

r1



MINISTÈRE DES AFFAIRES ÉCONOMIQUES

N° 881.864

Classif. Internat. : C12N/C07D

Mis en lecture le : 16-06-1980

Le Ministre des Affaires Économiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention ;

Vu le procès-verbal dressé le 22 février 1978 à 14 h. 30
au Service de la Propriété industrielle ;

ARRÊTE :

Article 1. — *Il est délivré à la Sté dite : RICHTER GEDEON VEGYESZETI*
GYAR RT ,
Gyömroi ut, 21, à Budapest (Hongrie),
repr. par le Cabinet Bede à Bruxelles,

un brevet d'invention pour : Procédé pour la préparation de cultures
de spores d'une souche virulente de claviceps purpurea
sur seigle produisant de l'ergocristine,

Article 2. — *Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et*
périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit
de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention
(mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui
de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 14 mars 1978

PAR DÉLÉGATION SPÉCIALE :

Le Directeur

L. SALPETEUR

881054

27434~67

La Société dite: RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR RT
à Budapest
(Hongrie)

"Procédé pour la préparation de cultures de spores d'une
souche virulente de claviceps purpurea sur seigle,
produisant de l'ergocristine"

La présente invention concerne un procédé pour la préparation d'une culture de spores d'une nouvelle souche virulente de *Claviceps purpurea* sur des plantes de seigle, produisant de l'ergocristine.

5 A ce jour, on connaît deux voies distinctes pour la préparation d'alcaloïdes d'ergot de seigle. Il existe d'une part un procédé classique dans lequel des drogues cultivées et recueillies sur des plantes de seigle sont utilisées en tant que substances de départ et les alca-
10 loïdes sont obtenus à partir de celles-ci par extraction. D'autre part, on sait produire des alcaloïdes à partir de souches de *Claviceps* appropriées par fermentation stérile. A ce jour on connaît déjà plusieurs procédés réalisables industriellement pour la mise en oeuvre
15 de cette seconde méthode (voir par exemple les brevets hongrois n° 150 631, 151 724, 152 238 et 164 816). Cependant, la culture de drogues d'ergot de seigle a conservé toute sa valeur. En effet, une partie importante de la production mondiale d'alcaloïdes peptidiques est
20 encore aujourd'hui obtenue par différentes drogues cultivées, enrichies du type alcaloïde. Ceci est en particulier le cas de la production d'ergocristine et d'ergotamine. La chaîne latérale d'alcaloïdes peptidiques consiste en proline, un groupe d'acides aminés caracté-
25 ristiques ainsi que d'un acide aminé caractéristique

9

spécifique dudit alcaloïde (à l'intérieur du groupe précité).
Le groupe amino-acide caractéristique relatif aux deux
alcaloïdes précités (ergocristine et ergotamine) est la
phénylalanine. Il est cependant extrêmement difficile
5 d'assurer le développement et la surproduction de
phénylalanine pendant la biosynthèse fermentative qui
se déroule à l'intérieur d'un intervalle de temps de
quelques jours, étant donné que pendant la même période
de temps se déroule également la genèse biosynthétique
10 de la fraction acide lysergique de la molécule d'alcaloïde
et que de surcroît, d'importantes quantités de tryptophanes
sont nécessaires à la synthèse des amino-acides aromatiques.
Au cours de l'entretien de la souche et des réinfestations
successives, la fraction initialement présente de la souche
15 produisant l'ergotamine et l'ergocristine peut être décalée
par la régulation d'égalisation des voies de métabolisme
dans le sens de la production d'ergocornine puis ensuite
d'alcaloïdes hydrosolubles. Cette circonstance particulière
a également contribué au fait que divers procédés de
20 fermentation n'ont pas pu être reproduits par la suite
avec succès (voir par exemple brevet tchécoslovaque n°
104 613, brevet allemand n° 1 215 637 et brevet britannique
n° 1 192 912). Etant donné que dans les procédés fondés
sur le traitement de drogues on ne rencontre pas de telles
25 difficultés, ces procédés seront certainement utilisés
à une grande échelle dans l'avenir et il subsiste la
nécessité d'apporter certains développements technologiques
à de tels procédés. La condition fondamentale d'un tel
développement consiste cependant en la production de
30 souches de *Claviceps purpurea* dotées d'une aptitude
élevée à la production d'alcaloïdes.

Différents procédés pour la production de souches
de *Claviceps purpurea* ayant une bonne aptitude à la

9

- production d'alcaloïdes d'ergoline sont déjà décrits dans de nombreux brevets. Diverses voies ont déjà été proposées pour obtenir des souches dotées d'aptitude de production élevée. Conformément au procédé décrit
- 5 dans le brevet soviétique n° 232 468, une souche pour la production d'ergotoxine a été sélectionnée en tenant compte des propriétés morphologiques de colonies particulières, ainsi que des caractéristiques des spores. Dans le brevet soviétique n° 232 467 se trouve décrite
- 10 une souche produisant 80 % d'ergocryptine, qui présente des propriétés morphologiques sensiblement voisines de celles précédemment évoquées lorsqu'elle est cultivée sur des milieux de culture synthétiques. Dans le brevet hongrois n° 154 035 se trouve décrit un procédé qui peut
- 15 être mis en oeuvre rapidement et de façon efficace, selon lequel les cultures aptes à produire de l'ergotoxine peuvent être enrichies en fonction de la couleur des colonies par rapport aux représentants produisant l'ergotamine.
- 20 Pour la préparation de souches à production élevée d'alcaloïdes, il est nécessaire d'observer les principales étapes suivantes :
1. la culture d'une souche de *Claviceps purpurea* améliorée;
 2. la préparation de spores appropriées pour infestations
 - 25 de plantes de seigle par multiplication fermentative de la souche ;
 3. la conservation de ces spores jusqu'à leur utilisation.
- La présente invention a eu pour but de préparer une telle souche particulière présentant une aptitude élevée
- 30 de production d'ergocristine, pareille souche présentant en particulier les propriétés avantageuses suivantes :
- la souche présente une bonne sporulation sur des milieux de culture synthétiques, aussi bien que sur des surfaces agar ainsi que sur des cultures submergées et aérées ;
- 9

- les spores sont suffisamment résistantes et par suite sont dotées de bonnes propriétés de conservation ;
- les spores sont viables et virulentes, de sorte que lorsqu'elles sont à nouveau amenées dans un milieu de culture, elles germent à raison d'environ 98 à 100 % et lorsqu'elles sont appliquées à la plante elles produisent une infestation efficace de cette dernière ;
- la quantité de drogues produite par unité de surface est élevée, et
- 10 - la drogue présente une teneur élevée en alcaloïdes principaux et contient à côté de ces alcaloïdes principaux seulement des quantités insignifiantes d'alcaloïdes secondaires.

15 Selon la présente invention, la nouvelle souche est obtenue par utilisation combinée d'une amélioration sexuée et sélective, de la manière suivante :

A partir de la souche de départ, qui est enregistrée sous le n° 661/1974 dans la collection de l'Institut de Recherche hongrois de plantes officinales, on sélectionne en se plaçant d'un point de vue morphologique des sclérotés présentant une surface lisse, qui sont susceptibles d'un bon développement et qui sont parfaitement exempts de défaut. Ces sclérotés sont posés sur du sable humide et sont maintenus pendant environ 6 semaines à 25 une température environ comprise entre 0 et 5°C. Les sclérotés sont ensuite lavés et déposés sur une éponge humide maintenue dans des conditions stériles. Après 12 jours commence le développement de stromata; les stromata apparus se sont entièrement développés en environ 6 jours.

30 Pour l'obtention de spores on a sélectionné les stromata des sclérotés qui n'ont produit que quelques (3 à 4) têtes de champignon ou têtes à peritheces ; parmi ceux-ci on a prélevé les stromata présentant un diamètre supérieur à 4 mm et dont l'analyse microscopique révèle en surface les

plus grands bombements de peritheces. Ces stromata
sont ensuite amenés dans des conditions de sporulation
sur un milieu nutritif liquide de malt , dans des condi-
tions stériles et sous l'influence de la chaleur. Sous
5 contrôle microscopique, un liquide contenant des ascospores
est ensuite amené dans des conditions de propagation sur
un milieu nutritif solide malt - agar. Les colonies obtenues
à partir d'une telle spore sont alors sélectionnées au
vue de leur rythme de développement et de leur aptitude
10 à la formation de spores. Les spores des colonies sélectionnées
sont isolées selon leur multiplication et placées
dans des conditions parasites, c'est-à-dire que les
épis des plantes de seigle avant l'anthesis sont infestés
avec ces spores à l'aide de seringues d'inoculation.
15 A partir de ces plantes de seigle sont alors sélectionnés
les sclérotés parmi lesquels le développement de sclérotés
est obtenu à l'intérieur d'une courte période après appa-
rition du miellat. Les grains sélectionnés de cette manière
sont alors analysés par chromatographie en couche mince.
20 La sélection ultérieure a été réalisée en tenant compte
de la teneur en ergocristine ainsi que de la teneur
en alcaloïdes secondaires non purs présents.

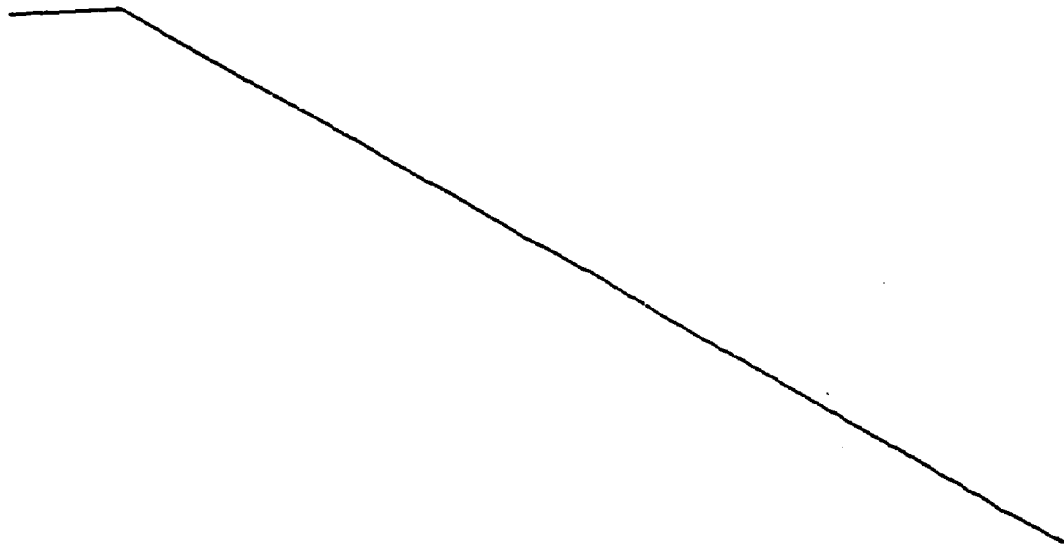
Les cultures de sclérotés obtenues de cette manière
par amélioration sexuée sont alors soumises à une autre
25 série de sélections; à partir des particules de sclérotés,
des colonies sont cultivées sur des milieux de culture
solides et à l'aide de ceux-ci des milieux de culture
liquides sont inoculés. A partir de ces cultures submergées
ainsi réalisées on sélectionne alors dans des essais en
30 plein champ. des cultures qui sporulent le mieux et qui
présentent la plus grande viabilité et la plus forte
virulence, en tenant compte de la quantité et de la teneur
moyenne des alcaloïdes produits par la drogue.

SECRET

Conformément à ce processus, on réalise une autre série de sélections comprenant des étapes successives de cycles de multiplication, ce qui permet d'obtenir une nouvelle souche de *Claviceps purpurea* dotée de propriétés bien supérieures à celles des souches précédemment connues.

La nouvelle souche, enregistrée sous le n° 00163 auprès de l'Institut National hongrois pour l'hygiène publique (OKI), s'est révélée particulièrement appropriée pour la production industrielle de préparation de spores d'inoculation, étant donné qu'elle permet d'élever considérablement la production de spores de la fermentation. On notera également que cette souche présente des propriétés tout particulièrement intéressantes dans la production en plein champ de drogues, elle augmente en effet le rendement de la production de drogues et en améliore la qualité de façon notable.

Dans les tableaux figurant ci-après on a rassemblé un certain nombre de résultats obtenus avec la nouvelle souche OKI 00163 et, à titre de comparaison, avec la souche de départ n° 661/1974 de l'Institut de Recherche hongrois de plantes officinales. Les essais réalisés sont des essais de fermentation et des essais en plein champ.



	OKI 00163	661/1974
Aptitude à la production de spores sur la surface	$1-2.10^9$	$0,5-1.10^9$
Nombre de spores du bouillon de fermentation, spores/ml	$4-5.10^8$	$1-2.10^8$
Pouvoir germinatif de la préparation de spores d'inoculation, %	95-99	90-96
Virulence (conception dans le Phytotron, en % des piqûres)	70-80	50-60
Poids de 1000 grains, g	175-200	140-170
Production de drogues kg/ha (au pilote)	200-350	150-220
Teneur en ergocristine mg/g	5,0-6,2	2,6-3,6
Alcaloïdes secondaires : Ergométrine, mg/g	0,2-0,3	0,1-0,2
Ergotamine, mg/g	traces	0,05-0,1
Teneur en huiles grasses, %	15-20	16-18
Production d'ergocristine g/ha [moyenne kg/ha.. moyenne mg/g]	1540	590

Caractérisation morphologique de la nouvelle souche obtenue par la sélection faite dans le cadre de l'invention, ainsi que de la souche de départ :

Souche OKI 00163 - a) Malt-agar :

- 5 Après 28 jours colonies blanches, de grandeur allant de 0,5 à 0,6 cm, avec de courtes mycelles aériennes ; formation de conidies à partir du douzième jour ; répartition des grandeurs de conidies : 1,3 à 3,8 μ m avec une grandeur la plus fréquente de 2,5 μ m.

9

b) Mannitol-citrate-agar :

Après 28 jours colonies plissées, planes, de couleur crème et de grandeur allant de 1,0 à 1,5 cm ; formation de conidies débutant à partir du quinzième jour.

- 5 c) Grandeur moyenne des conidies (à partir de 100 grains pris au hasard) 2,5 μ m ; surface lisse.

Souche de départ 661/1974

a) Malt-agar :

- 10 Après 28 jours colonies blanches-grises, de grandeur allant de 0,8 à 12,0 cm avec des mycelles aériennes déployées ; formation de conidies à partir du quinzième jour ; grandeur moyenne des conidies : 3,4 μ m.

b) Mannitol-citrate-agar :

- 15 Après 28 jours colonies blanches, de grandeur allant de 1,5 à 2,0 cm, feutrées et déployées ; formation de conidies à partir du vingtième jour ; grandeur moyenne des conidies : 4 μ m.

c) Grandeur moyenne des sclérotés (à partir de 100 grains pris au hasard) 18 mm, surface extérieure fendillée.

- 20 La production de spores d'inoculation de la fermentation se trouve multipliée par deux du fait de l'utilisation de la nouvelle souche ; la production des drogues se trouve améliorée de 50 % et la teneur en alcaloïdes de la drogue obtenue se trouve améliorée de presque
25 100 %. Le rendement en alcaloïdes se trouve également très favorablement influencé du fait de la teneur essentiellement plus élevée en alcaloïdes. A titre d'exemple d'autres avantages, on peut encore mentionner que l'augmentation de la teneur en alcaloïdes n'est pas accompa-
30 gnée d'une augmentation correspondante de matières grasses, de sorte que la quantité relative de matières grasses présentes dans la drogue devient très faible.

- 35 Le procédé selon l'invention sera illustré plus en détail à l'aide des exemples non limitatifs de mise en oeuvre particuliers mentionnés ci-après.

9

Exemple 1

Dans un fermenteur en verre d'une capacité de 5 litres, on inocule une culture de souche OKI 00163 malt-agar vieille de 24 jours sur un milieu de culture répondant à la composition suivante :

5 extrait de malt 2,0 %
 poudre de pomme de terre..... 1,0 %
 glucose 0,5 %
 pH du milieu de culture 6,0

10

La culture est incubée pendant 3 jours à 24°C, sous une agitation de 440 Tr/min., sous aération à l'aide de 0,5 litre d'air par litre de liquide de fermentation et par minute.

15

A l'aide de la culture d'inoculum obtenue comme indiquée ci-dessus, on inocule alors 100 litres d'un milieu de culture répondant à la composition suivante :

mannitol 8,0 %
 acide citrique 0,7 %
 20 liqueur de trempage de maïs (calculée
 en % de substance sèche) 0,1 %
 phosphate dihydrogéné de potassium 0,025 %
 sulfate de magnésium 0,025 %

25

La fermentation est réalisée dans une cuve de fermentation d'une capacité de 160 litres, résistante aux acides et équipée d'un dispositif d'agitation.

30

L'incubation est poursuivie pendant 6 jours à 24°C, sous agitation à 230 Tr/min., sous aération à l'aide de 1,0 litre d'air par litre de liquide de fermentation et par minute, et dans des conditions de pH de 4,5 à 5,0. La valeur du pH du liquide de fermentation est maintenue dans les limites indiquées par addition d'hydroxyde d'ammonium.

A la fin de l'opération de fermentation, le liquide de fermentation présente un nombre de spores de $4,2 : 10^8$ /ml.

5 La biomasse obtenue est séparée, diluée à l'aide de 30 litres d'une solution à 10 % de saccharose, placée dans des bouteilles et conservée sous réfrigération à basse température.

10 La préparation de spores d'inoculation obtenue comme indiqué ci-dessus présente un pouvoir germinatif de 99 %. Cette préparation de spores d'inoculation est alors diluée jusqu'à une concentration de 30 000 spores/mm³ et utilisée dans cet état pour l'infestation de plantes de seigle avant la formation d'épis. A partir du produit de la récolte on obtient ainsi 250 kg de drogue par ha ; la teneur de la

15 drogue en huiles grasses atteint 20 %.

Teneur en ergocristine : 6,2 mg/g

Teneur en ergotamine : 0,1 mg/g

Teneur en ergométrine : 0,2 mg/g

Exemple 2

20 La souche OKI 00163 est incubée pendant 21 jours à 24°C sur malt-agar. Les spores obtenues sont lavées à partir de la surface de la culture avec une solution physiologique stérile de sel de cuisine. Au moyen de cette solution saline contenant des spores, on infeste

25 alors des plantes de seigle cultivées au phytotron. Les spores sont apportées au corps des plantes au moyen d'une seringue d'injection, à raison de 5 piqûres par épi. A titre de comparaison, on effectue le même processus dans les mêmes conditions à l'aide de la souche de

30 départ 661/1974. A chaque fois 100 épis ont été infestés à partir de chaque souche.

Les sclérotés entièrement développés ont été collectés à l'état de maturité. Les résultats obtenus au cours de

l'expérimentation ont été rassemblés dans le tableau suivant :

Souche	nombre de sclérotés	Poids total des sclérotés	teneur en ergocristine mg/g
OKI 00613	470	79 g	5,9
661/1974	420	57 g	3,0

Exemple 3

Une culture de la souche OKI 00163, vieille de 28 jours, cultivée sur malt-agar est lavée avec une solution stérile de sel de cuisine, et le nombre de spores du liquide de lavage est réglé à 30 000 spores/mm³. A l'aide de cette solution, on infeste des parcelles d'essai de plantes de seigle d'une surface de 30 m² chacune au cours de quatre essais parallèles. A titre de comparaison, on réalise, dans des conditions identiques, des essais parallèles avec une culture préparée de façon rigoureusement identique à partir de la souche de départ 661/1974.

L'infestation a été réalisée à la main, à l'aide de plateaux d'infestation. Les sclérotés mûrs ont été collectés à la main sans aucune perte. Les résultats comparatifs obtenus ont été rassemblés dans le tableau suivant :

Souche	Poids de 1000 grains (g)	teneur en ergocristine (mg/g)	produit de la récolte (kg/ha)	rendement en ergocristine (g/ha)
OKI 00163	190	6,10	390	2380
661/1974	160	3,26	210	685

001004

12

REVENDEICATIONS

5 1/ Procédé pour la préparation de cultures de spores,
utilisables dans la production de drogue, d'une souche
virulente de *Claviceps purpurea* sur seigle produisant
de l'ergocristine, caractérisé en ce que l'on réalise
la culture de spores en cultivant la souche *Claviceps*
purpurea enregistrée à l'Institut National hongrois
pour l'Hygiène Publique sous le n° OKI 00163.

10 2/ Application de la souche *Claviceps purpurea*,
enregistrée à l'Institut National hongrois pour
l'Hygiène Publique sous le n° OKI 00163, à la production
d'ergocristine.

Bruxelles, le 22 février 1980

P.Pon. Richter Gedeon Vegyeszeti Gyar RT

P.Pon. CABINET BEDE, R. van Schoonbeek

