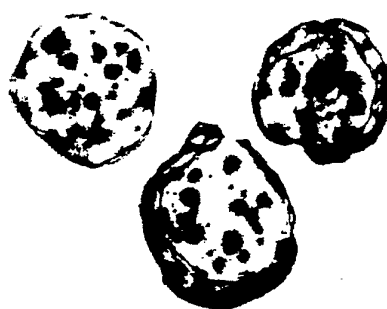


DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets⁴ : C12N 1/00, 1/04, 1/20 C12N 1/38, A01G 7/00 A01N 63/00, C05F 11/08	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 87/ 03616 (43) Date de publication internationale: 18 juin 1987 (18.06.87)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR86/00417 (22) Date de dépôt international: 4 décembre 1986 (04.12.86) (31) Numéro de la demande prioritaire: 85/17933 (32) Date de priorité: 4 décembre 1985 (04.12.85) (33) Pays de priorité: FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION (ORSTOM) [FR/FR]; 24, rue Bayard, F-75008 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : HOANG, Gia, Diem [FR/SN]; Orstom, B.P. 1386, Dakar (SN). DOMMERGUES, Yvon, René [FR/FR]; 76, chaussée de l'Etang, F-94160 St. Mandé (FR).	(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), BR, CH (brevet européen), DE (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, KR, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	

(54) Title: METHOD FOR CULTIVATING MICROORGANISMS, PARTICULARLY OF THE FRANKIA GROUP AND PREPARATION OF BACTERIAL INOCULUMS

(54) Titre: PROCÉDE DE CULTURE DE MICROORGANISMES, NOTAMMENT DU GROUPE DES FRANKIA ET PREPARATION D'INOCULUMS BACTERIENS



2a



2b

(57) Abstract

The method for cultivating microorganisms is characterized in that it consists in a biphasic culture wherein: a) microorganisms are cultivated on a solid nutrient medium ("step a"), b) after culture, said solid medium colonized by the microorganisms is fragmented ("step b"), c) a liquid nutrient medium ("step c") is seeded with the fragments obtained in ("step b"); after the microorganisms have grown, they are collected.

(57) Abrégé

Procédé de culture de microorganismes, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une culture biphasique dans laquelle: a) on cultive les microorganismes sur un milieu nutritif solide ("étape a"), b) après culture, on fragmente ce milieu solide colonisé par les microorganismes ("étape b"), c) on ensemence avec les fragments obtenus à l'"étape b" un milieu nutritif liquide ("étape c"); après croissance des microorganismes, on récupère ceux-ci.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	ML	Mali
AU	Australie	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BE	Belgique	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	IT	Italie	NO	Norvège
BJ	Bénin	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande				

PROCEDE DE CULTURE DE MICROORGANISMES, NOTAMMENT
DU GROUPE DES FRANKIA ET PREPARATION D'INOCULUMS
BACTERIENS

La présente invention concerne un procédé de culture de microorganismes ainsi qu'un procédé de fabrication d'un inoculum à partir des microorganismes obtenus.

5 Plus particulièrement, la présente invention concerne la production d'inoculums nécessaires à l'horticulture et à la foresterie (par exemple l'obtention en pépinière des plants inoculés de Casuarina, aulne, Hippophaë, Elaeagnus).

10 Parmi les microorganismes utilisables à titre d'inoculum, il faut citer les actinomycètes appartenant au groupe des Frankia (symbiotes des plantes actinorhiziennes fixatrices d'azote) et les rhizobiums.

15 Certains microorganismes, notamment les Frankia, présentent la particularité de produire une très faible biomasse lorsqu'on les cultive suivant les méthodes usuelles. Cette très faible production de biomasse constitue un grave handicap, à la fois dans le domaine industriel et dans le domaine de la recherche fondamentale.

20 C'est pourquoi la présente invention propose un procédé de culture de microorganisme et de fabrication d'un inoculum permettant la production de biomasses beaucoup

plus importante que celles qui sont obtenues actuellement, ainsi que les processus permettant de satisfaire aux besoins industriels des horticulteurs par exemple.

En effet, compte tenu de leur utilisation, les inoculums bactériens destinés à l'horticulture ou à la foresterie doivent remplir certaines conditions :

- Ils doivent tout d'abord être constitués d'un support défini et assurant une bonne protection des microorganismes considérés ;
- ils doivent être faciles à stocker, à expédier et à utiliser ;
- enfin, permettre, lors de leur application, une très large dissémination des microorganismes au niveau des sites d'infection des plantes hôtes.

Plus particulièrement, la présente invention concerne des inoculums constitués de microorganismes inclus dans des matrices polymères. De tels procédés ont déjà été décrits, notamment dans les demandes de brevet français suivantes : 77 10254 - 79 28956 - 81 04474 - 83 02847.

Toutefois, aucun de ces procédés ne permet de remplir de façon totalement satisfaisante les conditions évoquées précédemment.

Pour ce faire, la présente invention propose un procédé de culture de microorganismes, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une culture biphasique dans laquelle :

- a) on cultive les microorganismes sur un milieu nutritif solide ("étape a") ;
- b) après culture, on fragmente ce milieu solide colonisé par les microorganismes ("étape b") ;
- c) on enseme avec les fragments obtenus à "l'étape b" un milieu nutritif liquide ("étape c") et on incube à 28-30°C. Cette étape correspond à la culture biphasique.

Après croissance des microorganismes, on récupère ceux-ci.

Ce procédé est en particulier utilisable pour la préparation d'Actinomycètes à croissance lente, notamment ceux appartenant au groupe des Frankia.

Le procédé selon la présente invention met à profit le fait que certains microorganismes, en particulier les Frankia, croissent beaucoup mieux au niveau d'une interface solide/liquide qu'au sein d'un milieu liquide.

Ainsi, par exemple, une culture biphasique liquide/solide avec des fragments de gélose permet, non seulement l'adhésion de Frankia à leur surface en raison du caractère thigmotrope de ce microorganisme (caractère observé chez certains autres microorganismes ainsi que cela a déjà été signalé), mais également la pénétration de Frankia à l'intérieur de ces supports. Le milieu liquide participe, non seulement à la réalisation de l'interface solide/liquide favorable au développement microbien, mais constitue aussi la réserve de nutriments.

Les milieux nutritifs solides ou liquides peuvent avoir sensiblement les mêmes compositions et constituent, pour l'essentiel, des milieux connus ou des milieux dérivés de milieux connus contenant du carbone, de l'azote, du phosphore, des oligoéléments et autres éléments assurant la croissance du microorganisme qu'on entend cultiver.

L'obtention d'un milieu solide peut être réalisée en utilisant de la gélose, mais d'autres composants peuvent être utilisés pour obtenir un milieu solide.

"L'étape a" peut être conduite dans un récipient du type boîte de Petri. Après culture le milieu solide est fragmenté par des moyens appropriés puis dispersé dans un milieu nutritif liquide. En fin de croissance, les micro-

organismes obtenus sont récupérés par des techniques connues telles que la centrifugation.

On a constaté, en outre, que l'adjonction au milieu nutritif de charbon activé, en particulier lorsque
5 l'adjonction est effectuée au niveau du milieu solide ("étape a"), permet d'augmenter notablement la biomasse.

Afin d'améliorer encore la qualité de l'inoculum final, on opère de préférence de la façon suivante :

- 10 a) on inclut les microorganismes dans une matrice de polymère,
- b) ces matrices incluant les microorganismes obtenus à l'issue de "l'étape a" sont incubées dans un milieu permettant la croissance desdits microorganismes jusqu'à la formation de colonies à l'intérieur desdites
15 matrices,
- c) les matrices de polymère incluant les colonies de microorganismes obtenues au cours de "l'étape b" sont déshydratées.

Les matrices de polymère qui peuvent être mises
20 en oeuvre sont connues de l'homme de métier et figurent notamment dans les brevets mentionnés précédemment. Il pourra s'agir, en particulier, de billes d'alginate de calcium qui sont particulièrement bien appropriées à l'obtention d'un inoculum microbien.

25 On sait que les microorganismes inclus incubés dans un milieu permettant la croissance sont capables de poursuivre leur croissance à l'intérieur de leur matrice de polymère. On a observé maintenant qu'ils étaient capables, dans cette matrice de polymère, de former des microcolonies,
30 ce qui présente de nombreux avantages. Tout d'abord, on

obtient un inoculum à forte densité, mais également la structure fine en microcolonie présente comme avantage de protéger l'inoculum lors de son stockage.

5 De préférence, pour le stockage, ces matrices de polymère sont déshydratées sans être fractionnées. Ainsi, lorsque l'on prépare des billes d'alginate de calcium, celles-ci ne sont pas fragmentées mais déshydratées telles quelles.

10 Dans un mode de réalisation préféré, les micro-organismes inclus dans la matrice de polymère sont obtenus par le procédé décrit précédemment. Les fragments, par exemple de gélose, contenant les microorganismes tels que Frankia, sont incorporés dans la matrice de polymère, par exemple l'alginate de calcium.

15 Enfin, lorsque l'inoculum microbien préalablement déshydraté doit être appliqué in situ, on le réhydrate avec un tampon, par exemple un tampon phosphate, jusqu'à obtention d'un gel. Ce gel se prête particulièrement bien à la dissémination des microorganismes dans le sol.

20 Le procédé décrit précédemment permet d'obtenir un inoculum qui, après déshydratation, peut être stocké et transporté sans difficulté, qui présente une biomasse importante et qui peut être dispersé très aisément sous forme du gel.

25 Les exemples ci-dessous permettront de mettre en évidence d'autres avantages et caractéristiques de la présente invention.

Les milieux de culture utilisés dans ces exemples ont les compositions suivantes :

1. Milieu Qmod (Lalonde et Calvert, 1979)

	<u>Composants</u>	<u>Concentration</u>
	K_2HPO_4	0,3 g
	NaH_2PO_4	0,2 g
5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
	KCl	0,2 g
	Extrait de levure	0,5 g
	Peptone	5,0 g
	Citrate ferrique (solution à 1 %)	1 ml
10	Solution d'oligoéléments *	1 ml
	Lécithine	5 mg
	Eau distillée	1 l

pH ajusté à 6,8

* Solution d'oligoéléments (g/l)

15	H_3BO_3 : 1,5 ; $MnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,8 ; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,6 ; $CuSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,1 ; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$: 0,2 ; $CoSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,01.
----	--

2. Milieu Qmod + charbon activé (Diem et Dommergues, 1985)

20	Milieu Qmod précédent additionné de charbon activé à la dose de 150 mg/l
----	--

3. Milieu BAP (Murry et al., 1984)

	<u>Composants</u>	<u>Concentration</u>
	K_2HPO_4	0,591 g
	KH_2PO_4	0,952 g
25	NH_4Cl	0,267 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,095 g
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,010 g
	FeNa EDTA	0,010 g
	Pyruvate de sodium	1,1 g

Solution d'oligoéléments *	1	ml
Solution de vitamines **	1	ml
Eau distillée	1	l

pH ajusté à 6,3

5 * Solution d'oligoéléments (g/l)

H_3Bo_3 : 2,86 ; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$: 2,27 ; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,22 ;
 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 0,08 ; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$: 0,025 ;
 $CoSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,001.

** Solution de vitamines (mg/l)

10 Thiamine HCl : 10 ; acide nicotinique : 50 ;
 pyridoxine HCl : 50 ; biotine : 225 ;
 acide folique : 10 ; pantothénate de calcium : 10 ;
 riboflavine : 10.

4. Milieu YEM (Yeast extract-mannitol) :

15	<u>Composants</u>	<u>Concentration</u>
	K_2HPO_4	0,5 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
	NaCl	0,1 g
	Yeast extract (Difco)	1,0 g
20	Mannitol	10,0 g
	Eau distillée	1 l

5. Milieu YEM modifié

Même composition que précédemment sauf
 K_2HPO_4 qui est utilisé à la concentration de 0,1 g/l.

25 Sur les figures,

- la figure 1 représente l'effet de l'adjonction de
 charbon actif au milieu de culture sur la croissance de
Frankia :

30 1a : milieu Qmod seul ;
 1b : même milieu avec charbon actif (0,01 %) ; les
 points noirs (flèches) apparaissant sur les

boîtes de Petri sont les colonies de Frankia (la poudre de charbon n'est pas visible à cette échelle).

5 - la figure 2 représente des billes d'alginate colonisées à l'intérieur par des Frankia :

2a : vue de trois billes (diamètre réel : environ 5 mm) ;

10 2b : vue agrandie d'une bille où les colonies de Frankia (diamètre réel de chaque colonie : 100 - 200 μ m) apparaissent comme des taches circulaires noires à bord diffus ; autour de certaines colonies on observe des amas de points noirs qui sont des sporanges formés pendant la croissance de Frankia à l'intérieur de la bille; les sporanges (flèches) sont des structures typiques de Frankia ;

15

EXEMPLE 1 - PROCÉDE DE CULTURE EN DEUX ÉTAPES ET EN MILIEU BIPHASIQUE DE CERTAINS ACTINOMYCETES A CROISSANCE LENTE APPARTENANT AU GROUPE DES FRANKIA

20 La culture se fait en trois étapes :

25 "Étape_a" - On cultive Frankia en boîte de Petri (10 cm) dans un milieu gélosé pendant 2 à 3 semaines. Pour ce faire, on ensemence, dans la masse, 10 ml de milieu nutritif gélosé à 1,5 % fondu à 40°C avec 1 ml d'une suspension de Frankia obtenue par homogénéisation d'une culture de Frankia. Après 2 - 3 semaines d'incubation à 30°C, les colonies de Frankia se sont développées dans la gélose (500 à 2 000 colonies par boîte). Chacune de ces plaques de gélose envahies de colonies de Frankia est

30 détachée de sa boîte de Petri et introduite

stérilement dans une fiole contenant 50 ml d'eau et un barreau magnétique.

"Etape_b" - Les plaques sont ainsi fragmentées finement en microgranules de gélose qui renferment des colonies ou fragments de colonies de Frankia.

"Etape_c" - La suspension de fragments obtenue comme indiqué ci-dessus est utilisée pour ensemer un milieu nutritif liquide à raison de 10 ml de suspension de fragments Frankia par 50 ml de milieu nutritif liquide. L'incubation à 30°C dure 2 à 3 semaines. La composition du milieu nutritif (gélifié ou liquide) varie suivant les souches de Frankia utilisées. Il peut s'agir soit du milieu Qmod, soit du milieu BAP. Cette "étape c" constitue la culture biphasique.

Détermination de la biomasse de Frankia obtenue

Etant donné que Frankia est un organisme filamenteux, il n'est pas possible d'estimer la biomasse en nombre de cellules comme c'est le cas pour les bactéries. On l'exprime soit en poids de protéines (ce qui est la solution adoptée ici), soit en poids de la matière sèche.

Après élimination du milieu nutritif par centrifugation, on introduit le culot de centrifugation dans un tube à essai contenant environ 30 ml d'eau distillée et on met au bain marie en ébullition pendant 2 min pour faire fondre la gélose des microgranules. On verse ensuite tout le contenu du tube dans environ 200 ml d'eau distillée bouillante pour diluer la gélose fondue afin de pouvoir l'éliminer, soit par filtration sur filtre Millipore, soit par centrifugation. On rince la culture plusieurs fois à l'eau distillée puis on la récolte pour effectuer le dosage de protéines selon la méthode de Lowry et al. (1951).

Comparaison de la méthode usuelle en milieu
liquide et de la méthode selon l'invention
en milieu biphasique

5

Afin de comparer ces deux méthodes, on a été amené à conduire la culture en milieu liquide en adoptant la même succession de manipulations que celle préconisée dans le cadre de la présente invention.

10

Le tableau 1 résume la succession des opérations dans les deux cas.

TABLEAU 1

COMPARAISON DE LA METHODE DE CULTURE USUELLE EN MILIEU LIQUIDE
ET DE LA METHODE DE CULTURE BIPHASIQUE SELON L'INVENTION AVEC DES FRAGMENTS DE GELOSE

<u>Méthode de culture usuelle en milieu liquide</u>	<u>Méthode de culture biphasique avec des fragments de gélose</u>
1 ml de la suspension de cellules de <u>Frankia</u>	1 ml de la suspension de cellules de <u>Frankia</u>
↓	↓
Culture sur milieu liquide pendant 2 à 3 semaines	Culture sur milieu gélosé pendant 2 à 3 semaines
↓	↓
Homogénéisation de la culture	Homogénéisation de la culture et obtention de fragments de gélose renfermant les colonies de <u>Frankia</u>
↓	↓
Continuation de la culture en milieu liquide pendant 2 à 3 semaines	Transfert des fragments en milieu liquide et culture pendant 2 à 3 semaines (culture biphasique)
↓	↓
Centrifugation, lavage	Centrifugation, lavage
↓	↓
Produit final	Produit final

Culture de la souche de Frankia de
Casuarina equisetifolia ORS 021001

Les résultats qui figurent au tableau 2
montrent clairement que le procédé selon
l'invention permet l'obtention d'une
biomasse beaucoup plus importante (x 20)
tout en partant d'un inoculum identique
et ce pour la même durée d'incubation.

Culture de trois autres souches de
Frankia

Pour vérifier la fiabilité du procédé selon
l'invention, on a refait cette expérience
à un autre moment de l'année avec trois
autres souches de Frankia qui sont les
suivantes :

ORS 022602 : Frankia d'Allocasuarina stricta
ORS 060501 : Frankia de Colletia spinosa
ORS 140102 : Frankia d'Hippophaë rhamnoides.

Les résultats qui figurent au tableau 3
confirment l'amélioration de la production
de la biomasse de Frankia par le procédé de
culture selon l'invention par rapport à la
méthode de culture usuelle. Cette améliora-
tion est plus faible dans cet essai que
dans l'essai précédent.

Ceci serait dû à plusieurs causes :

- . temps d'incubation réduit à 4 semaines
au lieu de 6 semaines,
- . état physiologique et présence variable
de diverses structures de Frankia (hyphes
végétatifs, sporanges) dans l'inoculum
initial.

TABLEAU 2

COMPARAISON DE LA CROISSANCE DE FRANKIA ORS 021001 CULTIVEE
SELON LA METHODE USUELLE EN MILIEU LIQUIDE ET SELON LA
NOUVELLE METHODE DE CULTURE BIPHASIQUE AVEC MICROGRANULES
DE GELOSE

<u>METHODE</u>	<u>BIOMASSE DE FRANKIA (μg protéines/fiole)</u>	
	<u>A L'ENSEMENCEMENT</u>	<u>APRES 6 SEMAINES D'INCUBATION</u> (1)
Méthode usuelle	2	55
Méthode de culture biphasique	2	1 205

(1) dont 3 semaines sur milieu gélosé et
3 semaines en milieu biphasique

Milieu nutritif utilisé : Qmod

TABLEAU 3

- COMPARAISON DE LA CROISSANCE DE TROIS SOUCHES DE FRANKIA
CULTIVEES SELON LA METHODE USUELLE EN MILIEU LIQUIDE ET
SELON LA NOUVELLE METHODE DE CULTURE BIPHASIQUE AVEC
FRAGMENTS DE GELOSE

<u>METHODE ET SOUCHE</u>	<u>BIOMASSE DE FRANKIA (μg protéines/fiole)</u>	
	<u>A L'ENSEMENCEMENT</u>	<u>APRES 4 SEMAINES D'INCUBATION</u> (1)
<u>Souche ORS 022602</u>		
. Méthode usuelle	2	26
. Méthode biphasique	2	145
<u>Souche ORS 060501</u>		
. Méthode usuelle	3	58
. Méthode biphasique	3	315
<u>Souche ORS 140102</u>		
. Méthode usuelle	6	41
. Méthode biphasique	6	360

(1) dont 2 semaines sur milieu gélosé et
2 semaines en milieu biphasique

Milieux nutritifs utilisés : même milieu que dans le
tableau 2, sauf pour ORS 022602 qui a été cultivé sur
milieu BAP

EXEMPLE 2 - EFFET DE L'ADJONCTION DE CHARBON ACTIVE AU
MILIEU DE CULTURE Qmod SUR LE NOMBRE DE
COLONIES DE FRANKIA SOUCHE ORS 021001

On cultive la souche ORS 021001 dans des tubes
5 à essai de 18 x 180 mm contenant 10 ml de milieu Qmod.
L'incubation a lieu à 30°C et les durées d'incubation sont
respectivement de 3 semaines, 1 mois et 2 mois. A la fin de
ces périodes d'incubation, chacun des tubes renferme de 50
à 70 µg de protéines de Frankia.

10 On décante chaque culture, on ajoute 20 ml de
milieu Qmod frais et on homogénéise stérilement à l'aide
d'un barreau magnétique pendant 1 heure. On fait deux
dilutions (10^{-1} et 10^{-2}) des suspensions obtenues et on
inocule deux séries de boîtes de Petri en incorporant 0,5 ml
15 de chaque suspension-dilution à 20 ml de milieu Qmod gélosé
et additionné ou non de charbon activé (Merck Art. 2186) à
la dose de 150 mg par litre. On incube les boîtes de Petri
ainsiensemencées à 30°C pendant 3 semaines. On compte le
nombre de colonies formées sous une loupe binoculaire, les
20 résultats étant exprimés sur la base de 1 ml d'inoculum.

Le tableau 4 montre clairement que l'adjonction
de charbon au milieu accroît le nombre de colonies de Frankia
observées, cet accroissement étant considérable dans le
cas des cultures de 2 mois.

25 Ce premier résultat indique que le charbon activé
favorise la germination des structures de type spore
accumulées dans les cultures de 2 mois (figure 1). D'un
autre côté, l'observation à la loupe montre que les hyphes
nouvellement formés sont plus ramifiés sur milieu Qmod avec
30 charbon activé que sur milieu Qmod seul, ce deuxième
résultat prouvant que le charbon activé favorise la crois-
sance des hyphes.

TABLEAU 4

EFFET DE L'ADJONCTION DE CHARBON ACTIVE AU
MILIEU NUTRITIF (Qmod) SUR LE NOMBRE DE
COLONIES FORMEES A PARTIR DE 1 ml DE
SUSPENSION DE FRANKIA ORS 021001

<u>CULTURE DE FRANKIA</u>	<u>NOMBRE DE COLONIES FORMEES</u>	
	<u>MILIEU Qmod</u>	<u>MILIEU Qmod + charbon</u>
Culture de 3 semaines	1 000	3 400
Culture de 1 mois	8 200	266 000
Culture de 2 mois	4 200	940 000

EXEMPLE 3 - CROISSANCE DE FRANKIA DANS LES BILLES D'ALGINATE

On ensemence 100 ml de milieu Qmod avec 10 ml d'une suspension de cellules de Frankia ORS 021001. Après 4 semaines d'incubation, on obtient une culture renfermant une biomasse de Frankia qui, évaluée en protéines (Lowry et al., 1951), atteint 240 µg. On décante la culture, on la transfère dans la même quantité (100 ml) de milieu Qmod liquide frais, on homogénéise avec un barreau magnétique pendant 1 heure. On procède alors à l'inclusion de Frankia dans l'alginate. Pour ce faire, on ajoute 100 ml de milieu Qmod liquide stérile contenant l'alginate à 4 % S170 (Satialgine S170, Société Bretonne de Produits Chimiques et Pharmaceutiques, 6 impasse Latécoère, Velizy 78140). On obtient ainsi au total 200 ml de suspension de fragments de colonies de Frankia dans le milieu Qmod contenant 2 % d'alginate. On laisse tomber goutte à goutte aseptiquement cette suspension dans un récipient contenant une solution aqueuse stérile de CaCl_2 (1 %) et muni d'un barreau magnétique en agitation continue.

Dans ces conditions, les billes se forment au bout de 20 à 30 min dans la solution de CaCl_2 . Les billes sont immédiatement rincées 10 fois avec de l'eau distillée stérile.

On transfère les billes dans les fioles contenant 50 ml de milieu Qmod liquide (environ 20 ml de billes par fiole) et on incube à 30°C pendant 4 semaines. Après ce délai, l'observation à la loupe montre que de nombreuses colonies de Frankia (20-40 colonies/bille) se sont développées à l'intérieur de chaque bille parfaitement dépourvue de toute contamination microbienne exogène. Ces colonies ont des tailles différentes mais sont parfaitement identiques en ce qui concerne la morphologie et le mode de croissance radiale typique de Frankia. Beaucoup de colonies produisent des sporanges également typiques (figure 2).

EXEMPLE 4 - CROISSANCE DE RHIZOBIUM DANS LES BILLES D'ALGINATE

On fait une culture de *Rhizobium* souche A16 isolée d'*Albizia lebeck* sur un milieu YEM usuel. Après 4 jours d'incubation, on prélève 1 ml que l'on introduit dans 100 ml de milieu YEM modifié, ce milieu est pauvre en phosphate et contient de l'alginate S170 (Satialgine S170, Société Bretonne de Produits Chimiques et Pharmaceutiques, 6 impasse Latécoère, Velizy 78140). On obtient des billes en effectuant les opérations de l'exemple 3. On fait deux lots de ces billes contenant les cellules de *Rhizobium* inclus :

- . le premier lot est immergé dans une fiole renfermant du milieu nutritif liquide YEM modifié mais dépourvu d'alginate ;
- . le deuxième lot est incubé dans les mêmes conditions mais en l'absence de milieu nutritif.

Au bout de 48 heures, on constate que le nombre de *Rhizobium* dénombré sur milieu Yem normal gélosé passe de $175 \cdot 10^3$ par bille à $280 \cdot 10^5$ par bille dans le premier lot, alors que dans le deuxième lot le nombre de *Rhizobium* reste stationnaire. Ce résultat montre que la croissance de *Rhizobium* à l'intérieur des billes d'alginate requiert, comme dans le cas de *Frankia*, l'incubation de ces billes dans un milieu nutritif liquide approprié.

EXEMPLE 5 - REHYDRATATION DES BILLES D'ALGINATE DESHYDRATEES

Les billes d'alginate renfermant les microorganismes symbiotiques préalablement déshydratées sont immergées dans une solution de tampon phosphate (pH 6,8) ayant la composition suivante :

KH_2PO_4 : 4,29 g ; K_2HPO_4 : 4,34 g ; eau q.s.p. 1 litre.

Au bout de 4 à 6 heures, les billes déshydratées reprennent la forme et la consistance initiales des billes fraîches. Par écrasement, il est très facile d'obtenir l'inoculum sous forme d'un gel. Ce traitement au tampon phosphate est indispensable car il permet la libération et la dissémination des microorganismes précédemment inclus ou développés après l'inclusion.

EXEMPLE 6 - INOCULATION DES PLANTES

Pour contrôler la qualité de l'inoculum obtenu par le procédé selon l'invention, on a testé l'infectivité d'un inoculum de Frankia sur Casuarina equisetifolia (Frankia souche ORS 021001) et d'un inoculum de champignon endomycorhizien vésiculo-arbusculaire (Glomus mosseae).

Frankia souche ORS 021001

On a d'abord obtenu des plantules de Casuarina equisetifolia en faisant germer des graines superficiellement stérilisées (trempage dans H_2SO_4 concentré pendant 1 min, puis rinçage abondant avec de l'eau distillée stérile). Les plantules âgées de 4 semaines ont été repiquées à raison de 1 plantule par pot en plastique (diamètre 7 cm, hauteur 7 cm) contenant du sol stérile humidifié quotidiennement à l'eau stérile. Pour inoculer les plantules au moment du repiquage, on prépare l'inoculum comme suit :

- . on fait regonfler 120 mg de billes déshydratées dans le tampon phosphate indiqué ci-dessus ;
- . après écrasement on mélange le gel obtenu avec du sable stérile et l'on répartit en 12 pots, ce qui revient à apporter à chaque pot inoculé 10 mg de billes déshydratées.

On a utilisé deux lots d'inoculum : un premier lot stocké pendant 2 semaines seulement (inoculum n° 1), un deuxième lot stocké à la température du laboratoire pendant 1 an (inoculum n° 2). Bien entendu, parallèlement aux pots inoculés, on a mis en place une série de pots témoins non inoculés. Après 2 mois de culture, on détermine le poids sec des parties aériennes des plantes (séchage jusqu'à poids constant), le nombre de plantes nodulées et le nombre de nodules par plante (tableau 5).

TABLEAU 5

INOCULATION DES PLANTULES DE CASUARINA EQUISETIFOLIA AVEC
ORS 021001 INCLUS DANS LES BILLES D'ALGINATE DESHYDRATEES
PUIS REGONFLEES AU MOMENT DE L'EMPLOI DANS LE TAMPON PHOSPHATE

<u>TRAITEMENT</u>	<u>POIDS SEC</u> <u>DES PLANTES</u> (mg/plante)	<u>PLANTES NODULEES</u> <u>SUR NOMBRE TOTAL</u>	<u>NOMBRE DES</u> <u>NODULES/PLANTE</u>
Témoin	80	0 / 12	0
Inoculum n°1	220	12 / 12	3 - 8
Inoculum n°2	170	12 / 12	3 - 5

Inoculum n° 1 Billes conservées sous forme déshydratée
pendant 2 semaines à la température du
laboratoire

Inoculum n° 2 Billes conservées sous forme déshydratée
pendant 1 an à la température du laboratoire.

Glomus mosseae

On a inclus dans les billes d'alginate les structures de Glomus mosseae (hyphes libres ou dans les racines, spores) suivant la méthode décrite par Diem et al. (1981) et Ganry et al. (1982). On a repiqué des plantules de Vigna unguiculata âgées de 7 jours dans des pots en terre cuite (diamètre 15 cm, hauteur 20 cm) contenant du sol stérile. Un premier lot de 5 plantes a été inoculé avec un inoculum qui est un mélange de sable et de gelée préparé de la même façon que précédemment décrit mais à partir de billes déshydratées, contenant les structures de Glomus mosseae. Ces billes avaient été stockées pendant 1 an à la température du laboratoire. On a apporté à chaque pot inoculé l'équivalent de 30 mg de billes déshydratées. Un deuxième lot de 5 plantes a été constitué par les plantes non inoculées.

Le tableau 6 montre que l'inoculum de Glomus mosseae est parfaitement infectif à la dose utilisée et après conservation pendant 1 an.

TABLEAU 6

INOCULATION DES PLANTULES DE VIGNA UNGUICULATA AVEC GLOMUS
MOSSEAE INCLUS DANS LES BILLES D'ALGINATE DESHYDRATEES PUIS
REGONFLEES AU MOMENT DE L'EMPLOI DANS LE TAMPON PHOSPHATE

<u>TRAITEMENT</u>	<u>PLANTES INFECTEES</u> <u>SUR NOMBRE TOTAL</u>	<u>FREQUENCE D'INFECTION</u> (%)
Témoin	0 / 5	0
Inoculum n° 1	5 / 5	86

Inoculum n° 1 : Billes conservées sous forme déshydratée
pendant 1 an

Fréquence d'infection : nombre de morceaux de racine (3 mm)
infectés sur nombre total observé

REFERENCES

- DIEM H.G. et Y.R. DOMMERGUES (1985) In vitro production of specialized reproductive torulose hyphae by Frankia strain ORS 021001 isolated from Casuarina junghuhniana root nodules. Plant and Soil 87:17-29.
- LALONDE M. et H.E. CALVERT (1979) Production of Frankia hyphae and spores as an infective inoculant for Alnus species. In : Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests. (J.C. Gordon, C.T. Wheeler et D.A. Perry, eds) pp. 95-110. (Corvallis, Forest Research Laboratory).
- LOWRY O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. RANDALL (1951) Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- MURRY M.A., M.S. FONTAINE et J.G. TORREY (1984) Growth kinetics and nitrogenase induction in Frankia sp. HFPArI3 grown in batch culture. Plant and Soil, 78: 61-78.

REVENDICATIONS

1) Procédé de culture de microorganismes, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une culture biphasique dans laquelle :

- 5 a) on cultive les microorganismes sur un milieu nutritif solide ("étape a"),
- b) après culture, on fragmente ce milieu solide colonisé par les microorganismes ("étape b"),
- c) on ensemence avec les fragments obtenus à "l'étape b" un milieu nutritif liquide ("étape c"),
- 10 après croissance des microorganismes, on récupère ceux-ci.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le microorganisme cultivé est un Actinomycète à croissance lente, en particulier appartenant au groupe des Frankia.

- 15 3) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le milieu nutritif solide utilisé dans l'étape a contient de la gélose.

- 4) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on ajoute au milieu nutritif du charbon
- 20 activé.

5) Procédé de préparation d'un inoculum microbien caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :

- 25 a) on inclut les microorganismes dans une matrice de polymère,
- b) les matrices de polymère incluant les microorganismes obtenues à l'issue de "l'étape a" sont incubées dans un milieu permettant la croissance desdits microorganismes jusqu'à la formation de colonies à l'intérieur desdites
- 30 matrices,
- c) les matrices de polymère incluant les colonies de microorganismes obtenues au cours de "l'étape b" sont déshydratées.

6) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le polymère est sous forme de fragments.

7) Procédé de préparation d'un inoculum microbien selon l'une des revendications 5 et 6, caractérisé en ce que le polymère utilisé est de l'alginate de calcium.

8) Procédé de préparation d'un inoculum microbien selon l'une des revendications 5 ou 7, caractérisé en ce que les microorganismes sont des microorganismes symbiotiques des plantes.

9) Procédé de préparation d'un inoculum microbien selon la revendication 8, caractérisé en ce que les microorganismes appartiennent au groupe des Frankia ou des Rhizobium.

10) Procédé de préparation d'un inoculum microbien selon l'une des revendications 6 à 9, caractérisé en ce que les matrices de polymère obtenues se présentent sous la forme de billes ou de granules.

11) Procédé de préparation d'un inoculum microbien selon l'une des revendications 5 à 10, caractérisé en ce que les microorganismes à partir desquels on fabrique ledit inoculum sont obtenus par le procédé de culture biphasique selon l'une des revendications 1 à 4.

12) Inoculum microbien caractérisé en ce qu'il est obtenu par le procédé selon l'une des revendications 5 à 11.

13) Application de l'inoculum microbien selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'avant utilisation les matrices de polymère sont réhydratées avec un tampon jusqu'à l'obtention d'un gel.

1 / 1

FIG. 1

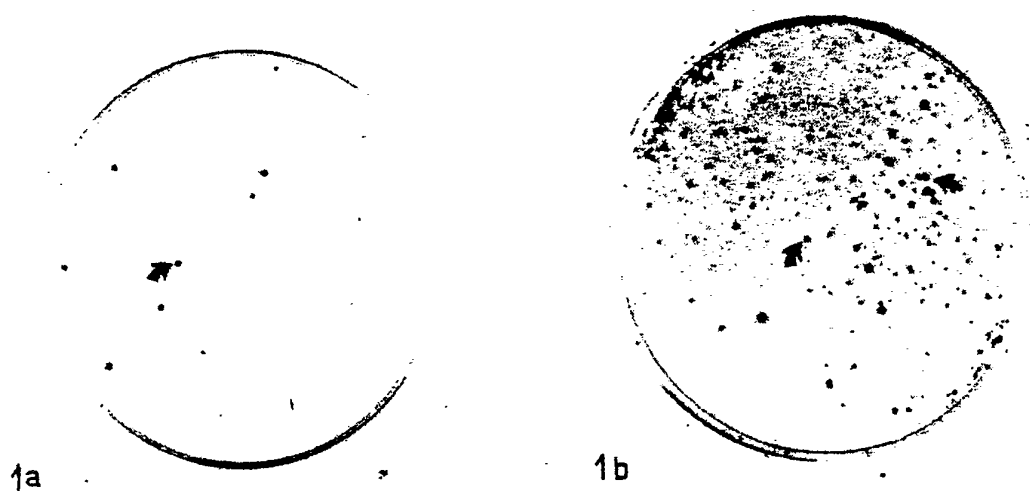
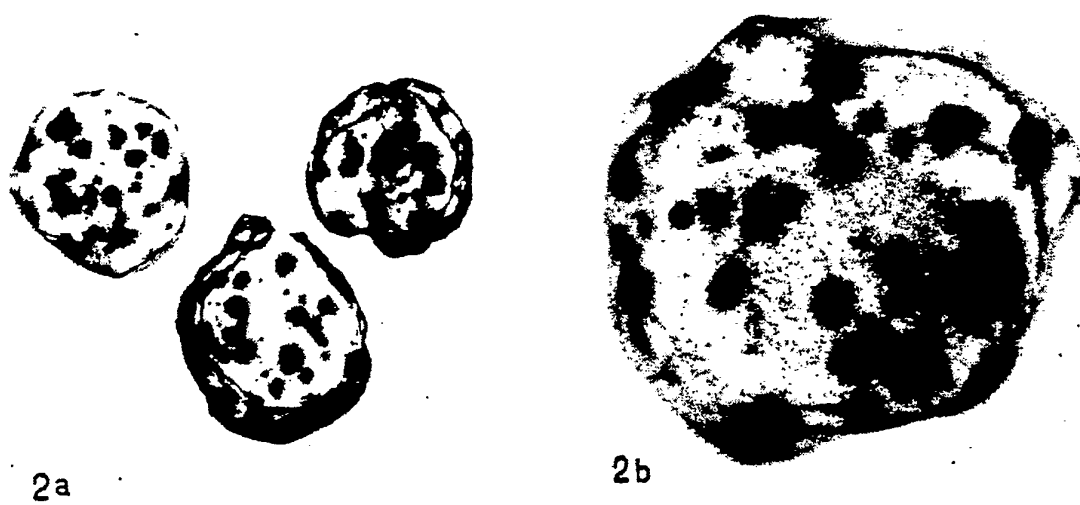


FIG. 2



FEUILLE DE REMPLACEMENT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 86/00417

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. ⁴ C 12 N 1/00; C 12 N 1/04; C 12 N 1/20; C 12 N 1/38; A 01 G 7/00; A 01 N 63/00; C 05 F 11/08		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. ⁴	C 12 N; A 01 G; A 01 N; C 05 F	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	FR, A, 2501229 (RHONE POULENC IND.) 10 September 1982, see page 11, lines 8-24; page 17, lines 1-10 --	1, 3
A	EP, A, 0083267 (RHONE-POULENC S.A.) 6 July 1983 --	
A	FR, A, 1466843 (MOBIL OIL CORP.) 20 January 1967 --	
A	FR, A, 2086927 (STANDARD BRANDS INC.) 31 December 1971 --	
A	Plant and Soil, vol. 87, 1985, Martinus Nijhoff Publishers, (Dordrecht, NL); H.G. Diem et al.: "In vitro production of specia- lized reproductive torulose hyphae by Frankia strain ORS 021001 isolated from Casuarina junghuhniana root nodules", pages 17-29 (cited in the application) --	
A	Journal of Biotechnology, vol. 2, 1985, Elsevier Science Publishers B.V. (NL)	5
* Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
11 March 1987 (11.03.87)		23 April 1987 (23.04.87)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
EUROPEAN PATENT OFFICE		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	H. Nakajima et al.: "Entrapment of Lavandula vera cells and production of pigments by entrapped cells", pages 107-117, see the whole document --	
A	Nature, vol. 302, No. 5909, April 1983 (Chesham, Bucks, GB) K. Nilsson et al.: "Entrapment of animal cells for production of monoclonal antibodies and other biomolecules", pages 629-630, see the whole document --	5
A	US, A, 4518693 (WEI-YOUH KUU, RESEARCH CORP.) 21 May 1985 see column 3, lines 3-10, claim 1 --	5
A	WO, A, 81/01714 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION) 25 June 1981 see the whole document --	5
P,A	WO, A, 85/05630 (KARYON TECHNOLOGY INC.) 19 December 1985 see the whole document -----	5

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹

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

1. ☐ Claim numbers....., because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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

3. ☐ Claim numbers....., because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²

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

See PCT/ISA/206 of 27 January 1987

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/FR 86/00417 (SA 15346)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 31/03/87

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A- 2501229	10/09/82	SE-A- 8201348	07/09/82
		AU-A- 8115382	09/09/82
		OA-A- 7021	31/08/83
		CA-A- 1179618	18/12/84
		AU-B- 551717	08/05/86
EP-A- 0083267	06/07/83	FR-A, B 2519022	01/07/83
		AU-A- 9193582	07/07/83
		CA-A- 1179616	18/12/84
		OA-A- 7289	31/08/84
FR-A- 1466843		None	
FR-A- 2086927	31/12/71	None	
US-A- 4518693	21/05/85	None	
WO-A- 8101714	25/06/81	EP-A, B 0041553	16/12/81
		US-A- 4321327	23/03/82
		AU-A- 6703781	06/07/81
		US-A- 4427775	24/01/84
		AT-B- E7800	15/06/84
		AU-B- 547261	10/10/85
WO-A- 8505630	19/12/85	EP-A- 0185701	02/07/86
		JP-T- 61502513	06/11/86

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 86/00417

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁴ : C 12 N 1/00; C 12 N 1/04; C 12 N 1/20; C 12 N 1/38; A 01 G 7/00; A 01 N 63/00; C 05 F 11/08		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁴	C 12 N; A 01 G; A 01 N; C 05 F	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
X	FR, A, 2501229 (RHONE-POULENC IND.) 10 septembre 1982, voir page 11, lignes 8-24; page 17, lignes 1-10	1, 3
A	EP, A, 0083267 (RHONE-POULENC S.A.) 6 juillet 1983	
A	FR, A, 1466843 (MOBIL OIL CORP.) 20 janvier 1967	
A	FR, A, 2086927 (STANDARD BRANDS INC.) 31 décembre 1971	
A	Plant and Soil, volume 87, 1985, Martinus Nijhoff Publishers, (Dordrecht, NL); H.G. Diem et al.: "In vitro production of specialized reproductive torulose hyphae by Frankia strain ORS 021001 isolated from Casuarina junghuhniana root nodules", pages 17-29 cité dans la demande	
[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹ « A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent « E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date « L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) « O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens « P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée « T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention « X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive « Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier. « & » document qui fait partie de la même famille de brevets		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
11 mars 1987	23 APR 1987	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	M. VAN MOL	

(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁴		
Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	N° des revendications visées ¹⁸
A	Journal of Biotechnology, volume 2, 1985, Elsevier Science Publishers B.V. (NL) H. Nakajima et al.: "Entrapment of Lavandula vera cells and production of pigments by entrapped cells", pages 107-117, voir le document en entier --	5
A	Nature, vol. 302, no. 5909, avril 1983 (Chesham, Bucks, GB) K. Nilsson et al.: "Entrapment of animal cells for production of monoclonal antibodies and other biomolecules", pages 629-630, voir le document en entier --	5
A	US, A, 4518693 (WEI-YOUEH KUU, RESEARCH CORP.) 21 mai 1985 voir colonne 3, lignes 3-10; revendi- cation 1 --	5
A	WO, A, 81/01714 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION) 25 juin 1981 voir le document en entier --	5
P,A	WO, A, 85/05630 (KARYON TECHNOLOGY INC.) 19 décembre 1985 voir le document en entier -----	5

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE

V. OBSERVATIONS LORSQU'IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT PAS FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE ¹

Selon l'article 17.2) a) certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications numéros..... se rapportent à un objet à l'égard duquel la présente administration n'a pas l'obligation de procéder à la recherche, à savoir:

2. ☐ Les revendications numéros..... se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas les conditions prescrites dans une mesure telle qu'une recherche significative ne peut être effectuée, précisément:

3. ☐ Les revendications numéros..... sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément à la deuxième et à la troisième phrases de la règle 6.4.a) du PCT.

VI. OBSERVATIONS LORSQU'IL Y A ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION ²

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la présente demande internationale, c'est-à-dire:

Voir PCT/ISA/206 du 27 Janvier 1987

1. ☒ Comme toutes les taxes additionnelles demandées ont été payées dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre toutes les revendications de la demande internationale pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme seulement une partie des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre seulement celles des revendications de la demande pour lesquelles les taxes ont été payées, c'est-à-dire les revendications:

3. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale est limité à l'invention mentionnée en premier dans les revendications; elle est couverte par les revendications numéros:

4. ☐ Etant donné que toutes les revendications susceptibles de faire l'objet d'une recherche le pouvaient sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucune taxe additionnelle.

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles de recherche étaient accompagnées d'une réserve du déposant.
- ☒ Aucune réserve n'a été faite lors du paiement des taxes additionnelles de recherche.

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE RELATIF

A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO. PCT/FR 86/00417 (SA 15346)

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche international visé ci-dessus. Lesdits membres sont ceux contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 31/03/87

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
FR-A- 2501229	10/09/82	SE-A- 8201348	07/09/82
		AU-A- 8115382	09/09/82
		OA-A- 7021	31/08/83
		CA-A- 1179618	18/12/84
		AU-B- 551717	08/05/86
EP-A- 0083267	06/07/83	FR-A,B 2519022	01/07/83
		AU-A- 9193582	07/07/83
		CA-A- 1179616	18/12/84
		OA-A- 7289	31/08/84
FR-A- 1466843		Aucun	
FR-A- 2086927	31/12/71	Aucun	
US-A- 4518693	21/05/85	Aucun	
WO-A- 8101714	25/06/81	EP-A,B 0041553	16/12/81
		US-A- 4321327	23/03/82
		AU-A- 6703781	06/07/81
		US-A- 4427775	24/01/84
		AT-B- E7800	15/06/84
		AU-B- 547261	10/10/85
WO-A- 8505630	19/12/85	EP-A- 0185701	02/07/86
		JP-T- 61502513	06/11/86

Pour tout renseignement concernant cette annexe :
voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No. 12/82