilisée pour améliorer les caractéristiques des extraits en ce qui concerne leur application à des enzymes liées au syndrome métabolique, ou pour modifier le métabolisme secondaire afin d'améliorer les composés phénoliques chez les espèces végétales à usage agronomique, pharmacologique et alimentaire, et d'obtenir une plus grande quantité des agents actifs et/ou de nouveaux aliments avec une teneur standardisée en phénol.

## DESCRIPTION

5 ***BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* QV15 STIMULANT DU METABOLISME  
SECONDAIRE POUR LE METABOLISME SECONDAIRE DES COMPOSES  
PHENOLIQUES ET LA CAPACITE INHIBITRICE D'EXTRAIT DE  
FRAMBOISES ET FRAISES POUR LES ENZYMES LIEES AU SYNDROME  
METABOLIQUE.**

10 La présente invention concerne une souche de *Bacillus amyloliquefaciens*  
(QV15 code interne de laboratoire) destinée à être utiliser dans les plantes, afin  
d'améliorer la synthèse des composés phénoliques du métabolisme secondaire à usages  
agricole, pharmaceutique et nutritionnel, et notamment, améliorer la couleur des fraises  
15 et framboises, en plus d'améliorer les caractéristiques des extraits de framboise et  
fraise pour un effet inhibiteur sur l'alpha-glucosidase, ECA et COX2, ainsi pour  
améliorer les symptômes ou empêche le syndrome métabolique.

Cette souche, une fois isolée, s'est vue attribuer la référence interne L81 et a été  
déposée aux fins de brevets à la Collection Espagnole de Culture Type (CECT), le 31  
20 mai 2017, sous le numéro 9371. La CEST est située au Bâtiment de Recherche de  
l'Université de Valence, au Campus de Burjassot (DP 46100, Valence, Espagne).

Cette souche bactérienne peut servir de base pour la préparation de différents  
types de produits stimulants du métabolisme secondaire des plantes à usage agricoles,  
25 pharmaceutique et nutritionnel, et l'obtention d'une quantité importante des substances  
actives et/ou aliments nouveaux avec une teneur en phénol standard, tel que les baies  
sauvages (fraise et framboise) à teneur accrue en composés phénoliques, notamment en  
anthocyanes, améliorant la coloration et °Brix. Ces produits doivent améliorer la teneur  
en composés bioactifs phénoliques pouvant constituer des substances actives pour  
30 divers médicaments, et améliorer la qualité de certains produits alimentaires. En outre,  
celle-ci peut être utilisé pour améliorer les caractéristiques d'extraits du mûre,  
framboise et fraise en vue d'un effet inhibiteur sur l'alpha-glucosidase et COX2 et afin  
d'améliorer du syndrome métabolique.

35 **DOMAINE DE LA TECHNIQUE**

L'invention relève du domaine de la biotechnologie et pharmacologie et nouvel  
aliment.

40 **ETAT DE LA TECHNIQUE**

Les mécanismes d'action de la bactérie qui stimulent la croissance des plantes  
peuvent se résumer en deux types : directe, lorsque les métabolites produits altèrent le

métabolisme des plantes (activité hormonale, stimulation des mécanismes de défense,...), et indirecte, lorsqu'elles synthétisent les composés qui facilitent l'absorption ou la mobilisation des éléments nutritifs, ou qui empêchent la prolifération des microorganismes pathogènes sans impliquer la plante et sans altérer le métabolisme de la plante.

Dans ce cas, il s'agit d'un des mécanismes directs, c'est-à-dire ceux qui altèrent le métabolisme de la plante. La plante a un métabolisme secondaire, fortement inductible, lié à la défense de la plante et aux adaptations aux situations néfastes, auxquelles elle doit faire face. Dans ce métabolisme secondaire, nous trouvons le métabolisme des composés phénoliques qui, en plus d'être lié à la défense des plantes, concerne également la santé humaine, tant lorsque les aliments d'origine végétale sont consommés où ils sont naturellement contenus, et les extraits de plantes utilisés dans les compléments alimentaires. Ils sont également importants en tant que source de substances actives pour fabriquer des médicaments. La photosynthèse est la source des squelettes carbonés pour nourrir le métabolisme secondaire. Tout mécanisme susceptible d'affecter ce processus affectera la santé des plantes.

*Bacillus amyloliquefaciens* appartient au groupe des bactéries Gram+. Le genre *Bacillus* est commun sur les bactéries du sol et elles peuvent être des agents pathogènes opportunistes sur les animaux et les agents phytopathogènes. En appliquant « *the Manual Bergeys taxonomy* », édition de mars 2001, cette bactérie relève appartient au champ des bactéries, *Phylum Firmicutes*, Classe des *Bacilli*, ordre *Bacillales*, famille des *Bacillaceae*, genre *Bacillus*, espèce *amyloliquefaciens*. Le genre *Bacillus* est très commun dans le système édaphique et a été considéré à maintes reprises une bactérie protectrice contre différentes maladies des plantes. Ils peuvent produire des sidérophores de type catéchol non-fluorescents qui, parmi d'autres fonctions, agissent en tant que molécules capables de capturer le fer dans le milieu pour le métabolisme des micro-organismes. La présence de l'espèce *Bacillus* dans la rhizosphère de différentes plantes affecte de façon bénéfique leur physiologie, ce qui signifie que sa sélection au niveau de la rhizosphère est très susceptible de se produire.

Il existe de nombreuses références dans la littérature scientifique qui se réfèrent aux souches du genre *Bacillus* comme étant capables de réaliser de nombreuses activités d'intérêt dans le domaine de la biotechnologie, l'agriculture et la phytopathologie. Dans le domaine de la biotechnologie, il existe des études i) concernant leur rôle en tant que biomarqueurs de stérilisation, dans les études de bio-défense, ii) concernant leur impact sur le métabolisme primaire des plantes en augmentant leur croissance et leur production, iii) en tant qu'agents désinfectant, iv) en tant qu'agents antimicrobiens pour leur capacité à produire des molécules antimicrobiennes polycétide ou lipopeptide. Dans le domaine de l'agriculture et de la phytopathologie, il existe de nombreuses références sur la capacité de *Bacillus amyloliquefaciens* d'induire les défenses de la plante ; d'autre part, il existe des

souches capables de produire des *chitinases* et des *glucanases*, qui protègent directement contre les champignons *Alternaria* et *Fusarium*. Il existe également des références sur les souches du genre *Bacillus* capables de prévenir le stress salin et l'agent pathogène *Pseudomonas syringae* DC3000 (Barriuso et autres, 2008  
5 *Phytopathology*), mais aucune sur *Bacillus amyloliquefaciens*. Finalement, il n'existe pas de souche de *Bacillus* ni de *Bacillus amyloliquefaciens* pour moduler la voie de la biosynthèse des *phénylpropanoïdes*, *flavonoïdes* et *anthocyanes*, ce qui augmente la concentration de la polyphénol, plus précisément *flavonols* et en *anthocyanes*.

10 D'autre part, il est bien connu que les extraits de plantes riches en flavonoïdes, anthocyanes et d'autres composés phénoliques, ont un pouvoir antioxydant élevé bénéfique pour la santé. Les extraits des variétés de myrtille ont souvent été cités comme produits sains grâce à leur pouvoir antioxydant, leur prévention neurodégénérative, prévention de la perte de masse osseuse, prévention coronarienne  
15 et leurs effets anticancéreux. Des extraits de fraises, baies sauvages et les espèces commerciales, ont également été associés à une activité hypoglycémique, l'inhibition de *l'adipogenèse*, amélioration des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires, le caractère anti-inflammatoire et la capacité d'induire la satiété et de combattre le surpoids. Un article récent de Lila, M.A (*Functional Foods in Health and Disease*,  
20 *2011, 2:13-24 Page 13 sur 24*), étudie l'impact des bio-flavonoïdes issus de fraises sur les biomarqueurs du syndrome métabolique associés au diabète, surpoids ou l'obésité et les maladies cardiovasculaires.

Dans ce domaine des extraits de plantes bénéfiques pour la santé, deux autres  
25 articles récents de chercheurs de renom, Sharma, Kumar (*Journal of Diabetology*, juin 2011; 2: 4) et Kaume, Howard, Devareddy (*J.10 Agric. Food Chem.* 2012, 60, 5716-5727), reflètent l'état de la technique plus proche du sujet de la présente invention, c'est-à-dire que les fruits de mûre (espèce *Rubus. var Loch Ness*), en raison de leur teneur élevée en composés phénoliques, ont été liés, parmi d'autres fonctions, à  
30 l'activité hypoglycémiant et la capacité à induire de la satiété et lutter contre le surpoids. En effet, l'article de Sharma et Kumar porte sur l'effet antidiabétique d'extraits de fruits de *Rubus ellipticus* sur des souris induites par le diabète à travers *l'aloxane*, bien qu'il soit utile d'indiquer le manque d'études sur des souris saines et des animaux normaux.

35 Ainsi, dans le droit fil de cette recherche, l'équipe inventive a réussi à préparer des extraits méthanoliques de fraises et framboises issus de plantes traitées avec *Bacillus amyloliquefaciens QV15* tout au long du cycle de production biologique. Ces extraits sont caractérisés par leur composition et leur pouvoir antioxydant. Ils ont  
40 démontré une plus grande capacité à inhiber les enzymes alpha-glucosidase, ECA et COX2, ce qui les rend potentiellement utiles dans la préparation des produits

alimentaires et de médicaments visant à prévenir et améliorer des symptômes associés au syndrome métabolique.

5 En effectuant une recherche rétrospective de brevets existant à l'échelle mondiale dans la base de données de production espagnole *Invenet* (SPTO) et dans le reste du monde, via le système Esp@cenet, la conclusion tirée de la consultation de la littérature scientifique est confirmée: bien qu'il existe une référence similaire à une souche de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 (ES 2 336 758 B1), l'absence de brevets relatifs à l'espèce bactérienne *Bacillus amyloliquefaciens* qui permet de stimuler le métabolisme secondaire, en particulier la voie des phénylpropanoïdes, flavonoïdes et anthocyanes. De cette manière, elle est capable de modifier le profil métabolique de la plante et, par conséquent, des bienfaits pour la santé du fruit ou des extraits préparés à partir de cette matière végétale.

15 Après la recherche susmentionnée, il a été constaté qu'il existe des brevets concernant la souche de *Bacillus amyloliquefaciens* publiés à l'échelle mondiale, dont aucun n'est lié à la capacité de moduler le profil métabolique du fruit au niveau des composés phénoliques, dans la voie des flavonoïdes et anthocyanes, cet impact global faisant l'objet de la présente invention. La plupart des brevets font référence à la protection de la culture par la production bactérienne d'enzymes (*glucanases*, *chitinases*, etc.), qui ont un effet protecteur lorsqu'elles sont libérées à l'extérieur de la cellule, au niveau édaphique ou foliaire (mécanisme indirect), et n'impliquent pas le métabolisme de la plante selon cette protection (mécanisme direct).

## 25 INVENTION

L'objet de la présente invention et, compte tenu de l'état de la technique précédent, considéré conforme aux conditions de nouveauté et inventivité requises pour le brevetage, est l'isolement et la caractérisation de la souche bactérienne *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), qui est un microorganisme du groupe des bactéries Gram +, genre *Bacillus*, capable de moduler le métabolisme secondaire et d'améliorer les caractéristiques des extraits de plantes pour les enzymes liées au syndrome métabolique (COX2, ECA et alpha-glucosidase).

35 Les caractéristiques physiologiques et l'analyse génétique de cette souche nous permettent de l'identifier sans équivoque, en la différenciant des autres espèces du genre *Bacillus*.

40 Une fois isolée et caractérisée, avec le code de référence interne L81, différents examens ont été effectués pour révéler la capacité de cette bactérie. Il s'agissait de la production d'auxines, altération du 1-aminocyclopropane-1-carboxylate, solubilisation

du phosphate et production de *sidérophores* et de *chitinases*, qui s'avèrent positifs pour la production de *sidérophores*.

5 Jusqu'à présent, des examens conformes ont été réalisés dans l'inoculation de suspensions bactériennes de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 sur *Arabidopsis thaliana*, améliorant la photosynthèse ( $\phi$ PSII/NPQ), sans affecter la croissance des plantes. Dans ces examens, une augmentation de l'activité de la SOD et une diminution de l'activité de l'APX et du reste des activités de balayage des espèces d'oxygène réactives ont été constatées, ainsi qu'une augmentation modérée des activités de la *glucanase* (PR2) et *chitinase* (PR3) de la plante. Lorsque ces plantes, précédemment  
10 inoculées avec QV15, sont soumises au choc avec la bactérie *Xanthomonas campestris* pv de la tomate, les plantes ont bien résisté à cette attaque, offrant une protection de 60%, associée à une augmentation deux fois plus supérieure que les contrôles des activités PR2 et PR3.

15

Par ailleurs, des essais sur le terrain ont été réalisées sur des plants de mûres (*Rubus var Loch Ness*), framboises (*Rubus idaeus*) et fraises (*Fragaria vesca*) dans des serres de production. Les applications ont été faites avec QV15 au niveau de la racine, de septembre à février, tous les 15 jours, dans des conditions de production de contre-  
20 saison. Une augmentation de la synthèse des composés phénoliques est constatée dans chacun d'entre eux; pour la mûre, cette augmentation est contrôlée sur un niveau de facteurs de transcription stimulant la transcription de MYB6 et de certains gènes de la voie de biosynthèse des *flavonols*.

25 Ces expérimentations réalisés sur différentes espèces de plantes montrent que *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 est capable de moduler le métabolisme secondaire des plantes, ainsi que d'améliorer les caractéristiques des extraits de framboise et fraise, améliorant ainsi l'effet inhibiteur de l'alpha-glucosidase, ECA et COX2 par rapport aux contrôles non-inoculés, et par conséquent, cette bactérie, ou toute molécule dérivée de celle-ci, peut être utilisée dans tout type de culture bactérienne à usage  
30 agronomique, pharmacologique ou nutritionnel, agricole ou forestier, visant l'amélioration des symptômes ou la prévention du syndrome métabolique.

*Bacillus amyloliquefaciens* QV15 peut être appliqué aux plantes de mûres  
35 (*Rubus var Loch Ness*), framboises (*Rubus idaeus*) et fraises (*Fragaria vesca*) en modifiant la teneur en composés phénoliques des feuilles et fruits, en particulier les *flavonols*, dérivés d'*anthocyanines* et de *catéchines*. Dans les feuilles de mûre, il agit au niveau des facteurs de transcription, ainsi que dans certains gènes de la voie de biosynthèse des *flavonols* et *anthocyanes*, et modifie ainsi le profil métabolique  
40 (*flavonols* et dérivés) des feuilles. Concernant les fruits de la mûre, il agit également au niveau des facteurs de transcription et dans certains gènes de la voie de biosynthèse des flavonols et des anthocyanes. Ceci peut être appliqué à toute espèce végétale



appartenant à des baies rouges ou fruits sauvages, tel que la fraise, la framboise, la mûre, la myrtille ou le raisin, afin d'augmenter leur teneur en composés phénoliques à usage pharmacologique, nutritionnel, en particulier la framboise et la fraise, pour améliorer la teneur en anthocyanes et, par conséquent, sa coloration.

5

Les expérimentations susmentionnées concernant l'utilisation de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 en tant que stimulant du métabolisme secondaire des composés phénoliques, en particulier des anthocyanes dans la fraise et la framboise. Afin d'améliorer les extraits sur l'effet de l'alpha-glucosidase, les enzymes ECA et COX2 sont présentées à la fin de cette invention sous la section mode de réalisation.

10

L'objectif ultime de cette invention, qui constitue son avantage technique, est de trouver une bactérie qui stimule le métabolisme secondaire des composés phénoliques des plantes à usage agronomique, pharmacologique et nutritionnel, obtenant un double effet : d'une part, améliorer la teneur des fraises et framboises en anthocyanes et, par conséquent, leur valeur commerciale, et d'autre part, obtenir la matière première végétale source d'extraits améliorés par rapport aux contrôles non inoculés pour leur effet sur l'alpha-glucosidase, et les enzymes ECA et COX2 et, par conséquent, ils peuvent être utilisés pour améliorer les symptômes ou prévenir le syndrome métabolique.

15

20

En conséquence, avec la présente demande de brevet, l'utilisation de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* QV15, ou de toute fraction de celle-ci, est demandée pour son application à tout type d'espèce végétale, faisant partie de toute préparation, individuellement ou en combinaison avec d'autres organismes, afin de stimuler le métabolisme secondaire des composés phénoliques des plantes à usage agronomique, pharmacologique, nutritionnel et améliorer simultanément les extraits obtenus à partir du matériel végétal traité avec la souche, grâce à l'effet de l'alpha-glucosidase, ECA et de COX2.

25

30

Mode de réalisation.

En étudiant la rhizosphère de deux espèces du genre *Pinus*, choisies pour leur intérêt forestier, nous trouvons la souche du genre *Bacillus* qui est examinée ici.

35

La souche a été isolée de la rhizosphère d'une population naturelle de *Pinus pinea* L. Lors de l'isolement de bactéries réalisé sur la rhizosphère de deux espèces de pins (*Pinus pinaster* Aiton et *Pinus pinea* L.) et la mycosphère du champignon mycorhizien associé à tous les deux, Lactaire délicieux (Fries) S.F. Gray, l'automne 2000, qui coïncide avec la période de fructification du Lactaire délicieux, dans la Sierra de Aracena (Huelva, Espagne). À la suite de cet échantillonnage, 720 souches

40

ont été recueillies, y compris *Bacillus amyloliquefaciens* (QV15, code interne de laboratoire). L'isolement de ladite souche a été réalisé sur la gélose nutritive (PCA).

5 Au laboratoire, ce microorganisme est conservé à un taux de survie élevé à 20 % du glycérol dans un bouillon nutritif (*Pronadisa*) à -80 °C ou à 15% glycérol dans l'eau à -20°C et se retrouve facilement dans le milieu de culture utilisé pour l'isolement en phase solide et en phase liquide à 28 °C.

10 Pour la caractérisation de la souche, différents caractères phénotypiques ont été considérés, qui sont détaillés dans cette invention: (i) morphologie de colonies (ii) morphologie des cellules, (iii) séquençage du gène de l'ADN ribosomique correspondant à la sous-unité 16S. iv) séquençage du génome.

15 Caractéristiques morphologiques, biochimiques et génétiques de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15.

20 La description taxonomique de *Bacillus amyloliquefaciens* a été réalisée en identifiant la souche par séquençage partiel de l'ADN ribosomique 16S, sa comparaison avec les séquences de la base de données a révélé 100% d'homologie avec une souche de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Ensuite, la morphologie des colonies est spécifiée à 24 h d'incubation à 28 ° sur la gélose méthodes standard (PCA).

25

TABLEAU 1

	QV15
Taille de la colonie	< 1 mmØ
Forme	circulaire
Bord	lisse
Transparence	Non
Consistance	crémeux
Couleur	Jaune foncé

30 En se développant dans un milieu liquide (*Lennox Pronadisa*), la couleur du milieu passe au jaune foncé de la phase de croissance exponentielle à la phase de croissance stationnaire.

Les caractères morphologiques de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 à 24 h d'incubation à 28° sur la gélose méthodes standard (PCA) correspondent à un bacille à Gram positif sporulé.

- 5            Ensuite, l'analyse génétique de la souche a été réalisée pour l'identification. Pour cela, les étapes suivantes ont été suivies:

#### Extraction d'ADN

- 10           Pour l'extraction de l'ADN, les colonies sont développées pendant 24 heures dans Lennox (*Pronadisa*) à 28 ° C sous agitation. Après ce temps, l'ADN génomique de chaque bactérie a été extrait avec le kit d'isolement d'ADN microbien *Ultraclean*™ (MoBio, CA, USA), conformément aux instructions du fabricant.

- 15           Amplification d'ADNr 16s. -

- Les 1500 pb correspondant à cette zone ont été amplifiés par PCR avec les amorces suivantes: avant 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' et inverse 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3' (Ulrike, 1989) , dans une réaction de 25 µL avec 1X de tampon 10X, 2.5 µM MgCl<sub>2</sub>, 250 µM de chaque DNTP, 2,5 µM d'amorce directe, 2,5 µM d'amorce inverse, 1,25 unité d'ADN polymérase (AmpliTaq Applied) et 100 ng d'ADN bactérien. L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur GeneAmp 2700 (Applied Biosystems) dans les conditions suivantes: 95 ° C 5 minutes, 25 cycles de 94 ° C 30 secondes, 65,5 ° C 30 secondes et 72 ° C 30 secondes, s'achevant avec 7 minutes à 72 ° C. °C

- 25

#### Visualisation du gel

- Le produit de PCR a été ré-résolu sur du gel d'agarose 1% (p/v) dans du tampon Tris-Acétate-EDTA (1% de TAE) avec du bromure d'éthidium (0,5 mg/mL) et visualisé sur un analyseur d'images GelDoc2000™ 170-8126 (Biorad, CA, USA).

- 30

#### Séquençage ADN

- Une fois l'amplification a été vérifiée, le produit de PCR a été purifié avec le kit de purification d'ADN UltraClean™ PCR purification (MoBio, CA, USA), puis séquencé. UNIDAD DE GENÓMICA PARQUE CIENTÍFICO DE MADRID-U.C.M. dans un séquenceur ADI ABI PRIMIS® 377 (Biosystems appliqué, CA, USA).

- 35

#### Analyse informatique de séquence

- 40

Les séquences ont été alignées sur le programme Bioedit Sequence Aligment Editor 5.0.3. ®, examinées, corrigées et analysées manuellement par BLASTN 2.2.6 (Altschul et al., 1997) dans Genbank EMBL et DDBJ (site Web NCBI BLASTR: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), entraînant une homologie la plus élevée: gène de RNA ribosomal de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 16S, séquence complète déposée dans la banque de gènes sous le numéro d'accès AY307364.1

*Bacillus amyloliquefaciens* comme activateur de l'adaptation aux conditions de stress et stimulant du métabolisme primaire et secondaire des composés phénoliques.

Premièrement, expérimentation d'élicitation chez des plantules *d'Arabidopsis thaliana* en inoculant la bactérie deux fois au niveau de la racine, durant les quatrième et cinquième semaines après la germination des graines. Trois jours après la deuxième inoculation, l'agent pathogène (*Xantomonas campestris*) est inoculé au niveau foliaire par pulvérisation d'agents pathogènes. La photosynthèse a été déterminée par la fluorescence (Fo, Fv/Fm, ΦPSII, et NPQ), des activités enzymatiques (cycle d'élimination des ROS et enzymes de défense) et l'indice de maladie relative. Il a été constaté: i) une augmentation de l'activité de la SOD et une diminution de l'APX, ii) une augmentation de l'activité des *glucanases*, des *chitinases* et des cellulases dans le traitement avec l'agent pathogène QV15 +, tandis qu'en QV15, elles maintiennent une activité similaire ou inférieure du contrôle iii) une réduction de la symptomatologie de la maladie provoquée par l'attaque de l'agent pathogène de 63,61%.

Deuxièmement, essai d'élicitation sur des plantes de *Rubus var Loch Ness* en appliquant les bactéries à la racine. Une suspension bactérienne de la souche QV15 a été inoculée à la racine des plantes de *Rubus var Loch Ness* toutes les deux semaines (de septembre 2014 à février 2015) depuis la greffe. La photosynthèse a été déterminée par la fluorescence (Fo, Fv/Fm, ΦPSII et NPQ), activités enzymatiques (cycle ROS et enzymes de défense), feuille bioactive (phénols totaux, *flavonols* et anthocyanes), chlorophylles, à deux étapes d'échantillonnage (floraison et fructification maximale); à la fructification maximale, les paramètres nutritionnels (pH, °Brix et l'acide citrique) ainsi que les composés bioactifs présents dans les fruits ont été déterminés; l'expression génique de la voie des flavonoïdes et des protéines de défense des feuilles et des fruits récoltés lors de la fructification a été examinée; enfin, des mesures ont été effectuées pour les extraits de fruits sur l'inhibition des enzymes liées à la régulation du glucose (alpha-amylase et alpha-glucosidase), l'hypertension (ECA) et l'inflammation (COX2), enzymes liées au syndrome métabolique. Il a été constaté : i) au niveau de la photosynthèse, une augmentation de ΦPSII et une diminution de NPQ, ii) une induction de l'activité de la SOD et une diminution de l'APX, iii) une augmentation de l'activité et de l'expression des protéines de défense (*glucanases* et *chitinases*), tant en floraison qu'en développement, lié à une augmentation de la défense contre les agents pathogènes, et en particulier la moisissure, iv) au niveau des composants bioactifs des

feuilles, une augmentation des phénols est constatée lors de la floraison, bien que les *flavonols* et les anthocyanes ne soient pas altérés, alors que lors la fructification, ils diminuent tous dans les feuilles , v) augmentation de la chlorophylle A, B et totale lors la floraison et la fructification, vi) concernant les fruits, une diminution des phénols a été constatée, alors que les flavonols et les anthocyanes ne sont pas altérés, ce qui indique une modification du métabolisme secondaire vii) pour les fruits de mûre, une augmentation du potentiel antioxydant, viii) augmentation de l'expression génique de la voie des *flavonols* et des *anthocyanes* CHS, F3H, DFR, LAR et GST1 (chez les fruits et les feuilles), les données qui coïncident avec l'analyse des composant bioactifs, et qui suggèrent une déviation de la voie du *flavonole* vers la production de catéchines dans les stades intermédiaires de maturité.

Les extraits ont été préparés à partir de mûres fraîches et de feuilles de la variété "Loch Ness". Pour les extraits utilisés pour mesurer l'effet sur l'*alpha-glucosidase*, l'ECA et la COX2, les mûres ont d'abord été lyophilisées, puis extraites à l'aide du 80% de méthanol, centrifugées et la fraction organique évaporée sous vide. L'extrait à 20% d'eau a été caractérisé; tandis que pour les extraits utilisés pour le reste des mesures, une extraction avec 80% de méthanol a été effectuée. Ainsi, les mesures obtenues pour l'*alpha-glucosidase*, l'ECA et la COX2 seraient en poids sec alors que pour le reste en poids frais.

Pour la caractérisation de l'extrait, les conclusions suivantes ont été tirées:

Le contenu phénolique total de l'extrait est déterminé par la méthode colorimétrique de Singleton V. L., Rossi J.A. (1965) « *Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent* ». Am J Enol Vitic 10 16,144-158, basé sur l'oxydation en milieu de base des groupes hydroxyle des phénols par le réactif de *Folin-Ciocalteu*. Les résultats sont exprimés en mg d'acide gallique /g d'extrait. Ainsi, les extraits obtenus selon les procédés détaillés ci-dessous ont une teneur totale en composés phénoliques minimale de 20 mg/g.

La teneur totale en flavonol de l'extrait est déterminée par la méthode colorimétrique du chlorure d'aluminium de Zishen et al. (1999) Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) « *The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals* ». Food Chem 64: 555-559. Doi: 20 10.1016 / S0308-8146 (98) 00102-2 avec modifications. Elle est exprimée en mg de catéchine par gramme d'extrait frais.

La teneur en anthocyanes totale a été déterminée par la méthode du pH différentiel décrite par Giusti et Wrolstad (2001), Giusti MM, Wrolstad RE (2001) « *Anthocyanins Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy* ». et dans: Wrolstad RE, Acree TE, An H, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz

SJ, Shoemaker CF, Sporns P, Wiley J (ed), « Current Protocols in Food Analytical Chemistry ». New York, pp F121-F129. doi: 10.1002 / 0471142913.faf0102s00, qui évalue l'absorbance différente d'anthocyanines à différents pH. Les résultats sont exprimés en 30 mg de cyanidine-3-glycoside par gramme d'extrait frais.

5

Pour la mesure des activités enzymatiques liées à la défense et au stress oxydatif, les méthodes décrites dans Garcà-Limones, C., Hervás, A., Navas-Cortés, JA, Jiménez-Díz, RM, et Tena, M. (2002) ont été utilisées « *Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea* » (*Cicer arietinum* L.) et *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. « *Physiological and Molecular Plant Pathology* », 61(6), 325–337. Lee, B.-R., Jung, W. J., Lee, B.-H., Avice, J.-C., Ourry, A., & Kim, T. H. (2008). “ *Kinetics of drought-induced pathogenesis-related proteins and its physiological significance in white clover leaves* ». *Physiologia Plantarum*, 132 (3), 329–337. Saravanakumar, D., Lavanya, N., Muthumeena, B., Raguchander, T., Suresh, S., & Samiyappan, R. (2008). “ *Pseudomonas fluorescens enhances resistance and natural enemy population in rice plants against leafhopper pest. Journal of Applied Entomology*”, 132(6), 469–479. Xu, C., Natarajan, S., & Sullivan, J. H. (2008). “ *Impact of solar ultraviolet-B radiation on the antioxidant defense system in soybean lines differing in flavonoid contents. Environmental and Experimental Botany* », 63(1-3), 39–48

Pour les mesures de chlorophylle, la méthode décrite dans Harmut K. Lichtenthaler and Claus Buschmann (2001) a été adoptée. Extraction des tissus photosynthétiques: « *Chlorophylls and Carotenoids. Current Protocols in Food Analytical Chemistry* » F.4.2.1- F.4.2.1.

Troisièmement, essai d'élicitation sur des framboisiers (*Rubus idaeus* var Adelita) en inoculant la bactérie au niveau de la racine toutes les deux semaines, d'octobre 2015 à mai 2016, en analysant les deux productions maximales de framboises (janvier et mai). La photosynthèse a été déterminée par la fluorescence (F<sub>o</sub>, F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>, ΦPSII, et NPQ), des composés bioactifs (phénols, flavonones et anthocyanes) dans les feuilles et les fruits, les valeurs nutritionnelles des fruits (pH, °Brix et% d'acide citrique); Enfin, des extraits de fruits méthanoliques ont été mesurés sur l'inhibition des enzymes liées à la régulation du glucose (*alpha-amylase* et *alpha-glucosidase*), hypertension (ECA) et inflammation (COX2) enzymes liées au syndrome métabolique. Il a été constaté chez les fruits: i) une augmentation de la °Brix, une réduction de la quantité d'acide citrique, ainsi qu'une diminution en pH, ii) une augmentation de la quantité d'anthocyanes, phénols et flavonols, par rapport au contrôle, iii) une augmentation de la capacité des extraits de fruits à inhiber l'*alpha-glucosidase*, ECA et COX2. La teneur en anthocyanes, phénols et flavonols dans les

fruits de plantes inoculées figure au tableau 2; la IC50 de  $\alpha$ -glucosidase et le pourcentage d'inhibition de l'ECA et la COX2 figurent au tableau 3.

5 Tableau 2

	Phénols (mg d'équivalents de gallique/ 100g de poids frais)		Flavonols (mg (+)d'équivalents de catéchine (195)/100g de poids frais)		Anthocyanes (mg cyanidine-3- glycoside Equivalents /100g de poids frais)	
	Hiver	Printemps	Hiver	Printemps	Hiver	Printemps
Régulateur	154.17± 7.7	389.47± 10.0	6.06± 0.24	87.46± 1.18	9.39± 1.27	23.52± 1.5
QV15	248.45± 6.4	379.44± 7.45	11.28± 0.92	77.67± 1.18	4.62± 0.19	21.19± 1.76

10 Tableau 3

	$\alpha$ -Glucosidase (IC50, mg d'extrait sec/ml)		Pourcentage d'inhibition d'ACE 10 mg d'extrait sec/ml]		Pourcentage d'inhibition de COX2 [10 mg d'extrait sec/ml ]	
	Hiver	Printemps	Hiver	Printemps	Hiver	Printemps
Régulateur	3.80± 0.16	4.66± 0.05	92.15± 0.04	91.180.02	29.59± 0.87	29.02± 0.25
QV15	3.32± 0.04	3.36± 0.22	91.88± 0.01	92.09± 0.07	32.24± 0.88	32.40± 0.49

L'extrait de framboise a été préparé à partir de framboises fraîches de la variété "Adelita". Pour les extraits utilisés pour mesurer l'impact sur l' $\alpha$ -glucosidase, ECA et COX2, les mûres ont d'abord été lyophilisées, puis extraites à l'aide de 80% de méthanol, centrifugées et la fraction organique évaporée sous vide. L'extrait à 20% d'eau a été caractérisé; tandis que pour les extraits utilisés pour le reste des mesures, une extraction avec 80% de méthanol a été réalisée. Ainsi, les mesures obtenues pour  $\alpha$ -glucosidase, ECA et COX2 seraient en poids sec alors que pour le reste en poids frais.

Pour la caractérisation de l'extrait, les conclusions suivantes ont été tirées:

Le contenu phénolique total de l'extrait est déterminé par la méthode colorimétrique de Singleton V. L., Rossi J.A. (1965) « *Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent* ». Am J Enol Vitic 10 16,144-158, basé sur l'oxydation en milieu de base des groupes hydroxyle des phénols par le réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats sont exprimés en mg d'acide gallique /g d'extrait. Ainsi, les extraits obtenus selon les procédés détaillés ci-dessous ont une teneur totale en composés phénoliques minimale de 20 mg/g.

La teneur totale en flavonol de l'extrait est déterminée par la méthode colorimétrique du chlorure d'aluminium de Zishen et al. (1999) Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) « *The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals* ». Food Chem 64: 555-559. Doi: 20 10.1016 / S0308-8146 (98) 00102-2 avec modifications. elle est exprimée en mg de catéchine par gramme d'extrait frais.

La teneur en anthocyanes totale a été déterminée par la méthode du pH différentiel décrite par Giusti et Wrolstad (2001), Giusti MM, Wrolstad RE (2001 « *Anthocyanins Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy* ». et dans: Wrolstad RE, Acree TE, An H, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Sporns P, Wiley J (ed), « *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* ». New York, pp F121-F129. doi: 10.1002 / 0471142913.faf0102s00, qui évalue l'absorbance différente d'anthocyanines à différents pH. Les résultats sont exprimés en 30 mg de cyanidine-3-glycoside par gramme d'extrait frais.

Quatrièmement. Essaie d'élicitation sur des plants de fraises (*Fragaria vesca var Fortuna*) en inoculant après la transplantation toutes les deux semaines au niveau de la racine tout au long du cycle de la plante (janvier à mai 2016). La photosynthèse a été déterminée par la fluorescence (Fo, Fv / Fm, ΦPSII, et NPQ), au milieu du cycle de production (mars 2016) et à la fin (mai 2016), des composés bioactifs (phénols, flavonols et anthocyanes) et les valeurs nutritionnelles (pH, °Brix et pourcentage d'acide citrique) chez les fruits ont été déterminées en deux étapes ; Enfin, des extraits de fruits méthanoliques ont été mesurés sur l'inhibition des enzymes liées à la régulation du glucose (*alpha-amylase* et *alpha-glucosidase*), l'hypertension (ECA) et l'inflammation (COX2), enzymes liées au syndrome métabolique. Il a été constaté: i) au niveau de la photosynthèse, une diminution de Fo et de NPQ, il semble que la plante est moins stressée que le contrôle et perd moins d'énergie de la photosynthèse sous forme de chaleur, elle sera donc utilisée pour la production de métabolites primaires ou secondaires ii) une augmentation des anthocyanes, iii) une augmentation du °Brix, iv) une diminution des fruits putréfiés et augmentation des fruits de première qualité, v) une augmentation des caractéristiques des extraits de fruits sur l'alpha



glucosidase, ECA et COX2. La teneur en anthocyanes, phénols et flavonols chez les fruits de plantes inoculées figure au tableau 4; la IC50 de  $\alpha$ -glucosidase et le pourcentage d'inhibition d'ACE et COX2 figurent au tableau 5.

5

Tableau 4

	Phénols (mg d'équivalents de gallique/ 100g de poids frais)		Flavonols (mg (+)d'équivalents de catéchine (195)/100g de poids frais)		Anthocyanes (mg cyanidine-3- glycoside Equivalents /100g de poids frais)	
	Hiver	Printemps	Hiver	Printemps	Hiver	Printemps
Contrôle	315.79± 6.86	188.24± 2.74	80.15± 0.37	38.40± 0.49	17.24± 1.62	21.19± 5.61
QV15	315.79± 22.41	202.50± 2.75	59.38± 1.35	29.30± 0.55	39.11± 0.19	20.28± 2.6

Tableau 5

	$\alpha$ -Glucosidase (IC50, mg d'extrait sec/ml)		Pourcentage d'inhibition d'ACE 10 mg d'extrait sec/ml]		Pourcentage d'inhibition de COX2 [10 mg d'extrait sec/ml l]	
	Hiver	Printemps	Hiver	Printemps	Hiver	Printemps
Contrôle	11.56± 1.05	8.27± 0.43	95.2± 0.06	99.06± 0.02	35.39± 0.21	33.76± 0.32
QV15	9.99± 0.1	10.04± 0.56	92.41± 0.01	91.98± 0.14	36.61± 1.15	34.12± 0.55

10

L'extrait de fraise a été préparé à partir de fraises fraîches de la variété "Fortuna". Pour les extraits utilisés pour mesurer l'impact sur l' $\alpha$ -glucosidase, ECA et COX2, les mûres ont d'abord été lyophilisées, puis extraites à l'aide de 80% du méthanol, centrifugées et la fraction organique évaporée sous vide. L'extrait à 20% d'eau a été caractérisé; tandis que pour les extraits utilisés pour le reste des mesures, une extraction avec 80% de méthanol a été effectuée. Ainsi, les mesures obtenues pour l' $\alpha$ -glucosidase, ACE et COX2 seraient en poids sec alors que pour le reste en poids frais.

20

Cinquièmement. Essai d'élicitation sur des plants de fraises (*Fragaria vesca* var *Fortuna*) en inoculant toutes les deux semaines après la transplantation au niveau

des racines tout au long du cycle de la plante (octobre à mars 2017). La photosynthèse a été déterminée par la fluorescence (Fo, Fv/Fm, ΦPSII et NPQ) au milieu du cycle de production (mars 2017) et à la fin du cycle (mars 2017), les composés bioactifs (phénols, flavonols et anthocyanes), les valeurs nutritionnelles (pH, °Brix et  
5 pourcentage d'acide citrique) ainsi que la taille du fruit ont été déterminés. Il a été constaté: i) une augmentation de la quantité de fruits plus gros après les inoculations; ii) augmentation des anthocyanes, iii) augmentation des flavonols, iv) une diminution du pourcentage d'acide citrique.

10 L'extrait de fraise a été préparé à partir de fraises fraîches de la variété "Fortuna". Une extraction avec 80% de méthanol a été effectuée.

### Applicabilité industrielle

15

Étant donné les caractéristiques susmentionnées de *Bacillus amyloliquefaciens* QVI5 en tant que stimulateur du métabolisme secondaire, cette souche bactérienne a une application spécifique dans les industries agroalimentaire, chimique et pharmaceutique, pouvant être utilisée dans le cadre de toute préparation  
20 (individuellement ou en association avec d'autres micro-organismes) et en le mettant en contact (avec la souche ou une partie de celle-ci) avec la graine, la racine ou le système aérien des plantes par tout moyen disponible, sur une espèce de plante ou une culture *in vitro*, afin d'augmenter la concentration de métabolites secondaires de nature phénolique ayant un usage pharmacologique et /ou nutritionnel, améliorer la  
25 couleur des framboises et des fraises lors de la production de contre-saison, notamment due à l'augmentation des anthocyanes; et obtenir des extraits améliorés grâce à leur capacité à inhiber les enzymes *alpha-glucosidase*, ECA et COX2.

### Revendications

- 1-*Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), un microorganisme du groupe des bactéries Gram + et genre *Bacillus*, caractérisé par sa capacité à stimuler le métabolisme secondaire des composés phénoliques chez les espèces végétales, à savoir les flavonoïdes, les anthocyanes, les catéchines, ainsi que sa capacité à augmenter les valeurs Brix.
2. *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), selon la revendication 1, il/elle est caractérisé par sa capacité à augmenter la teneur en anthocyanes des fruits de la fraise et framboise.
3. *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), un microorganisme du groupe des bactéries Gram +, genre *Bacillus*, caractérisé par sa capacité à renforcer les caractéristiques des extraits de framboise et de fraise en tant qu'inhibiteurs d'enzymes liées au syndrome métabolique: *alpha-glucosidase*, régulateurs de la glycémie, ECA, enzyme de conversion d'angiotensine pour l'hypertension et la COX2, inflammation.
4. Utilisation de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), ou de toute molécule dérivée de celle-ci, selon les revendications 1 à 3, pour l'appliquer à tout type de culture à usage agricole, pharmacologique ou nutritionnel, dans le secteur agricole ou forestier, afin d'augmenter les bioactifs et /ou améliorer les extraits de feuille et /ou de fruit pour leur effet sur l'*alpha-glucosidase*, ECA et COX2.
5. Utilisation de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), ou de toute molécule dérivée de celle-ci, selon les revendications 1 à 4, pour l'application sur toute espèce végétale appartenant à la famille d'espèce *Rubus*.
6. Utilisation de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), ou de toute molécule dérivée de celle-ci, selon les revendications 4 à 5, pour une application sur toute espèce végétale appartenant à des baies rouges ou des fruits sauvages (tels que fraises, framboises, mûres, myrtilles) ou de raisins, afin d'améliorer les caractéristiques organoleptiques et la coloration des fruits, en particulier des anthocyanes.
7. Utilisation de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), ou de toute molécule dérivée de celle-ci, selon les revendications 1 à 6, soit la souche individuelle ou en combinaison avec d'autres organismes, faisant partie de toute préparation, individuellement ou en association avec un autre organisme, et par tout moyen disponible par lequel la bactérie entre en contact avec la graine, la racine ou le système aérien des plantes.
8. Utilisation de *Bacillus amyloliquefaciens* QV15 (CECT 9371), ou de toute molécule dérivée de celle-ci, selon les revendications 1 à 6, soit la souche individuelle ou en

combinaison avec d'autres organismes, faisant partie de toute préparation, individuellement ou en association avec un autre organisme, et par tout moyen disponible par lequel la bactérie entre en contact avec les cellules végétales dans n'importe quel état de différenciation dans une culture *in vitro*.

5

**RAPPORT DE RECHERCHE  
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**  
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la  
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée  
par la loi 23-13)

<b>Renseignements relatifs à la demande</b>	
N° de la demande : 47663	Date de dépôt : 22/05/2018
Déposant : FUNDACION UNIVERSITARIA SAN PABLO	Date d'entrée en phase nationale : 17/12/2019
	Date de priorité: 21/06/2017
Intitulé de l'invention : BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS QV15 STIMULANT DU MÉTABOLISME SECONDAIRE POUR LE MÉTABOLISME SECONDAIRE DES COMPOSES PHENOLIQUES ET LA CAPACITÉ INHIBITRICE D'EXTRAIT DE FRAMBOISES ET FRAISES POUR LES ENZYMES LIÉES AU SYNDROME METABOLIQUE.	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site <a href="http://worldwide.espacenet.com">http://worldwide.espacenet.com</a> , et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y a lieu.	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport	
<input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de forme et de clarté	
<input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention	
<input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
Examineur: BRINI Abdelaziz	Date d'établissement du rapport : 24/04/2020
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	



**Partie 1 : Considérations générales****Cadre 1 : base du présent rapport**

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description  
15 Pages
- Revendications  
8

**Partie 2 : Rapport de recherche**

Classement de l'objet de la demande :

CIB : A01N63/02, C05F11/08, C12N1/20

CPC : A01N63/02, C05F11/08, C12N1/20

Plateformes et bases de données électroniques de recherche :

EPOQUENET, WPI, ScienceDirect,

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
A	ABDELHI DIHAZI et al « Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused by <i>Fusarium oxysporum</i> in date palm ( <i>Phoenix dactylifera</i> L) seedlings » ; Plant Physiology and Biochemistry Volume 55, June 2012, Pages 7-15	1-8
A	María Laura Tonelli et al « Peanut priming induced by biocontrol agents ». Physiological and Molecular Plant Pathology Volume 75, Issue 3, January 2011, Pages 100-105	1-8
A	US2016183537 ; FMC CORP [US] ; 30-06-2016 Document en entier	1-8

**\*Catégories spéciales de documents cités :**

-« 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  
-« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent  
-« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs  
-« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

**Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité****Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

Nouveauté	Revendications 1-8	Oui
	Revendications aucune	Non
Activité inventive	Revendications 1-8	Oui
	Revendications aucune	Non
Application Industrielle	Revendications 1-8	Oui
	Revendications aucune	Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

- D1 : ABDELHI DIHAZI et al. « Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused by Fusarium oxysporum in date palm (Phoenix dactylifera L) seedlings » ;  
D2 : Maria Laura Tonelli et al. « Peanut priming induced by biocontrol agents »  
D3 : US2016183537

**1. Nouveauté**

Aucun des documents susmentionnés ne décrit les mêmes caractéristiques techniques telles que décrites dans les revendications 1-8, d'où celles-ci sont nouvelles conformément à l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

**2. Activité inventive**

Le document D1 qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 décrit l'utilisation de deux types de bactéries bacillus Amylolyquefaciens et birkholderia cepacia pour la détermination d'effet inhibiteur contre les maladies causées par fusarium oxysporum sur le palmier dattier (voir page 8 colonne gauche paragraphe 4). L'activation du métabolisme phénolique a été étudiée et ainsi a été observée que le contenu en composés phénoliques solubles a été augmenté dans les racines infiltrées par le bacillus Amylolyquefaciens et inoculées par le pathogène (voir page 9 colonne de gauche section 2.3.3).

L'objet de la revendication 1 diffère de D1 en ce que la souche de Bacillus Amylolyquefaciens est une souche différente.

Le problème que la présente demande se propose de résoudre peut être considéré comme étant la stimulation du métabolisme secondaire des composés phénoliques et l'augmentation des valeurs Brix.

La solution proposée n'est pas évidente pour la raison suivante :

Partant des documents de l'art antérieur D1-D3, l'homme du métier ne trouve aucune incitation qui lui permette d'utiliser ladite souche afin de parvenir à la solution désirée. Par conséquent, l'objet de la revendication 1 implique une activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Les revendications 2-8 satisfont donc en tant que telles aux exigences en ce qui concerne l'activité

inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

### **3. Application industrielle**

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.