

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 510 603

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 82 13199

(54) Souche de microorganisme de l'espèce *claviceps purpurea* (FR.) Tul. CCM F-725.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 N 1/14 // C 12 P 17/18.

(22) Date de dépôt..... 28 juillet 1982.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : CS, 28 juillet 1981, n° PV 5731-81.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 5 du 4-2-1983.

(71) Déposant : SPOFA SPOJENE PODNIKY PRO ZDRAVOTNICKOU VYROBU. — CS.

(72) Invention de : Karin Strnadova, Jan Zdanova Kybal, Eduard Hruskova Svoboda et Jiri Spacil.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Bert, de Keravenant et Herrburger,
115, bd Haussmann, 75008 Paris.

SOUCHE DE MICROORGANISME DE L'ESPECE CLAVICEPS
PURPUREA (FR.) Tul. CCM F-725

L'invention concerne un micro-organisme de l'espèce *Claviceps Purpurea* (Fr.) Tul. CCM F-725, qui constitue une souche nouvelle. Cette 15 souche a été obtenue par l'amélioration, sur une période prolongée, d'une souche utilisée pour la culture en champs d'ergots contenant de l'ergocornine et de l'ergocryptine, (1974/K.Strnadova, J.Kybal, *Folia Microbiol.* 19, 272, 1974). Au cours de cette amélioration, il a été obtenu une souche CCM F-508 (Certificat 20 d'Auteur Tchécoslovaque n°176 803), qui a été également utilisée pour la production sur champs. Cette souche appartient également à la race chimique ergocornine-ergocryptine, et produit en culture sur 25 champ des sclérotia contenant 0,5% en poids d'alcaloïdes en matière sèche, en moyenne, le rapport en poids de ces deux alcaloïdes étant de 6:4 à 4:6.

L'inconvénient de la souche CCM F-508 utilisée actuellement consiste en une teneur 30 relativement faible en alcaloïdes et surtout, dans le rapport défavorable entre les deux composants ergocryptine, à savoir l' α -ergocryptine et la β -ergocryptine, fortement déplacé en faveur de l' α -ergocryptine. L'ergocryptine est une substance 35 médicale importante, et un composé de départ dans la

préparation de dérivés, et de produits pharmaceutiques obtenus à partir de ces dérivés. Les formes où le rapport en poids entre l' α - et la β -ergocryptine est exactement défini, à savoir de 1,5:1 à 2,5:1, ont 5 été récemment appliquées en thérapie, ces formes assurant une action thérapeutique standard. En raison du rapport en poids désavantageux de ces deux composants dans les sclérotia d'ergot de la souche CCM F-508, l'ergot de ce type est devenu une matière 10 première désavantageuse pour les préparations souhaitées. Au cours de l'amélioration de la souche d'origine, un mutant asporogène auxotrophique a été sélectionné après un traitement mutagénique avec l'acide nitrique, en plus de la souche CCM F-508; ce mutant 15 est capable de synthétiser les alcaloïdes non seulement en culture parasitaire, mais aussi en culture saprophyte. Dans la suite des opérations de perfectionnement de ce mutant, il a été isolé un mutant 20 suppresseur généré spontanément, qui conservait les caractéristiques de production mentionnées et pour lequel un renouvellement de l'aptitude à la formation de conidia avait lieu simultanément avec un retour à la prototrophie.

La nouvelle souche qui fait l'objet 25 de l'invention, a été obtenue en poursuivant l'amélioration du mutant mentionné, par utilisation de traitements mutagéniques classiques: les conidia ont été soumises à l'action d'acide nitrique dans une concentration de 0,0030 à 0,0045M (selon la sensibilité 30 des conidia) par mélange pendant 5 minutes. Les conidia ont été alors centrifugés, lavées avec de l'eau et semées sur un milieu classique, puis testées pour la production d'alcaloïdes. L'action de l'acide nitrique a été répétée six fois en tout. On a utilisé en outre 35

l'action de sulfonate d'éthylméthane, à la concentration de 0,01M dans une suspension de conidia, sous agitation pendant cinq heures. Ce temps écoulé, les conidia ont été lavées, semées sur un milieu classique et testées pour la production d'alcaloïdes. Ce traitement a été répété trois fois. Comme troisième traitement mutagène, du 5-bromo-uracil a été ajouté, à la concentration de 0,1% en poids, avec 0,1% en poids de sulfathiazole dans le milieu inoculé complet. La culture a duré quatorze jours à une température de 24°C. Les conidia ont été récoltées sur les cultures développées, puis isolées, et testées pour la production d'alcaloïdes. Dans toute la mesure du possible, on a inséré dans les études des sélections de culture mono-conidiales sans mutation.

La nouvelle souche a été déposée dans la Collection Tchécoslovaque de Microorganismes de l'Université J.E. Purkyné, Brno, Obrancumiru 10, sous le numéro CCM F-725.

La souche Claviceps Purpurea (Fr.) Tul. CCM F 725 est prototrope. Elle est capable de se développer dans des conditions parasitaires sur l'épi de seigle, mais aussi dans des conditions saprophytes, en culture stationnaire, en milieu liquide. Dans les deux cas, elle produit des alcaloïdes.

Sur un miliéu complet durci (moût de bière en fermentation, à 5°Bé, hydrolysat acide de caséine 1% en poids, sulfate de magnésium cristallisé 0,1% en poids, agar 3% en poids, pH 6,3) inoculé par pulvérisation d'une suspension de conidia, la surface du milieu est garnie complètement en quatre à cinq jours à 25°C, et il se forme alors un mycélium aérien, étouffant de nombreuses conidia. Les hyphées sont

typiquement sphacéliques, longs, peu ramifiés et rarement divisés. Les cellules ont des parois minces et une faible teneur en inclusions graisseuses. Le mycélium est à sa base, dans les phases ultimes de son évolution, coloré en violet par un pigment, le mycélium aérien par contre est exempt de pigment. La formation des conidia est complète après vingt et un jours d'incubation. Les conidia sont ovales, ont généralement quatre à sept μ de long et 3 à 5 μ de large, à parois minces, et mononucléaires. En semant la même composition sur un milieu frais, on obtient une germination en 24 à 48 heures, le plus fréquemment sur un pôle, rarement sur les deux. Une culture dans un tube à essai de 20x200mm contient environ 15 3×10^9 conidia.

Dans un milieu de production liquide (25% en poids de saccharose, 0,44% en poids de liqueur saturée de maïs, 0,06% en poids de phosphate dihydrogéné de potassium, 0,946% en poids d'acide citrique, 0,16% en poids de nitrate de calcium cristallisé, 0,11% en poids de sulfate de magnésium cristallisé, pH ajusté à 6,8 avec de l'ammoniaque) la souche se développe en vingt et un jours d'incubation à une température de 24°C, en mycélium sclerotial compact, mélangé, pigmenté de brun-jaune à brun pourpre, ce mycélium se développant vers le bas et étouffant les conidia en haut. Les hyphées sont courtes et larges, les cellules sont pratiquement isodiamétriques, à parois épaisses et à teneur élevée en graisses. Les conidia ont des propriétés similaires à celles des conidia obtenues en milieu complet durci, leurs dimensions varient seulement légèrement.

Il se forme en culture parasitaire

sur l'épi de seigle des sclerotia allongées, généralement de 2 à 6mm d'épaisseur et 10 à 30mm de long, droites ou en forme de fauille, se rétrécissant vers l'apex.

La coloration des sclerotia adultes est brun-rouge

- 5 à la surface et blanche avec une nuance jaunâtre
à la fracture.

Selon le spectre des alcaloïdes produits, la nouvelle souche appartient à la race chimique ergocornine-ergocryptone. L'ergocornine 10 et l'ergocryptine sont représentés dans un rapport en poids de 1:1 et constituent les principaux alcaloïdes contenus aussi bien dans les sclerotia d'ergot parasitaires que dans le mycélium de culture saprophyte.

15 Le composant ergocryptine est formé de -ergocryptine et de -ergocryptine dans les sclerotia parasitaires dans un rapport en poids d'environ 2:1 à 1;1, et dans le mycélium saprophyte, sans utilisation d'un précurseur, dans un rapport 20 en poids d'environ 5:1. Outre les principaux alcaloïdes ci-dessus, le spectre d'alcaloïdes se compose d'ergométrine courante et de petites quantités d'ergosine ainsi que de traces d'ergocristine, ergotamine, amide de lysergylvaline, ergoxine (ergostine, 25 ergonine, ergoptine) et de trois autres alcaloïdes non identifiés.

Une production élevée d'alcaloïdes caractérise la nouvelle souche selon l'invention, et ceci aussi bien en culture parasitaire que saprophyte. Les sclerotia de la culture parasite aussi bien que le mycélium de la culture saprophyte, contiennent jusqu'à 1,5% en poids d'alcaloïdes totaux. Une autre fraction d'alcaloïdes est en outre libérée dans le milieu de production au cours de la culture

6

saprophyte en surface, ce milieu contenant jusqu'à 250 g/ml d'alcaloïdes (exprimé en ergométrine) quand la fermentation a été complète.

5

REVENDICATIONS

Souche de microorganisme nouvelle caractérisée en ce qu'elle est constituée par une
5 souche de l'espèce *Claviceps purpurea* portant la désignation (Fr.) Tul. CCM F-725, produisant de l'ergocornine et de l'ergocryptine.