



NUMERO DE PUBLICATION : 1000309A4

NUMERO DE DEPOT : 8701466

Classif. Internat.: C12N

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

Date de délivrance : 18 Octobre 1988

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d' invention, notamment l' article 22;

Vu l' arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d' invention, notamment l' article 28;

Vu le procès verbal dressé le 21 Décembre 1987 à 24h00  
à l' Office de la Propriété Industrielle

## ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : SANDOZ S.A.  
Lichtstrasse 35, CH-4002 Bale(SUISSE)

représenté(e)(s) par : WYMANN Gérard, SANDOZ A.G., Lichtstrasse 35  
- CH 4002 BASEL SUISSE.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : PROCEDE DE TRANSFORMATION DE CELLULES DE BACILLUS THURINGIENSIS.

Priorité(s) 22.12.86 GB GBA 8630527

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l' invention, sans garantie du mérite de l' invention ou de l' exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 18 Octobre 1988  
PAR DELEGATION SPECIALE :

  
JUYTS L.  
Directeur.

PROCEDE DE TRANSFORMATION DE CELLULES DE  
BACILLUS THURINGIENSIS

La présente invention concerne un procédé de transfor-  
5 mation de cellules de *Bacillus thuringiensis*.

Les termes "transformer" et "transformation", utilisés  
dans la présente invention, sont destinés à concerner un mé-  
canisme de transfert génétique dans lequel on introduit de  
l'ADN exogène dans une bactérie receveuse, en introduisant  
10 ainsi des modifications génétiques dans ladite bactérie re-  
ceveuse.

Les *Bacillus thuringiensis* (BT) sont des bactéries Gram  
positives contenant une protéine cristalline, la  $\delta$ -endo-  
toxine (DET), qui est toxique vis-à-vis des larves d'un cer-  
15 tain nombre d'insectes. Suivant les sous-espèces, BT est  
utilisé comme pesticide biologique sélectif contre diffé-  
rents nuisibles. Les sous-espèces *thuringiensis*, *alesti* et  
*dendrolimus* sont, par exemple, pathogènes contre les lépido-  
ptères; les sous-espèces *israelensis*, *darmstadiensis* 73-E-  
20 10-2, *kyushuensis* et *morrisoni* PG14 le sont contre les di-  
ptères; la sous-espèce *tenebrionis* l'est contre les coléo-  
ptères; les sous-espèces *kurstaki* HD-1, *kenyae*, *aizawai* et  
*colmeri* le sont contre les lépidoptères et les diptères,  
tandis que les sous-espèces *dakota*, *indiana*, *tokokuensis* et  
25 *kumamotoensis* ne sont pas connues pour être toxiques  
vis-à-vis de tous les nuisibles.

D'un point de vue industriel et écologique, il est sou-  
haitable de disposer de pesticides biologiques additionnels  
ayant un spectre d'activité différent, par exemple supérieur  
30 ou plus large.

On peut, par exemple, atteindre ce but en mettant au  
point de nouveaux isolats à partir de la nature, par conju-  
gaison de bactéries ou par transformation de bactéries.

Ainsi, on a récemment isolé de nouvelles souches de BT  
35 ayant une activité intéressante (par exemple var. *tenebrio-*

nis ayant une activité contre les coléoptères) et il a également été fait état de récents succès concernant la conjugaison de souches de BT.

5 La transformation des bactéries offre l'avantage qu'elle permet, si elle est couronnée de succès, d'introduire une information génétique spécifique dans des bactéries.

10 Ainsi, un gène codant pour une DET a été cloné dans divers microorganismes tels que *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas fluorescens*, et même dans des plantes supérieures (tabac), par des techniques d'ADN recombinant, plus spécifiquement par transformation.

15 Ces organismes manipulés génétiquement produisent cependant de faibles quantités de DET comparées aux quantités produites par des souches de BT naturelles. L'importance commerciale de ces organismes est donc discutable, au moins aussi longtemps qu'aucun moyen n'aura été trouvé pour améliorer l'expression de l'ADN exogène encodant pour la DET.

20 Il semblerait donc indiqué d'essayer d'obtenir une meilleure expression de gènes exogènes (ADN) en utilisant une bactérie BT comme bactérie receveuse dans des techniques de transformation.

Les techniques de transformation connues sont essentiellement réalisées à l'aide de cellules ou de protoplastes.

25 La transformation de cellules implique la présence de cellules compétentes, c'est-à-dire de cellules à un état physiologique précis permettant la liaison et l'absorption d'ADN exogène. On ne dispose cependant d'aucune preuve de l'existence de cellules de BT compétentes.

30 On a fait état du succès de la transformation de protoplastes de BT par l'ADN avec des rendements seulement très faibles, à savoir sensiblement plus faibles que ceux obtenus avec la transformation de *B. subtilis*. Les rendements faibles peuvent être dus en partie à la régénération médiocre  
35 des protoplastes, y compris du protoplaste transformé. Bien

que Shall et coll. (Fundamental and applied aspects of invertebrate Pathology - Aspects fondamentaux et appliqués de la pathologie des invertébrés -, édité par R.A. Samson, J.M. Vlak et D. Peters, 1986, page 402) annoncent qu'ils ont optimisé la procédure employant des protoplastes et qu'ils ont mis au point des milieux de régénération améliorés pour transformer BT ou *B. cereus* avec le plasmide ADN, ils ne précisent pas la nature de l'optimisation ou de l'amélioration.

10 Les fréquences de transformation indiquées par Shall et coll. sont donc difficiles à interpréter.

La présente invention a maintenant pour objet un procédé amélioré de transformation de BT. Il est basé sur la découverte que les microorganismes de BT développent ce que l'on appelle un statut de compétence lorsqu'ils sont introduits dans un milieu aqueux hypertonique.

15 Le terme "hypertonique", tel qu'il est utilisé dans la présente invention, concerne un milieu qui est hypertonique vis-à-vis des milieux de BT classiques (culture ou croissance cellulaire).

20 Le procédé de l'invention met en jeu les étapes qui consistent :

- a) à cultiver des cellules de BT dans un milieu aqueux hypertonique,
- 25 b) à introduire dans la culture cellulaire obtenue dans l'étape a), et en présence de polyéthylène-glycol, de l'ADN exogène tout en maintenant l'état hypertonique, et
- c) à isoler et à remettre en suspension les cellules de BT ainsi traitées dans un milieu aqueux hypertonique pour permettre l'expression.

30 En principe, on peut employer tout composé qui ne traverse pas la membrane cellulaire semi-perméable et qui n'est pas métabolisé par, ou toxique vis-à-vis de, la cellule de BT, pour obtenir l'état hypertonique recherché. En général, l'état hypertonique recherché est avantageusement obtenu à

35

l'aide de saccharides, en particulier de mono- ou de di-saccharides, qui ne sont pas métabolisés par BT. Des exemples convenables de ces saccharides sont le saccharose et le lactose.

5           La concentration des saccharides à employer pour obtenir l'état hypertonique recherché est avantageusement de l'ordre de 0,4M de saccharides par litre de milieu aqueux, ou supérieure. En général, on obtiendra de bons résultats avec des concentrations essentiellement isotoniques vis-à-  
10 vis du cytoplasme de BT. Cet état osmotique est en général obtenu avec une concentration de 0,4M à 0,5M de saccharides par litre de milieu aqueux. Des concentrations supérieures en saccharides peuvent être cependant employées, mais elles n'offrent en général aucun avantage.

15           Le terme "hypertonique" employé ci-dessous concerne un état ou un milieu tel que défini ci-dessus.

Il est important que les conditions hypertoniques soient essentiellement maintenues d'un bout à l'autre des différentes étapes a) à c) du procédé.

20           Les milieux aqueux hypertoniques doivent être essentiellement neutres, c'est-à-dire qu'ils doivent avantageusement avoir un pH de  $7 \pm 2$ , mieux encore de  $7 \pm 1$ .

En plus des saccharides (servant à maintenir l'état hypertonique) et des tampons éventuels (servant à maintenir un  
25 état essentiellement neutre du milieu) d'autres ingrédients peuvent être et seront ajoutés, par exemple pour permettre la croissance et le développement de la culture de BT, le cas échéant, etc.

30           Ces ingrédients supplémentaires sont classiques et connus de l'homme de métier; ils comprennent, par exemple, des nutriments et des sels.

Des exemples de nutriments convenables sont, par exemple, l'extrait de boeuf, l'extrait de levure, les peptones, les tryptones, les acides aminés (par exemple le  
35 tryptophane), les nucléosides comme la thymidine et ana-

logues.

Des exemples de sels convenables sont NaCl et  $MgCl_2, 6H_2O$ . Un milieu hypertonique convenable peut contenir de 0,05 à 0,1M de sels par litre. Les sels engloberont de préférence les sels de magnésium, comme  $MgCl_2, 6H_2O$ .

La culture cellulaire de BT (produit de départ) est avantagement préparée et cultivée dans des conditions classiques, c'est-à-dire sous aération et à la température ambiante, dans un milieu nutritif approprié, par exemple dans le milieu minimal décrit par J. Spizizen dans Proc. natl. Acad. Sci. (Wash), 44, 171-175 (1958), éventuellement supplémenté par des acides aminés, des sels, par exemple des quantités catalytiques de sel de manganèse tel que  $MnSO_4$ , etc. Il est avantageux d'employer, dans l'étape a), une culture de cellules de BT qui se trouve dans la phase de croissance exponentielle.

La culture de cellules de BT fraîchement préparée est ensuite diluée dans un milieu hypertonique à une concentration cellulaire de départ essentiellement inférieure à  $10^9$  cellules par ml, par exemple de  $10^4$  à  $10^6$  cellules par ml, et la culture cellulaire est cultivée, dans ledit milieu hypertonique, jusqu'à ce que l'on obtienne un milieu de concentration cellulaire légèrement inférieure à  $10^9$  cellules par ml, par exemple de  $10^8$  à  $5 \cdot 10^8$  cellules par ml.

Le milieu hypertonique employé pour diluer la culture de cellules de BT fraîchement préparée est avantagement à 20-40°C, par exemple à 37°C. On laisse ensuite la culture s'effectuer à cette température. Il est bien évident qu'il faut garantir une aération poussée. Une légère quantité de silicone est avantagement ajoutée au milieu de culture cellulaire pour empêcher le moussage.

Lorsqu'on atteint la concentration cellulaire finale souhaitée (légèrement inférieure à  $10^9$  cellules par ml), on peut traiter les cellules de BT compétentes ainsi préparées avec l'ADN, en présence de polyéthylène-glycol (PEG), selon

l'étape b) du procédé de l'invention.

Il est toutefois avantageux de traiter les cellules de BT compétentes obtenues selon l'étape a) de l'invention avec des concentrations modérées de lysozyme dans un milieu hypertonique et d'isoler et de remettre en suspension les cellules de BT traitées au lysozyme dans un milieu hypertonique, avant de les soumettre au processus b). La quantité de lysozyme à employer doit être inférieure à celle qu'on utilise normalement pour préparer des protoplastes. Cette quantité (concentration) dépendra bien entendu de divers facteurs comme la pression osmotique du milieu, sa température, la durée de réaction souhaitée, etc. En général, une concentration convenable en lysozyme est de 20 à 300 µg, par exemple de 200 µg, par ml de milieu aqueux hypertonique (ce qui est essentiellement inférieur aux 2 à 15 mg par ml qui seraient normalement nécessaires pour des applications concernant des protoplastes). Il faut garantir une distribution adéquate du lysozyme dans le milieu de culture cellulaire. La durée de réaction dépendra donc de la concentration et de la qualité de la solution de lysozyme employée. La durée de réaction optimale peut être déterminée par des essais standards.

La température réactionnelle est avantageusement comprise entre 20 et 40°C, de préférence supérieure à la température ambiante, par exemple d'environ 37°C.

Pendant le traitement au lysozyme, il faut maintenir l'état hypertonique, tel que défini ci-dessus.

Le traitement au lysozyme est ensuite terminé par centrifugation de la suspension cellulaire et remise en suspension des agrégats dans le milieu hypertonique, avantageusement à la température ambiante.

La culture des cellules de BT ainsi préparée - obtenue selon l'étape a), éventuellement suivie du traitement au lysozyme - est ensuite traitée avec de l'ADN, par exemple le plasmide ADN, en présence de polyéthylène-glycol (PEG). Dans

ce but, l'ADN, ainsi que le PEG, sont employés en suspensions/solutions dans des solutions hypertoniques, de sorte que la pression osmotique de la suspension cellulaire demeure essentiellement inchangée après l'addition d'ADN et de  
5 PEG à cette suspension cellulaire.

La quantité de PEG employée sera avantageusement choisie de telle sorte que sa concentration dans la culture de cellules de BT se situe dans l'intervalle de 100 à 400 g par litre, par exemple à 300 g par litre de milieu de culture  
10 cellulaire.

L'étape de transformation b) peut être essentiellement réalisée dans les conditions connues comme étant appropriée aux procédés classiques de transformation des protoplastes.

En conséquence, le choix de la quantité appropriée et  
15 du type approprié de PEG et de la quantité appropriée d'ADN à employer peut être effectué convenablement par l'homme du métier de la transformation des protoplastes.

Ainsi, un exemple de PEG utilisable dans ce procédé est le PEG 6000.

20 Des quantités d'ADN de 100 ng à 20 µg pour  $10^8$  à  $10^9$  cellules de BT donneront en général de bons résultats.

L'incubation est avantageusement réalisée sous agitation modérée à la température ambiante. Le temps d'incubation nécessaire est court, en général de l'ordre de quelques  
25 minutes (voir l'exemple).

La suspension comprenant les cellules transformées est ensuite traitée à l'aide de procédés connus, à condition que l'état hypertonique du solvant des cellules soit maintenu (dans le cas où elles sont en solution/suspension). Ainsi,  
30 la suspension est, par exemple, diluée dans une solution hypertonique, la suspension est mélangée, centrifugée et les agrégats remis en suspension dans le milieu hypertonique.

La suspension résultante est ensuite incubée à une température de 20 à 40°C, par exemple à 37°C, pour permettre  
35 l'expression. La suspension est avantageusement aérée, par

exemple à l'aide d'un bain marie agité . Un temps d'incubation approprié est de 30 minutes à 5 heures, mieux encore compris entre 2 et 4 heures, par exemple 3 heures.

On peut ensuite placer des dilutions appropriées des cultures cellulaires ainsi obtenues dans des boîtes de Pétri pour déterminer les unités formant colonie (CFU). On peut déterminer la fréquence de transformation par des procédés connus employant des techniques standard, comme des boîtes de Pétri contenant un antibiotique, l'observation visuelle, etc.

Le procédé de la présente invention permet la transformation de cellules de BT avec des rendements élevés. La transformation permet le clonage de gènes de bibliothèques de génomes dans des cellules de BT, le clonage et l'expression de gènes de DET dans BT, le clonage et l'expression de gènes de DET modifiés in vitro et in vivo dans BT, la synthèse de polypeptides utiles, etc.

Lorsque les cellules de BT transformées sont destinées à être utilisées comme pesticides biologiques, elles sont avantageusement employées sous forme de compositions insecticides, par exemple sous forme de suspensions concentrées ou sous forme de poudres. Ces compositions peuvent être obtenues d'une manière classique.

Dans l'exemple non limitatif suivant, les produits de départ (cellules de BT et plasmide ADN) sont choisis de telle sorte que les résultats ne soient pas ambigus et ne puissent être dus à une interaction du plasmide; les cellules de BT utilisées comme produit de départ ne contiennent pas de plasmides, le plasmide ADN utilisé comme agent de transformation encodant pour la résistance à la tétracycline.

On remarquera que d'autres cellules de BT et/ou d'ADN exogènes, en particulier un plasmide ADN, peuvent être utilisées dans le procédé de l'invention avec des résultats analogues.

Les températures sont exprimées en centigrades et les parties en poids, sauf indication contraire.

Exemple

Produits de départ

5        Souche : Bacillus thuringiensis, sous-espèce kurstaki  
HD1 cry B (obtenue auprès de M.-M. Lecadet, Institut Pasteur, Paris), ne contenant pas de plasmides.

10        ADN : pBC16.1 (Kraft. J. et coll. (1978) Molec. gen. Genet. 162; 59-67), extrait de HD1 cry B (pBC16.1), dans lequel il a été introduit par conjugaison par adaptation cellulaire avec B. subtilis BD224 (pBC16.1), codant pour la résistance à la tétracycline.

Milieux

15        SA Trp : Milieu minimal spizizen (Spizizen J. (1958) Proc. natl. Acad. Sci. (Wash.) 44; 171-175) supplémenté par des Casaminoacides à 1% (Difco),  $5 \times 10^{-6}M$  de  $MnSO_4$  et 20  $\mu g/ml$  de tryptophane.

Milieu hypertonique (MH) :

	Extrait de boeuf	1,50 g/l
20	Peptone	5,00 g/l
	NaCl	3,50 g/l
	Saccharose	171,15 g/l
	Acide maléique	2,32 g/l
	$MgCl_2, 6H_2O$	4,07 g/l
25	pH 6,7	

Milieu Luria (LA) :

	Tryptone	10 g/l
	Extrait de levure	5 g/l
	NaCl	10 g/l
30	Gélose (Difco Bacto)	15 g/l
	Thymidine	20 mg/l

Antibiotiques : Tétracycline, 10-100  $\mu g/ml$  sur des plaques à milieu Luria.

Solutions

35        SMM :

Saccharose	171,15 g/l
Acide maléique	2,32 g/l
MgCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	4,07 g/l
pH 6,5	

5     PEG :

PEG 6000	40 g
SMM	qsp 100 ml

Lysozyme : 2 mg/ml dans MH, fraîchement préparé.

Procédé

10     On prépare une culture d'une nuit de HD1 cry B dans 15 ml de SA Trp et on la fait croître sous aération à 20°C. Le lendemain matin, la culture est diluée à 50-100 fois dans un milieu MH préchauffé, jusqu'à une concentration cellulaire de départ de  $7,5 \times 10^5$  par millilitre. On ajoute 2 µl de silicone pour empêcher le moussage. La culture croît

15     37°C sous aération modérée pendant trois heures et demie, à savoir jusqu'à une concentration cellulaire de  $2,5 \times 10^8 - 3 \times 10^8$  par ml. Le lysozyme est ajouté jusqu'à une concentration finale de 200 µg/ml et 1 ml de suspension cellulaire

20     est incubé pendant 30 minutes à 37°C, dans un bain maris agité (150 t/min). La suspension cellulaire est ensuite centrifugée pendant une minute sous 10 000 G et les agrégats sont remis en suspension dans 1 ml de MH frais à la température ambiante.

25     On ajoute 0,5 ml de suspension cellulaire à 50 µl de SMM, auxquels ont été ajoutés 100 ng-10 µg de plasmide ADN. Les cellules sont transformées par addition de 1,5 ml de solution de PEG, agitation modérée et incubation de 2 min. à la température ambiante. On ajoute 5 ml de MH à la suspension

30     cellulaire, que l'on mélange doucement mais à fond et que l'on centrifuge pendant 20 minutes sous 3000 G. On remet les agrégats en suspension dans 0,6 ml de MH et on incube pendant 3 heures à 37°C dans un bain marie agité (150 t/min) pour permettre l'expression. On place les dilutions

35     appropriées dans des boîtes à longue durée d'action pour dé-

terminer les CFU et dans des boîtes à longue durée d'action contenant de la tétracycline pour la sélection de la substance transformatrice.

On obtient  $1-2 \times 10^3$  substances transformatrices par  $\mu\text{g}$  de plasmide ADN intact, avec une fréquence de  $5 \times 10^{-5} - 10^{-4}$ .

10

15

20

25

30

35

R E V E N D I C A T I O N S

- 1.- Procédé de transformation de cellules de *Bacillus thuringiensis*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes qui consistent :
- 5 a) à cultiver des cellules de *Bacillus thuringiensis* dans un milieu aqueux hypertonique,  
b) à introduire dans la culture cellulaire obtenue dans l'étape a), et en présence de polyéthylène-glycol, de l'ADN exogène tout en maintenant l'état hypertonique, et  
10 c) à isoler et à remettre en suspension les cellules de *Bacillus thuringiensis* ainsi traitées dans un milieu aqueux hypertonique pour permettre l'expression.
- 2.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on traite la culture de cellules de *Bacillus thuringiensis*  
15 de l'étape a) avec des concentrations modérées de lysozyme, tout en maintenant les conditions hypertoniques, et en ce que l'on isole les cellules de *Bacillus thuringiensis* ainsi traitées et on les remet en suspension dans un milieu aqueux hypertonique avant le traitement selon les étapes b) et c).
- 20 3.- Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'on obtient l'état hypertonique en employant des saccharides qui ne sont pas métabolisés par *Bacillus thuringiensis*.
- 4.- Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que  
25 l'on emploie au moins 0,4M de saccharides par litre de milieu aqueux.
- 5.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la concentration initiale en cellules de *Bacillus thuringiensis* introduite dans l'étape a)  
30 est de  $10^4$  à  $10^6$  cellules par ml de milieu et en ce que les cellules sont cultivées jusqu'à une concentration de  $10^8$  à un peu moins de  $10^9$  cellules par ml de milieu.
- 6.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que la concentration en lysozyme est de  
35 20 à 300 microgrammes par ml de milieu aqueux.

- 7.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le milieu hypertonique a un pH dans l'intervalle de 6 à 8.
- 5 8.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le milieu hypertonique comprend un sel de magnésium.
- 9.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il est réalisé à une température comprise entre 20 et 40°C.
- 10 10.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'on emploie 100 nanogrammes à 20 microgrammes d'ADN pour  $10^8$  à  $10^9$  cellules de *Bacillus thuringiensis*.
- 15 11.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'on emploie 100 à 400 g de polyéthylène-glycol par litre de culture cellulaire.
- 12.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'on maintient l'état hypertonique de l'étape c) pendant 30 minutes à 5 heures.

20

25

30

35



Office européen  
des brevets

### RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
de la loi belge sur les brevets d'invention  
du 28 mars 1984

Numero de la demande  
nationale

BE 8701466  
BO. 701

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
X	FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 12, 1981, pages 253-256, Federation of European Microbiological Societies; V.I. MITEVA et al.: "Transformation of Bacillus thuringiensis protoplasts by plasmid DNA" * Page 253, colonne 2, ligne 19 - page 254, ligne 39 *	1-7, 9-11	
Y	Idem	8, 12	
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 94, no. 17, 27 avril 1981, page 424, résumé no. 135910h, Columbus, Ohio, US; P.A.W. MARTIN et al.: "Transformation of Bacillus thuringiensis protoplasts by plasmid deoxyribonucleic acid", & J. BACTERIOL. 1981, 145(2), 980-3 * En entier *		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 21, 24 mai 1982, page 155, résumé no. 175127f, Columbus, Ohio, US; R.R. AZIZBEKYAN et al.: "Plasmid transformation of Bacillus thuringiensis protoplasts", & DOKL. AKAD. NAUK SSSR 1982, 262(1), 226-8 [GENET.] * En entier *		C 12 N
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 104, no. 13, 31 mars 1986, page 182, résumé no. 103548e, Columbus, Ohio, US; & JP-A-60 188 069 (NAKANO VINEGAR CO., LTD) 25-09-1985 * En entier *	8, 12	
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		07-04-1988	PULAZZINI A. F. R.
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></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 antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

## ABSENCE D'UNITE D'INVENTION

La présente demande ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir

1. Revendications :
2. Revendications :
3. Revendications :
4. Revendications :

Le présent rapport de recherche a été établi de façon complète pour les parties de la demande qui se rapportent à l'invention ou pluralité d'inventions mentionnée dans les revendications:

## ETENDUE DE LA RECHERCHE

Compte tenu des documents considérés comme pertinents, le présent rapport de recherche a été établi de façon complète pour les parties de la demande qui se rapportent à l'invention ou pluralité d'inventions mentionnée en premier lieu dans les revendications, à savoir les revendications :

Les éléments figurant dans les

1. Revendications :
2. Revendications :
3. Revendications :
4. Revendications :

n'ont pas été pris en considération que dans le cadre de la recherche relative aux caractéristiques de l'invention ou de la pluralité d'inventions mentionnée en premier lieu dans les revendications



Office européen  
des brevets

**RAPPORT DE RECHERCHE**

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
de la loi belge sur les brevets d'invention  
du 28 mars 1984

Numero de la demande  
nationale  
Page 2

BE 8701466  
BO 701

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
A	EP-A-0 178 151 (AGRICULTURAL GENETICS CO. LTD)		
P, X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, no. 17, 27 avril 1987, page 381, résumé no. 135067e, Columbus, Ohio, US; A. HEIERSON et al.: "Transformation of vegetative cells of Bacillus thuringiensis by plasmid DNA", & J. BACTERIOL. 1987, 169(3), 1147-52 * En entier *	1, 2	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		07-04-1988	PULAZZINI A.F.R.
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></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 antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 03.82 (P0448)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BE 8701466  
BO 701

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 25/04/88.  
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 brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0178151	16-04-86	GB-A- 2165261	09-04-86
		AU-A- 4835285	17-04-86
		JP-A- 61181372	14-08-86
-----			

EPO FORM P043

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