



HAL
open science

Utilisation d'un extrait naturel de marc de raisin pour stimuler les défenses naturelles de plantes

Claire Richard, Alexandra ter Halle, Pascale P. Goupil, Gérard G. Ledoigt, Eyheraguibel Boris, Denis D. Thiery

► To cite this version:

Claire Richard, Alexandra ter Halle, Pascale P. Goupil, Gérard G. Ledoigt, Eyheraguibel Boris, et al.. Utilisation d'un extrait naturel de marc de raisin pour stimuler les défenses naturelles de plantes. N° de brevet: 1055397. 2010, 21 p. hal-02817704

HAL Id: hal-02817704

<https://hal.inrae.fr/hal-02817704>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : 2 962 007

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : 10 55397

⑤1 Int Cl⁸ : A 01 N 65/00 (2006.01), A 01 P 15/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 02.07.10.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 06.01.12 Bulletin 12/01.

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) : CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS Etablissement
public — FR, UNIVERSITE BLAISE PASCAL
CLERMONT FERRAND II Etablissement public — FR
et INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRO-
NOMIQUE Société anonyme — FR.

⑦2 Inventeur(s) : RICHARD CLAIRE, TER HALLE
ALEXANDRA, GOUPIL PASCALE, LEDOIGT
GERARD, EYRHAGUIBEL BORIS et THIERY DENIS.

⑦3 Titulaire(s) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHER-
CHE SCIENTIFIQUE - CNRS Etablissement public, UNI-
VERSITE BLAISE PASCAL CLERMONT FERRAND II
Etablissement public, INSTITUT NATIONAL DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE Société anonyme.

⑦4 Mandataire(s) : CABINET PLASSERAUD.

⑤4 UTILISATION D'UN EXTRAIT NATUREL DE MARC DE RAISIN POUR STIMULER LES DEFENSES
NATURELLES DE PLANTES.

⑤7 Utilisation d'un extrait de marc de raisin pour stimuler
les défenses naturelles de plantes.

FR 2 962 007 - A1



**UTILISATION D'UN EXTRAIT NATUREL DE MARC DE RAISIN POUR
STIMULER LES DEFENSES NATURELLES DE PLANTES.**

5 L'augmentation des rendements est au cœur des préoccupations des agriculteurs. Or, le rendement dépend grandement du bon développement de la plante et par conséquent de sa croissance, ainsi que de sa bonne santé.

La croissance des plantes est directement liée à
10 l'absorption et à l'assimilation d'éléments minéraux ainsi qu'aux flux hormonaux régissant l'allongement et la différenciation des tissus végétaux. Par conséquent, les nutriments et hormones jouent un rôle essentiel dans la croissance des plantes. Du fait de leur incapacité à se
15 déplacer, les plantes ont mis en place des mécanismes actifs et activables leur permettant d'utiliser au mieux les ressources présentes pour favoriser leur croissance. Afin d'augmenter cette croissance, des engrais sont utilisés. Il est également possible d'utiliser d'autres
20 molécules, souvent glucidiques, extraites d'algues pour favoriser la croissance.

L'intégrité des plantes est également une condition indispensable pour assurer le rendement. Or, les plantes sont perpétuellement soumises à l'agression par des
25 microorganismes pathogènes. La mise en place des défenses est donc un élément déterminant dans l'efficacité de la résistance.

Conventionnellement, il est utilisé de façon massive des produits phytopharmaceutiques potentiellement toxiques
30 pour lutter contre l'attaque des pathogènes.

Les produits issus de l'industrie agro-pharmaceutiques (fongicide, insecticides) commercialisés par les firmes d'Agrochimie présentent un impact important pour

l'environnement avec de potentielles toxicités pour l'homme.

L'induction artificielle des mécanismes de défense des plantes vis-à-vis des parasites est au centre de nombreuses recherches. La première voie de recherche a consisté à
5 trouver des molécules mimant l'action de l'acide salicylique capable d'induire à lui seul une immunité mais insuffisamment toléré par certaines plantes. Un analogue chimique de l'acide salicylique, l'INA (ou acide 2,6-
10 dichloroisonicotinique) ou d'autres éliciteurs de synthèse ont été mis au point : le benzothiadiazole (BTH commercialisé par la société SYNGENTA sous la marque BION®) et l'acide β -aminobutyrique (BABA®-Sigma Aldrich) mieux tolérés par les plantes de cultures.

15 La deuxième voie a consisté à rechercher des molécules naturelles (oligosaccharides, protéines enzymatiques, polypeptides) capables d'induire à elles seules les mécanismes de défense des plantes.

Des extraits fongiques issus de *Fusarium*
20 (WO/2002/24869) et de *Trichoderma* (WO/2006/129998) ont montré des propriétés de stimulateur de défenses naturelles des plantes.

Des extraits de microorganismes issus d'*Erwinia*
(WO/1998/37752, WO/1999/07206), de *Xanthomonas*
25 (WO/2000/20616), d'*Agrobacterium* (WO/2000/28056), de *Cladosporium* (WO/2002/02787), de bactéries Gram+ (WO/1999/11133), de *Pseudomonas* (WO/1999/07207, WO/2003/068912) présentent la capacité d'induire les défenses naturelles des plantes (Varnier 2009). Des
30 extraits d'insectes, de crustacés contenant des β -1,3-glucans (chitosan) ont montré des propriétés de stimulateur de défenses naturelles des plantes (Klarzynski 2000). La formulation ELEXA® (SAFE SCIENCE), dont le

principe actif est le chitosane, est commercialisée comme éliciteur (Sharathchandra 2004).

Des extraits de levure présentent des propriétés de stimulateur de défenses naturelles des plantes
5 (A1/2009/0010905)

Des extraits d'algues brunes contenant un oligosaccharide nommé laminarine induisent les réactions de défense des plantes (Aziz 2003, EP 1338200 et WO/2005/082150). La société GOEMAR commercialise les
10 formulations « Iodus® 2 céréales » et « Iodus 2 Cultures spécialisées » dont le principe actif est la laminarine.

De nombreux extraits de plantes présentent des propriétés de stimulateur de défenses. Des extraits de graines de fenugrec (*Trigonella foenum greacum*) permettent
15 d'activer les réactions de défense (WO02102162 et WO0410786). La formulation STIFENIA (SOFT) est commercialisée comme éliciteur naturel.

Des extraits aqueux de feuilles de neem (*Azadirachta indica Juss*) contenant des tetranortriterpenoïdes (Paul
20 2002), des extraits éthanoliques de feuilles de renouée (*Reynoutria sachalinensis*) (Daayf 1997 ; Randoux 2006), des extraits de feuilles de bougainvilliers (Narwal 2000), de rhubarbe et d'épinard (Doubrava 1988) ont montré un effet éliciteur des réactions de défenses de la plante. La
25 formulation MILSANA (SCHAETTE) contenant des extraits de Renouée est commercialisée comme éliciteur naturel.

Des extraits de racine de rhubarbe (*Rheum palmatum*) et d'écorces de bourdaine (*Frangula alnus*) présentent un potentiel d'élicitation des mécanismes de défense de la
30 vigne (Godard 2009).

D'autres formulations à base d'extrait de plantes sont en attente d'une autorisation de vente en tant qu'éliciteurs : Pireco (mélange de 11 extraits de plantes dont soja et d'algues marines) de la société TEAM GREEN ;

Echo Protect (mélange d'extraits naturels de plantes dont ortie, ail).

L'efficacité de ces formulations est souvent partielle, spécifique à certaines variétés de plantes, ou
5 au stade de développement. Elles doivent être associées le plus souvent à des traitements chimiques. De plus, certains composés ne provoquent pas une résistance plusieurs fois de suite (extraits de plantes de fénugrec) ; une seule pulvérisation est possible. Leur action préventive et/ou
10 curative peut être limitée dans le temps.

Il existe donc un besoin en une composition respectueuse de l'environnement et respectueuse des plantes auxquelles elle est destinée, qui stimule leur système de défense contre les pathogènes. Les présents inventeurs ont
15 trouvé qu'un extrait naturel de marc de raisin présentait une telle activité. L'extrait proposé a donc la capacité de stimuler les mécanismes de défenses de plantes traitées.

Ainsi, l'invention porte sur l'utilisation d'un extrait de marc de raisin pour stimuler les défenses
20 naturelles de plantes.

L'extrait de marc de raisin dont l'utilisation est proposée permet d'induire l'expression des gènes de défense, c'est-à-dire de stimuler les défenses naturelles des plantes. De ce fait, il présente des propriétés
25 d'élicitation.

Selon un mode de réalisation, l'extrait de marc de raisin, dont l'utilisation fait l'objet de la présente invention, comprend des composés naturels synthétisés par le raisin lui-même dont la culture est largement répandue
30 et obtenus par un procédé traditionnel (non industriel). Ces composés ont donc beaucoup plus de chance d'être bien tolérés et de présenter des effets non toxiques. Ces composés naturels peuvent enfin être utilisés en agriculture biologique.

Ces composés naturels sont notamment des polyphénols et des anthocyanes. L'extrait utilisé selon l'invention peut contenir plus de 70% en poids par rapport à son poids sec de polyphénols. L'extrait peut également comprendre plus de 8% en poids d'anthocyanes par rapport au poids sec de l'extrait.

L'extrait de marc de raisin utilisé selon l'invention peut être préparé à partir de marc rouge auquel on ajoute de l'eau et on fait subir une centrifugation, le produit de la centrifugation est ensuite soumis à une extraction dans un mélange eau-éthanol comprenant moins de 30% v/v d'éthanol, puis est concentré sous vide et atomisé sans support de séchage, de façon à obtenir une poudre. Le procédé est conduit en présence de SO₂, sans ajout d'aucun additif. Le sulfite ajouté dans l'eau de diffusion, à hauteur d'environ 1g/l a pour rôle de solubiliser les anthocyanes et limiter leur oxydation.

Les composés naturels présents dans l'extrait de marc de raisin sont des composés faciles à extraire, peu coûteux, hydrosolubles donc faciles d'emploi (dilution aisée. Ils peuvent améliorer les propriétés des formulants accompagnant les matières actives de par leur rôle photoprotecteur.

L'utilisation selon l'invention est tout à fait appropriée pour les plantes choisies dans le groupe comprenant les plantes agronomiquement utiles et les plantes ornementales.

Les plantes agronomiquement utiles sont choisies dans le groupe des Angiospermes comprenant les Apiacées, les Astéracées, les Brassicacées, les Chénopodiacées, les Convolvulacées, les Cucurbitacées, les Fabacées, les Liliacées, les Polygonacées, les Rosacées, les Solanacées, les Poacées, les Vitacées.

L'invention porte également sur un procédé pour stimuler les défenses naturelles de plantes, qui comprend l'application d'une composition comprenant un extrait de marc de raisin sur lesdites plantes.

5 La composition mise en œuvre dans le procédé selon l'invention comprend, comme produit actif, un extrait hydroalcoolique de marc de raisin. L'extrait de marc de raisin comprend plus de 45%, de préférence plus de 70% en poids de polyphénols par rapport au poids sec de l'extrait.

10 L'extrait comprend plus de 0,5%, de préférence plus de 8% en poids d'anthocyanes par rapport au poids sec de l'extrait. L'extrait de marc de raisin est avantageusement obtenu selon le procédé décrit précédemment.

La composition mise en œuvre dans le procédé selon
15 l'invention peut se présenter sous forme de poudre ou sous forme liquide.

Lorsque la composition se présente sous la forme de poudre, elle est dépourvue de tout autre agent actif.

Elle peut également être dépourvue de tout adjuvant
20 non naturel.

Selon un mode de réalisation particulier du procédé selon l'invention, la composition est une composition aqueuse qui est appliquée par pulvérisation foliaire ou par infiltration.

25 La concentration en extrait de marc de raisin dans la composition mise en œuvre dans le procédé selon l'invention est comprise entre 0,10 g/L et 10g/L, de préférence entre 0,3 g/L et 2,5 g/L, plus préférentiellement encore entre 0,5 g/L et 1,25 g/L, pour une application par pulvérisation
30 en vue de favoriser les défenses naturelles des plantes. Une seule application avant l'attaque des agents pathogènes peut suffire. Cependant, il peut s'avérer parfois nécessaire de faire au moins une nouvelle application plusieurs jours ou plusieurs semaines après la première.

La composition est appliquée à raison de 0,1 à 2,0 kg/ha, de préférence de 0,3 à 1,5 kg/ha de cultures à traiter pour favoriser les défenses naturelles.

Les doses d'application et les modalités d'application
5 dépendent bien entendu de l'espèce de plantes à traiter, et de son stade de développement.

Le procédé selon l'invention peut être mis en œuvre sur des plantes agronomiquement utiles et les plantes
ornementales. De telles plantes sont celles mentionnées
10 ci-dessus en lien avec l'utilisation.

L'infiltration d'un extrait de marc de raisin à une concentration de 0,25% sur les feuilles de tabac, induit une réponse d'hypersensibilité (locale) accompagnée d'une
réponse de résistance systémique (SAR : Systemic Acquired
15 Resistance), traduisant l'effet éliciteur de l'extrait, effet caractéristique de l'induction d'une immunité vis-à-vis de pathogènes. Cet effet éliciteur a été démontré au niveau moléculaire par l'analyse de l'expression de gènes marqueurs de la réponse SAR (*pr1* et *pr2*).

20 L'utilisation de cet extrait permettra la diminution de la quantité de pesticides utilisés pour protéger les plantes des agents pathogènes. En culture biologique, l'utilisation de cet extrait permettra une diminution des pesticides.

25 L'invention va être décrite de façon plus détaillée ci-dessous à l'aide des exemples suivants qui sont donnés à titre d'illustration uniquement.

Les expériences ont été conduites sur les transcrits isolés à partir de plantes traitées par l'extrait de marc
30 de raisin, de plantes traitées par l'acide salicylique (SA) (témoin positif, le SA est un éliciteur connu dans la réponse SAR) et de plantes pulvérisées sans éliciteur (témoin eau négatif). L'expression des gènes PR est analysée par PCR semi-quantitative en temps réel permettant

l'amplification des transcrits d'intérêt. Les résultats démontrent une accumulation, des transcrits chez les plantes traitées avec les extraits, ce qui suggère une réponse de type éliciteur de nos extraits végétaux.

5 EXEMPLES

Dans les exemples suivants, on utilise comme extrait de marc de raisin, le produit commercialisé par la société GRAP'SUD sous la marque exGrape® Anthocyanins. Ce produit présente les caractéristiques suivantes :

- 10 - poudre légèrement granulée rouge foncé
- polyphénols totaux :
 (en équivalent catéchine) DO 280 nm : $\geq 70\%$
 (en équivalent acide gallique) FOLIN CIOCALTEU : $\geq 60\%$
- procyanidines :
15 (en équivalent catéchine) Méthode de la vanilline : $\geq 5\%$
- anthocyanes :
 Décoloration au disulfite : $\geq 8\%$
 Ce produit est appelé dans les exemples "EXTRAIT".

Exemple 1 - Elicitation sur feuilles de tabac

20 Sur des plants de tabac, au stade 10-12 feuilles (4-5 semaines), on infiltre sur les feuilles de l'EXTRAIT à 0,25% (p/v).

 Une photographie des feuilles est prise juste après l'infiltration (figure 1a), puis 4 jours après
25 l'infiltration (figure 1b). Quatre jours après l'infiltration, on observe les réponses d'hypersensibilité sur les feuilles qui ont été piquées.

 On réalise un témoin acide salicylique (2mM) et on analyse la réponse SAR par PCR en temps réel.

30 On obtient les résultats présentés sur les figures 2, 3 et 4.

 Ces résultats démontrent une accumulation de transcrits chez les plants traités avec les extraits, dans les feuilles infiltrées ou pulvérisées et les feuilles non

pulvérisées ou non infiltrées du même plant traité, ce qui suggère une réponse de type éliciteur de l'EXTRAIT.

Cet effet éliciteur a été démontré au niveau moléculaire par l'analyse de l'expression de gènes
5 marqueurs de la réponse SAR (*pr1* et *pr2*).

L'analyse moléculaire a consisté à extraire les ARN totaux à partir de feuilles de tabac traitées en utilisant le kit d'extraction Tri-reagent (Euromedex). L'intégrité des ARN extraits est vérifiée par électrophorèse en gel
10 d'agarose. La reverse transcriptase (RT) Euroscript (Eurogentec) est utilisée pour la synthèse des ADN complémentaires. Des amorces (oligonucléotides de 20 à 24 mers) spécifiques des gènes *pr1* et *pr2* ont permis l'amplification des ADNc correspondants par Polymérase
15 Chain Reaction (PCR). L'amplification est suivie en temps réel (PCR en temps réel) basée sur la fluorescence émise par les produits d'amplification en présence de SYBR Green. Les fragments de RT-PCR spécifiques de *pr1* et *pr2* sont quantifiés en utilisant le logiciel iQv3 (BIO-RAD).
20 L'abondance des transcrits *pr1* et *pr2* est normalisée (Quantité Relative) à ceux d'un gène d'expression constitutive, codant l'actine ou le facteur d'élongation alpha.

Exemple 2

25 Les mêmes essais sont reproduits avec différentes concentrations en EXTRAIT : 2,5 g/L, 1,25 g/L, 0,625 g/L, 0,312 g/L et 0,156 g/L et différentes quantités pulvérisées par feuille et par plant. Ceci afin de déterminer la quantité finale permettant l'élicitation.

Les quantités mises en œuvre sont présentées dans le tableau suivant et les résultats sont donnés sur la figure 5.

Dilution à partir de la solution mère d'EXTRAIT à 1%	X4	X8	X16	X32	X64
Concentration en EXTRAIT	2,5g/L	1,25g/L	0,625g/L	0,312g/L	0,156g/L
Quantité pulvérisée/feuille	5mg	2,5mg	1,25mg	0,625mg	0,312mg
Quantité pulvérisée/plant	15mg	7,5mg	3,75mg	1,875mg	0,936mg

Références

- Aziz et al. (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *MPMI*, 16(12):1118-1128.
- 5 Daayf, F., Schmitt, A., Belanger, R.R., 1997. Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Plant Physiol* 113, 719-727.
- 10 Doubrava, N.S., Dean, R.A., Kuc, J., 1988. Induction of systemic resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum lagenarium* in cucumber by oxalate and extracts from spinach and rhubarb leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 33, 69-79.
- 15 Klarzynski et al. (2000). Linear β -1,3-glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant physiol.* 124:1027-1037.
- 20 Godard et al. (2009). Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthroquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant physiology and biochemistry*, 47, 827-837.
- Narwal et al. (2000) A systemic resistance inducing antiviral protein with N-glycosidase activity from *Bougainvillea xbuttiana* leaves. *Indian J. Exp. Biol.* 39, 600-603.
- 25 Paul et Sharma (2002) *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in barley against leaf stripe disease. *Physiological and molecular plant pathology*, 61, 3-13.
- 30 Randoux et al. (2006) Inhibition of *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* germination and partial enhancement of wheat defenses by Milsana. *Biochemistry and Cell biology*, 96, 1278-1286.
- Sharathchandra et al. (2004) A chitosan formulation Elexa™ induced downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. *Crop protection*, 23:881-888.

Tosun et al. (2003) The effect of HarpinEa as plant activator in control of bacterial and fungal diseases of tomato. Congrès Acta horticulturae. 2003 , no 616, pp. 251-254

- 5 Varnier et al. (2009) Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant, cell and Environment*, 32,178-193.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un extrait de marc de raisin pour stimuler les défenses naturelles de plantes.
- 5 2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée par le fait que l'extrait comprend plus de 45%, de préférence plus de 70% en poids de polyphénols par rapport au poids sec de l'extrait.
- 10 3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée par le fait que l'extrait comprend plus de 0,5%, de préférence plus de 8% en poids d'anthocyanes par rapport au poids sec de l'extrait.
- 15 4. Utilisation selon la revendication 1, selon laquelle l'extrait est un extrait hydroalcoolique de marc de raisin ou un extrait obtenu par extraction à l'eau sulfitée.
- 20 5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée par le fait que les plantes sont choisies dans le groupe comprenant les plantes agronomiquement utiles et les plantes ornementales.
- 25 6. Procédé pour stimuler les défenses naturelles des plantes, qui comprend l'application d'une composition comprenant un extrait de marc de raisin sur lesdites plantes.
- 30 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que l'extrait comprend plus de 45%, de préférence plus de 70% en poids de polyphénols par rapport au poids sec de l'extrait.
8. Procédé selon la revendication 6 ou 7, caractérisé par le fait que l'extrait comprend plus de 0,5%, de préférence plus de 8% en poids d'anthocyanes par rapport au poids sec de l'extrait.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisé par le fait que la composition est une

composition aqueuse qui est appliquée par pulvérisation foliaire ou infiltration.

1/3



Fig. 1a



Fig. 1b

2/3

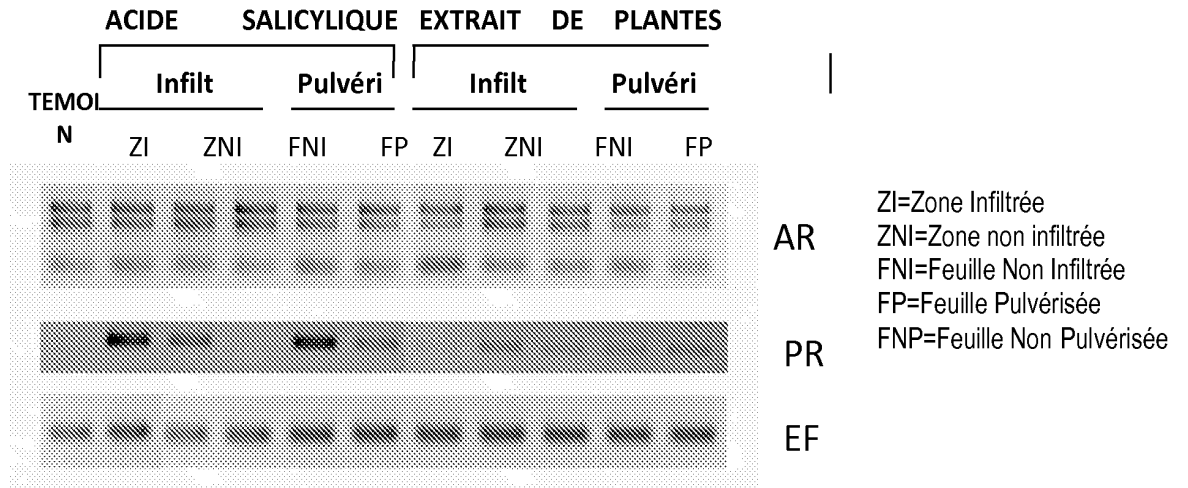


Fig.2

PR1

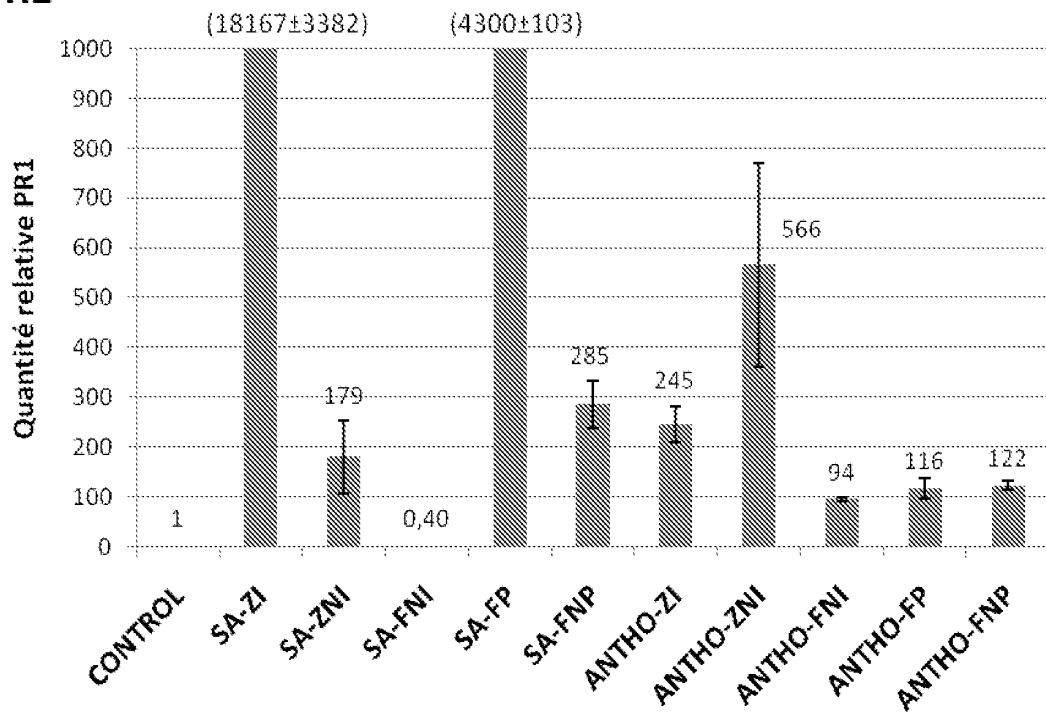


Fig.3

3/3

PR2

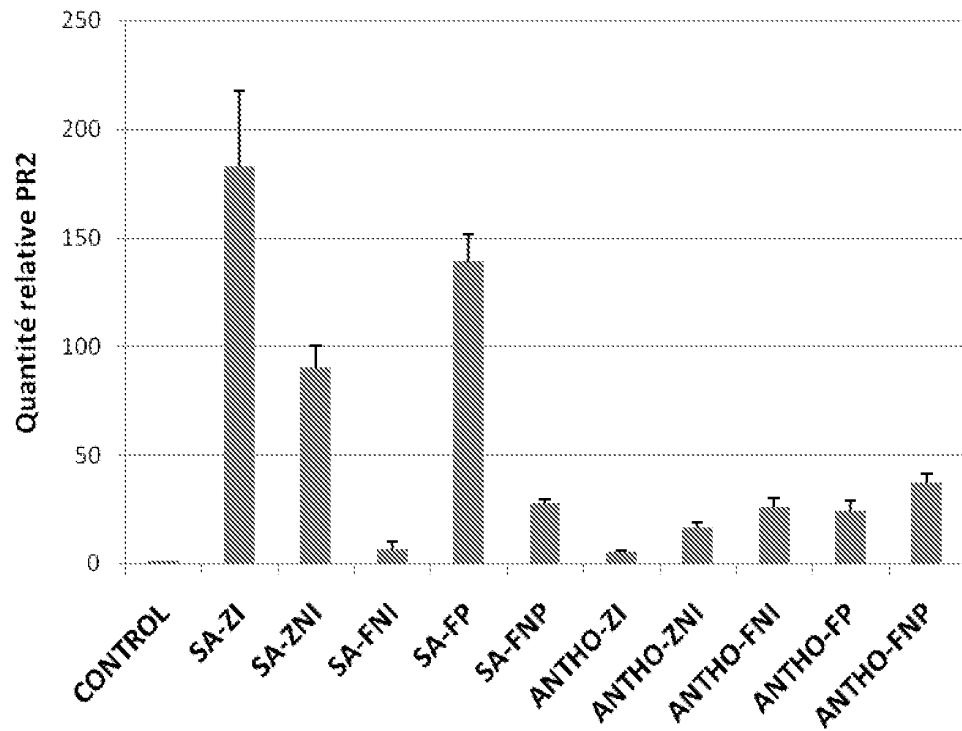


Fig.4

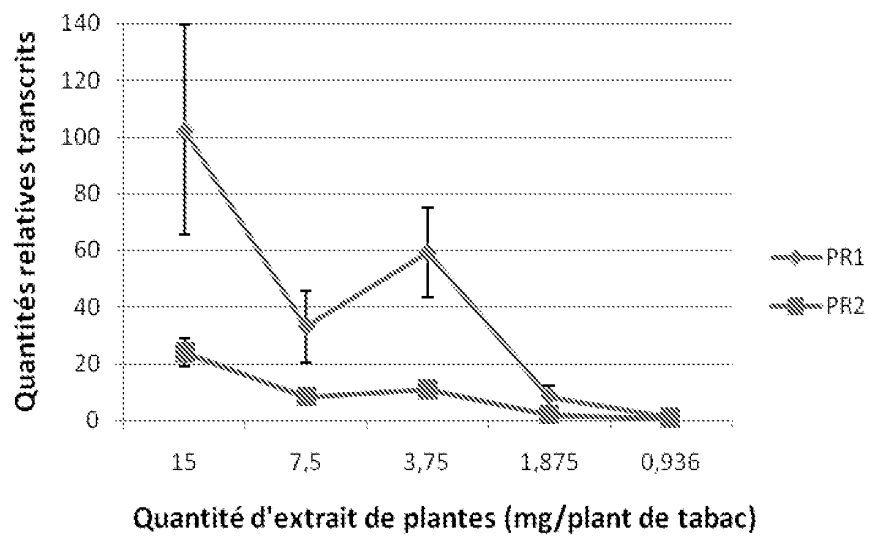


Fig.5



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 738181
FR 1055397

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		
X	KAVROULAKIS ET AL: "Local and systemic resistance against fungal pathogens of tomato plants elicited by a compost derived from agricultural residues", PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, ACADEMIC PRESS LTD, GB, vol. 66, no. 5, 1 mai 2005 (2005-05-01), pages 163-174, XP005140763, ISSN: 0885-5765, DOI: DOI:10.1016/J.PMPP.2005.06.003 * abrégé * * Titre 3.1.2; figures 3a, 3b * * Titre 3.3; figure 7 * * page 170, colonne 2, ligne 50 - page 171, colonne 1, ligne 17 * * page 171, colonne 1, dernier alinéa * -----	1-9	A01N65/00 A01P15/00
X	SPYRIDON NTOUGIAS ET AL: "Suppression of soil-borne pathogens of tomato by composts derived from agro-industrial wastes abundant in Mediterranean regions", BIOLOGY AND FERTILITY OF SOILS ; COOPERATING JOURNAL OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SOIL SCIENCE, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 44, no. 8, 4 juin 2008 (2008-06-04), pages 1081-1090, XP019627814, ISSN: 1432-0789 * abrégé * * page 1085, colonne 2, alinéa 2; figure 3; tableau 2 * * page 1088, colonne 1, ligne 23 - ligne 26 * ----- <div style="text-align: center;">-/--</div>	1-9	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 février 2011		Molina de Alba, José	
<p style="text-align: center;">CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul</p> <p>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie</p> <p>A : arrière-plan technologique</p> <p>O : divulgation non-écrite</p> <p>P : document intercalaire</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention</p> <p>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.</p> <p>D : cité dans la demande</p> <p>L : cité pour d'autres raisons</p> <p>.....</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p> </div> </div>			



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 738181
FR 1055397

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	WO 03/086079 A2 (UNIV MADRID COMPLUTENSE [ES]; C R D O VINALOPO [ES]) 23 octobre 2003 (2003-10-23) * abrégé * * page 2, ligne 16 - ligne 19 * * page 3, ligne 1 - ligne 9 * * page 3, ligne 27 - ligne 31 * -----	1-9	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 février 2011		Molina de Alba, José	
<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 & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1055397 FA 738181**

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 **08-02-2011**

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
WO 03086079	A2	23-10-2003	ES	2193881 A1		01-11-2003
