



SPF Economie, PME, Classes
Moyennes & Energie
Office de la Propriété intellectuelle

(11) 1026703 B1

(47) Date de délivrance : 11/05/2020

(12) BREVET D'INVENTION BELGE

(47) Date de publication : 11/05/2020

(21) Numéro de demande : BE2019/5491

(22) Date de dépôt : 25/07/2019

(62) Divisé de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : C12N 15/76, C12R 1/525

(30) Données de priorité :

(73) Titulaire(s) :

CHINAJILIANG UNIVERSITY

310018, HANGZHOU
Chine

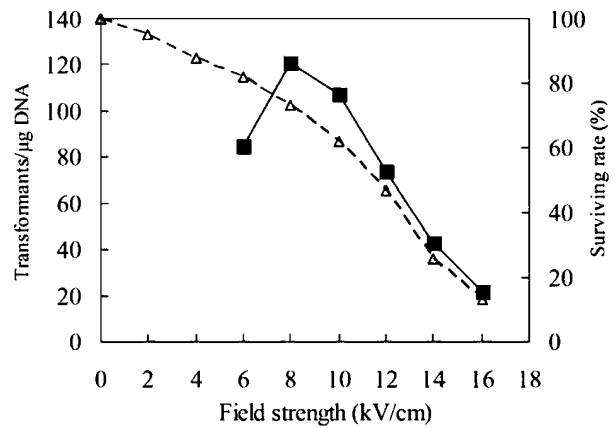
(72) Inventeur(s) :

MA Zheng
310018 HANGZHOU
Chine

YU Xiaoping
310018 HANGZHOU
Chine

(54) La méthode de transformation par électrochocs de S. diastatochromogènes

(57) La présente invention révèle une méthode de transformation par électrochocs de *S. diastatochromogènes*. Après avoir été traitée de la légère rupture de paroi, la cellule se transforme par électrochocs. Le traitement de la rupture de paroi cellulaire s'effectue avec la solution tampon d'électrochocs contenant 5 µgml-1 lysozyme, ou avec la solution tampon d'électrochocs contenant 1% glycine, ou avec la solution tampon d'électrochocs contenant 30 µgml-1 pénicilline G, ou avec la solution tampon d'électrochocs contenant 3 µgml-1 lysozymes et 20 µgml-1 pénicilline G. Les paramètres de transformation par électrochocs comportent l'intensité du champ électrique de 12kV/cm, la densité cellulaire de 1×10^9 /ml, et la densité plasmidique AND de 2 µg. Après la transformation par électrochocs, les cellules sont incubées à l'aide du milieu de culture YEME et le temps de l'incubation dure 2-3 heures. Cette invention fournit une méthode commode et fiable à la transformation efficace de *S. diastatochromogènes* et fraie le chemin à l'ingénierie génétique de *S. diastatochromogènes*.



Remarque: 1. Surviving rate (%) : taux de survie (%)
 2. Field strength (kV/cm) : intensité du champ électrique (kV/cm).

Dessin 1

**"La méthode de transformation par électrochocs de S.
diastatochromogènes"**

DOMAINE TECHNIQUE

- 5 La présente invention appartient au domaine de l'ingénierie génétique de microbe, surtout présente une méthode de transformation par chocs électriques de S. diastatochromogènes.

CONTEXTE TECHNIQUE

- 10 La toyocamycine est un membre important de la famille antibiotique du nucléoside. En raison de la similitude de la structure au nucléotide, la toyocamycine montre une étendue bioactivité, comme bioactivité antitumorale, antibactérienne, antifongique etc.. Par conséquent, la toyocamycine est considérée comme un antibiotique agricole idéal pour
- 15 lutter contre la maladie mycélienne d'agriculture. Nous avons sélectionné un Streptomyces dont le produit du métabolisme principal est la toyocamycine dans notre recherche de première étape et après l'identification ce Streptomyces est le Streptomyces diastatochromogènes 1628. Mais la production de la toyocamycine est
- 20 faible et elle ne peut pas répondre à la demande de la production industrielle à grande échelle. Afin de régler ce problème, le moyen employé souvent est d'adopter la méthode physicochimique habituelle pour stimuler les mutagenèses et puis faire la sélection. Pourtant, l'effet n'est pas évident par suite de la période de sélection longue. Avec le
- 25 progrès de la technologie de biologie moléculaire, par exemple, le mécanisme de synthèse du métabolite secondaire de Streptomyces

coelicolor, modèle de Streptomyces, de la souche industrielle Streptomyces avermitilis et de etc. ayant déjà été expliqué, sur cette base, on fait la modification moléculaire de S. diastatochromogènes en moyennant le moyen de l'ingénierie métabolique dans le but d'augmenter visiblement sa potentialité d'application. D'ailleurs, l'obtention des semences par l'ingénierie métabolique est utilisée largement pour augmenter la production du métabolite secondaire antibiotique et en même temps l'humain est en mesure de bénéficier de la technologie de synthèse biologique, d'obtenir un substance disposant d'une nouvelle bioactivité. Malgré que nous fassions nombreuses études au sujet de la nature physiologique et biochimique de S. diastatochromogènes, nous ne connaissons pas bien sa particularité génétique, surtout son mécanisme d'ajustement et sa voie de synthèse biologique de toyocamycine. Le plus fondamental problème réside dans le défaut d'une méthode de transformation génétique fiable et efficace. Depuis que la méthode de transformation de bioplaste profitant de la médiation PEG réalise avec réussite la transformation génétique de Streptomyces, la transformation profitant de la médiation PEG est devenue une méthode habituelle pour transformation de Streptomyces. Il résulte cependant des recherches de première étape que en ce qui concerne la méthode de transformation de bioplaste profitant de la médiation PEG, l'efficacité de la transformation en souche microbienne 1628 est basse et en plus, les rapportages de la recherche connexes ne sont jamais vu en matière de la transformation génétique de la souche 1628.

25

CONTENU DE L'INVENTION

Afin de surmonter les inconvénients de la technologie du moment, la présente invention a pour but d'offrir une méthode de transformation par électrochocs de S. diastatochromogènes.

Une méthode de transformation par électrochocs de *S. diastatochromogènes*, c'est-à-dire, les cellules sont converties par électrochocs après le traitement de la légère rupture de paroi.

5 Le traitement décrit plus haut de la légère rupture de paroi s'effectue avec la solution tampon d'électrochocs contenant $5 \mu\text{gml}^{-1}$ lysozyme.

Le traitement décrit plus haut de la légère rupture de paroi s'effectue avec la solution tampon d'électrochocs contenant 1% glycine.

Le traitement décrit plus haut de la légère rupture de paroi s'effectue avec la solution tampon d'électrochocs contenant $30 \mu\text{gml}^{-1}$ pénicilline G.

10 Le traitement décrit plus haut de la légère rupture de paroi s'effectue avec la solution tampon d'électrochocs contenant $3 \mu\text{gml}^{-1}$ lysozyme et $20 \mu\text{gml}^{-1}$ pénicilline G.

Les paramètres de transformation par électrochocs ci-dessus ont l'intensité du champ électrique de 12KV/cm, la densité cellulaire de 1×10^9 /ml, et la densité de plasmide ADN de 2 μg .

15 Après la transformation par électrochocs, les cellules sont incubées à l'aide du milieu de culture YEME.

Le temps de l'incubation sur le milieu de culture dure 2-3 heures

L'effet bénéfique de cette invention consiste à fournir une méthode
20 commode et fiable à la transformation efficace de *S. diastatochromogènes* et à frayer le chemin pour l'ingénierie génétique de *S. diastatochromogènes*.

DESSINS ANNEXES :

25 Dessin 1 est le graphique des résultats du taux de survie et de l'efficacité de transformation de bioplaste de *S. diastatochromogènes* 1628 sous l'influence de l'intensité du champ électrique différente. Sur le graphique, les autres paramètres de la transformation par électrochocs sont 100 μl de bioplaste 1628, 0,1 μg de plasmide ADN pIJ702, 25 μF , et 200 Ω . Δ
30 représente le taux de survie de bioplaste et $\blacksquare$ représente l'efficacité de transformation.

Dessin 2 est le graphique des résultats du taux de survie et de l'efficacité de transformation de cellule de *S. diastatochromogènes* 1628 sous l'influence de l'intensité du champ électrique différente. Sur le graphique, les autres paramètres de la transformation par électrochocs sont 100 µl de bioplasme 1628, 0,1 µg de plasmide ADN pIJ702, 25 µF, et 200Ω. Δ représente le taux de survie de cellule et ■ représente l'efficacité de transformation.

Dessin 3 est le graphique des résultats de l'efficacité de transformation de cellule de *S. diastatochromogènes* 1628 sous l'influence des additifs différents pour traiter la cellule dans la solution tampon PGS. Sur le graphique, les autres paramètres de la transformation par électrochocs sont 2 µg d'ADN, la densité cellulaire de 1×10^9 , 25 µF, et 200Ω.

Dessin 3A est le graphique des résultats de l'efficacité de transformation sous l'influence de la densité différente de lysozyme.

Dessin 3B est le graphique des résultats de l'efficacité de transformation sous l'influence de la densité différente de glycine.

Dessin 3C est le graphique des résultats de l'efficacité de transformation sous l'influence de la densité différente de pénicilline G.

Dessin 3D est le graphique des résultats de l'efficacité de transformation sous l'influence de la densité différente de PEG.

METHODE CONCRETE D'EXECUTION

Matériaux et méthode

Matériaux

Extrait de malt de la société Oxoid, peptone et extrait de levure de la société Difco, lysozyme, pénicilline G, glycine et PEG 1000 de la société Sigma.

Souche microbienne et plasmide

Streptomyces diastatochromogènes 1628 est un actinomycète antagoniste (CGMCC No. 2060), et sa boisson fermentée possède un fort effet d'inhibition sur plusieurs fungus pathogéniques végétaux. Après

la séparation et l'extraction, il est prouvé que le composant actif principal de la boisson fermentée est la toyocamycine.

Milieu de culture

S. diastatochromogènes 1628 est cultivé dans le milieu de culture CP (glucose 1%, peptone 0,2%, extrait de levure 0,4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, K_2HPO_4 0,05%, NaCl 0,05%, pH 7,2) ou YEME médium (extrait de levure de Difco 0,3%, peptone de Difco 0,5%, extrait de malt d'Oxoid 0,3%, glucose 1%, saccharose 34%, glycine 0,5%, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mM). Le milieu de culture R2YE sert du milieu de régénération de bioplaste et le transformant positif est sélectionné dans le milieu de culture R2YE auquel on a ajouté $20 \mu\text{gml}^{-1}$ bryamycine. Et la solution de saccharose 10% est appliqué à la transformation par électrochocs. Les chercheurs ajoutent des substances différentes à la solution de glycérine 15% afin de cultiver et laver les souches microbiennes au cours d'électrochocs. La solution tampon PGS (PGS buffer) contient PEG 10%, glycérine 10% et saccharose 6,5% et vise à la remise en suspension des souches pendant la transformation d'électrochocs.

Exemple pratique 1

La préparation de bioplaste et la transformation par électrochocs

Des spores de S. diastatochromogènes sont mises dans une fiole d'oscillation de 250 ml renfermant 50 ml du milieu de culture CP et y sont cultivées deux jours à température de 28°C. Et puis on reprend la fluide microbienne de 1,5 ml et la remet dans une autre fiole d'oscillation de 250 ml renfermant 50 ml du milieu de culture CP frais et ajoutée de glycine 0,5%. Après 28-32 heures, recueillir le mycélium, le laver deux fois avec la solution de saccharose 10%, et le remettre en suspension dans 5 ml de la solution tampon P (P buffer) avec la densité finale de lysozyme de 1mgml^{-1} , laisser réagir une heure à température ambiante, appliquer l'ouate hydrophile à filtrer les bioplastes acquis, 8 minutes de la centrifugation avec 2000rpm, les recueillir, les relaver dans la solution tampon P (P buffer) et les conserver en réserve à température de moins

de 70°C. 100 µl de bioplaste et une quantité appropriée de plasmide ADN se mélangent, et après 10 minutes de pose sur la glace, le mélange est disposé dans le verre d'électrochocs avec 1000 V (25 µF et 200Ω). Après les chocs électriques, le mélange est dilué avec la solution tampon P (P buffer) , appliqué dans le milieu de culture de régénération R2YE, puis cultivé 24 heures à température de 28°C et couvert de 5 ml d'agar mou contenant l'antibiotique. Selon dessin 1, quand l'intensité du champ électrique dépasse 12 kV/cm, le taux de survie et l'efficacité de transformation de bioplaste s'abaisse notablement à la suite de l'augmentation de l'intensité du champ électrique. L'efficacité de transformation la plus haute est de $122 \pm 15/\mu\text{g}$ ADN avec l'intensité du champ électrique de 8 kv/cm. Toutefois, sous l'influence de la densité de bioplaste différente et de la densité cellulaire différente, comme tableau 1, l'efficacité de transformation la plus haute est de $302 \pm 6/\mu\text{g}$ ADN

Tableau 1 montre l'influence sur l'efficacité de transformation en raison de la densité plasmidique différente et de la densité cellulaire différente.

Exemple pratique 2

La transformation par électrochocs de *S. diastatochromogènes* traité d'après divers façons

S. diastatochromogènes 1628 est précultivé 28 heures dans le milieu de culture CP et puis remis dans le milieu de culture frais CP un jour. Le centrifugation à température 4°C (10 000 rpm, 10 min), recueillir les bactéries, les laver deux fois avec 15 ml de la solution de prérefrigération de saccharose 10%, laver deux fois les cellules avec 15 ml de la solution de prérefrigération de glycérine 15%, traiter les cellules avec quatre additifs différents, et enfin remettre les cellules de compétence en suspension dans la solution tampon PGS (PGS buffer) dans le but d'obtenir une densité cellulaire près de 2×10^9 cellules /ml. 100 µl de cellules de compétence et une quantité appropriée de plasmide ADN se mélangent. Poser le mélange sur la glace 10 minutes, le donner les chocs électriques avec paramètres de 1200 V (25 µF et 200Ω), après les

chocs, y ajouter rapidement 1 ml du milieu de culture CP, laisser réagir une heure, à température 28°C, et finalement l'appliquer sur le milieu de culture de régénération R2YE contenant l'antibiotique, à température 28°C, 3-4 jours.

- 5 En cas du traitement de lysozyme, laver deux fois les cellules avec 15 ml de la solution de préréfrigération de glycérine 15%, et puis les remettre en suspension dans les solutions de glycérine 15% contenant la densité de lysosome différente (1, 3, 5, 7, 9 µg /ml). laisser réagir 20 minutes à température 37°C,
 - 10 En cas du traitement de glycine, laver deux fois les cellules avec 15 ml de la solution de préréfrigération de glycérine 15%, et puis les remettre en suspension dans les solutions de glycérine 15% contenant la densité de glycine différente (0,5%, 1%, 1,5%, 2%). Laisser réagir 20 minutes à température ambiante.
 - 15 En cas du traitement de pénicilline G, laver deux fois les cellules avec 15 ml de la solution de préréfrigération de glycérine 15%, et puis les remettre en suspension dans les solutions de glycérine 15% contenant la densité de pénicilline G différente (10, 20, 30, 40 µg /ml). Laisser réagir 30 minutes à température ambiante.
 - 20 En cas du traitement de PEG, laver deux fois les cellules avec 15 ml de la solution de préréfrigération de glycérine 15%, et puis les remettre en suspension dans les solutions de glycérine 15% contenant la densité de PEG différente (10%, 20%, 30%).
- A l'égard d'état de croissance de cellulaire, on a découvert que quand les
- 25 cellules se trouvent dans la phase moyenne logarithmique, recueillir les bactéries, la plus haute efficacité par électrochocs est de 40 transformants /µg ADN . En parallèle, on a examiné l'influence de l'intensité du champ électrique différente sur la transformation de S. diastatochromogènes pas traité. Selon dessin 2, quand l'intensité du
 - 30 champ électrique atteint 10 kV/cm, le taux de survie cellulaire est de 100%. Quand l'intensité du champ électrique augmente 16kV/cm, le taux

de survie atteint encore 75%. Mais l'efficacité de transformation est basse (55 transformants/ μg ADN), et cette efficacité est inférieure à celle de transformation de bioplaste en tant que l'objet d'électrochocs. L'optimisation d'autres paramètres de transformation d'électrochocs n'amène pas l'augmentation visible de l'efficacité de transformation. Il en résulte que la perméabilité de la paroi cellulaire joue un rôle vital pour la transformation efficace.

Examiner l'influence de cellule prétraitée dans la solution tampon ajoutée de quatre auditifs différents sur l'efficacité de transformation. Les résultats se présentent comme dessin 3: quand lysozyme 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, glycine 1% et pénicilline G 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sont ajoutés respectivement à la solution tampon pour le prétraitement cellulaire, l'efficacité de transformation augmente relativement 30 fois, 12 fois et 28 fois. Cependant, l'ajout de PEG n'a pas un effet notable sur l'efficacité de transformation. Lorsque les cellules sont traitées par 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lysozyme et 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pénicilline G, l'efficacité de transformation inespérée présente et peut atteindre 3×10^3 transformants / μg ADN .

Simultanément examiner l'influence de la densité différente cellulaire et plasmidique sur l'efficacité de transformation. D'après les recherches, quand 2 μg de ADN et 1×10^9 cellules se mélange au cours d'électrochocs, la plus haute efficacité de transformation peut atteindre 5×10^3 transformants / μg ADN .

Les chocs électriques peuvent endommager les cellules et après les chocs nous ajoute immédiatement le milieu de culture à la solution d'électrochoc en faveur de la réparation de cellule et l'augmentation de l'efficacité de conversion. Les résultats montre que après les chocs l'effet de l'ajout du milieu de culture YEME est mieux que celui du milieu de culture CP, que l'efficacité de transformation est à même d'atteindre ($3 \pm 0,3$) transformants / μg ADN après 2-3 heures de culture. En cas du temps trop long, des colonies microbiennes fausses positives surgissent et ça amène la difficulté de sélection de transformant positif (tableau 2).

Tableau 2 montre après les chocs électriques l'influence de l'ajout du milieu de culture et le temps de culture sur l'efficacité de transformation.

Milieu de culture	Temps de culture (h)	Transformant / μ g ADN
CP	0.5-1	$(5\pm 0,2)\times 10^3$
	2-3	$(1\pm 0,1)\times 10^4$
	Dépasser 4h	$>(3\pm 0,3)\times 10^4$
YEME	0.5-1	$(1\pm 0,1)\times 10^4$
	2-3	$(3\pm 0,4)\times 10^4$
	Dépasser 4h	$>(6\pm 0,3)\times 10^4$

5 Exemple pratique 3

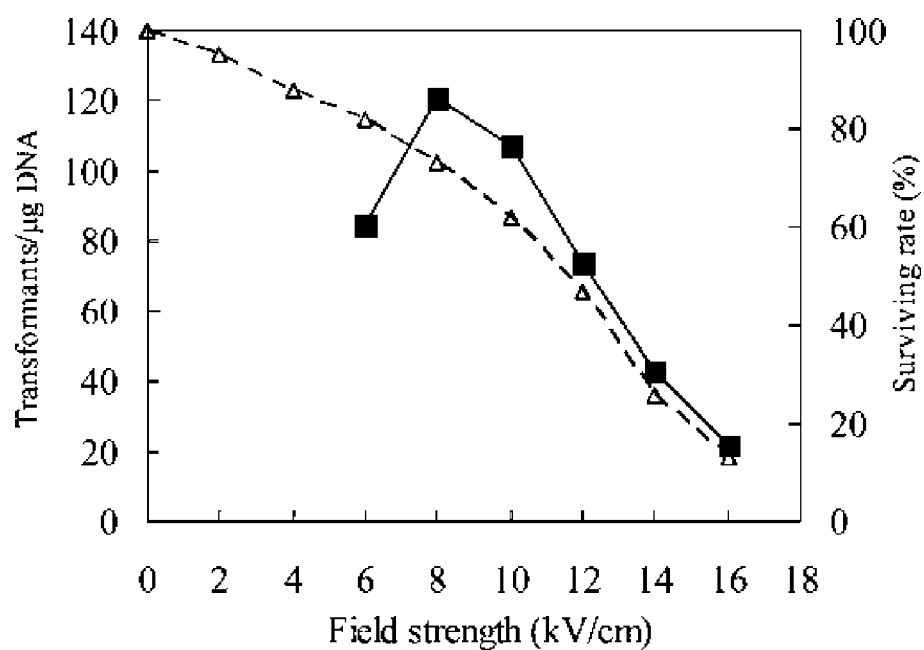
Les résultats de l'optimisation de diverses conditions de la transformation d'électrochocs pour différents types cellulaires de *S. diastatochromogènes* se présente comme tableau 3, dont la cellule prétraitée est les souches qu'on recueille quand les cellules de souche complète entre dans la phase logarithmique moyenne et qui réagissent un moment dans la solution tampon de transformation d'électrochocs à laquelle on ajoute simultanément lysozyme 3 μ g/ml et pénicilline 20 μ g/ml et puis les cellules servent de matériaux de transformation par électrochocs. Après les chocs électriques, on y ajoute immédiatement 1 ml du milieu de culture, laisse réagir 2-3 heures à température de 28°C et ensuite enduit les cellules dans le milieu solide de culture R2YE contenant l'antibiotique.

Tableau 3 montre l'optimisation de diverses conditions de transformation d'électrochocs pour différents types cellulaires de *S. diastatochromogènes*.

Type de souche 1628	Intensité du champ électrique (kV/cm)	Densité cellulaire (ml)	Densité de plasmideADN (µg)	Transformant /µg ADN
Bioplaste	8	1×10^9	1	302 ± 6
Cellule complète	18	1×10^9	1	55 ± 6
Cellule prétraitée	12	1×10^9	2	$(3 \pm 0,4) \times 10^4$

REVENDEICATIONS

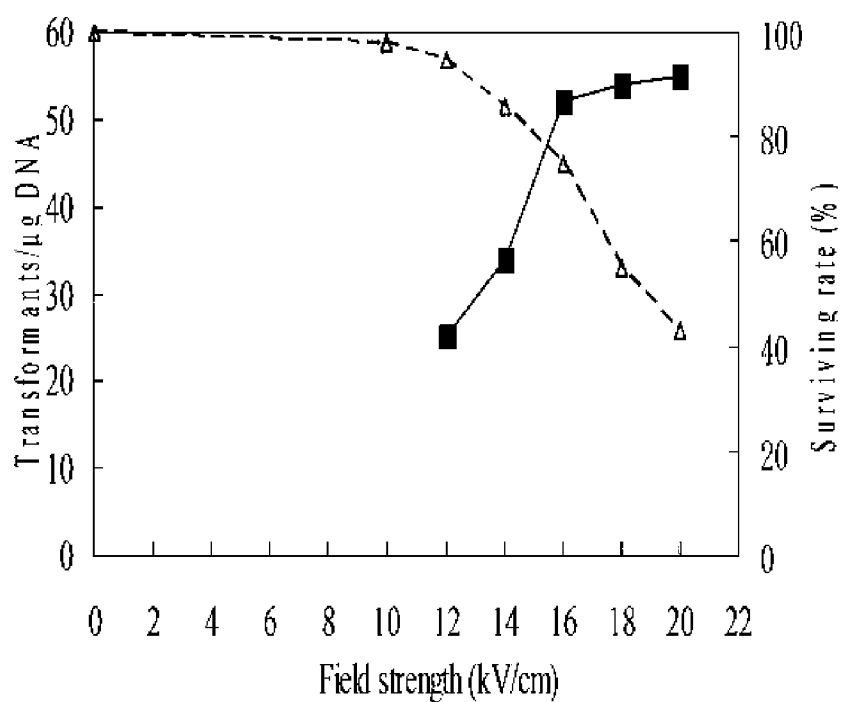
1. Une méthode de transformation par électrochocs de *S. diastatochromogènes* est caractérisée par le fait que *S. diastatochromogènes* décrit plus haut est streptomyces diastatochromogènes 1628 et les cellules sont converties par électrochocs après le traitement d'une légère rupture de paroi ;
Le traitement de la légère rupture de paroi s'effectue avec la solution tampon d'électrochocs contenant 3µgml⁻¹ lysozyme et 20µgml⁻¹ pénicilline G ;
Les paramètres de transformation d'électrochocs ci-dessus comptent l'intensité du champ électrique de 12kV/cm, la densité cellulaire de 1×10⁹ /ml, et la densité de plasmide ADN de 2µg ;
Après la transformation par électrochocs, les cellules sont incubées à l'aide du milieu de culture YEME et le temps de l'incubation sur le milieu de culture dure 2-3 heures.



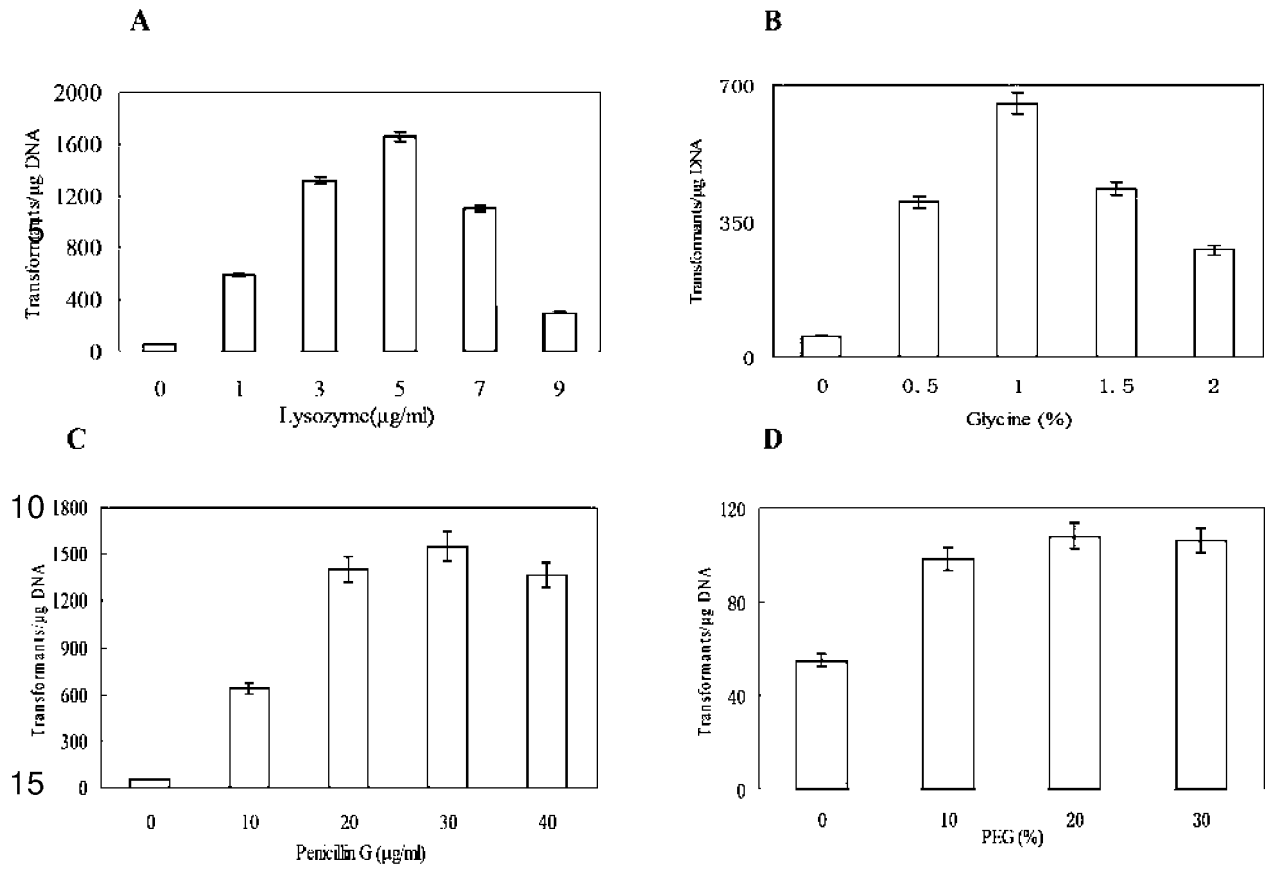
Remarque: 1. Surviving rate (%) : taux de survie (%)
 2. Field strength (kV/cm) : intensité du champ électrique (kV/cm).

5

Dessin 1



Remarque: 1. Surviving rate (%) : taux de survie (%)
 2. Field strength (kV/cm) : intensité du champ électrique (kV/cm).



Dessin 3

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ÉTABLI EN VERTU DE L'ARTICLE XI.23., §10 DU CODE DE DROIT ÉCONOMIQUE BELGE

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE	REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE PAT2541528BE00
Demande nationale belge n° 201905491	Date du dépôt 25-07-2019
	Date de priorité revendiquée
Déposant (Nom) CHINAJILIANG UNIVERSITY	
Date de la requête d'une recherche de type international 24-08-2019	Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international SN74303
I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous)	
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB Voir rapport de recherche	
II. DOMAINES RECHERCHES	
Documentation minimale consultée	
Système de classification	Symboles de la classification
IPC	Voir rapport de recherche
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés	
III. ☐ IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	
IV. ☐ ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE À L'ÉTENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No

BE 201905491

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12N15/76 C12R1/525
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12N C12R

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CN 103 333 909 A (UNIV JILIANG CHINA) 2 octobre 2013 (2013-10-02) * Abstract; revendications 1-8 *	1
X	MA ZHENG ET AL: "Formation, regeneration, and transformation of protoplasts of Streptomyces diastatochromogenes1628", FOLIA MICROBIOLOGICA, SPRINGER NETHERLANDS, NL, vol. 59, no. 2, 31 juillet 2013 (2013-07-31), pages 93-97, XP035323958, ISSN: 0015-5632, DOI: 10.1007/S12223-013-0271-5 [extrait le 2013-07-31] * le document en entier * ----- -/-	1



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt 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, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt ou 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 par rapport au document considéré isolément

"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

Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée

11 février 2020

Date d'expédition du rapport de recherche de type international

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Seroz, Thierry

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MA ZHENG ET AL: "Characterization of representative <i>perp</i> gene mutations leading to a significant change in toyocamycin production of <i>Streptomyces diastatochromogenes</i> 1628", JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, BASINGSTOKE, GB, vol. 43, no. 4, 20 janvier 2016 (2016-01-20), pages 463-471, XP035895633, ISSN: 1367-5435, DOI: 10.1007/S10295-015-1732-4 [extrait le 2016-01-20] * le document en entier * -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n°

BE 201905491

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
CN 103333909	A	02-10-2013	AUCUN



OPINION ÉCRITE

Dossier N° SN74303	Date du dépôt(jour/mois/année) 25.07.2019	Date de priorité (jour/mois/année)	Demande n° BE201905491
Classification internationale des brevets (CIB) INV. C12N15/76 C12R1/525			
Déposant CHINAJILIANG UNIVERSITY			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- ☒ Cadre n° I Base de l'opinion
- ☐ Cadre n° II Priorité
- ☐ Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- ☐ Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- ☒ Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- ☐ Cadre n° VI Certains documents cités
- ☐ Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- ☒ Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

Formulaire BE237A (feuille de couverture) (Janvier 2007)	Examineur Seroz, Thierry
--	-----------------------------

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE201905491

Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, le cas échéant, cette opinion a été effectuée sur la base des éléments suivants :
 - a. Nature de l'élément:
 - ☐ un listage de la ou des séquences
 - ☐ un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences
 - b. Type de support:
 - ☐ sur papier
 - ☐ sous forme électronique
 - c. Moment du dépôt ou de la remise:
 - ☐ contenu(s) dans la demande telle que déposée
 - ☐ déposé(s) avec la demande, sous forme électronique
 - ☐ remis ultérieurement
3. ☐ De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE201905491

Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

voir feuille séparée

Point V

Il est fait référence aux documents suivants :

- D1 CN 103 333 909 A (UNIV JILIANG CHINA) 2 octobre 2013 (2013-10-02)
- D2 MA ZHENG ET AL: "Formation, regeneration, and transformation of protoplasts of *Streptomyces diastatochromogenes* 1628", FOLIA MICROBIOLOGICA, SPRINGER NETHERLANDS, NL, vol. 59, no. 2, 31 juillet 2013 (2013-07-31), pages 93-97, XP035323958, ISSN: 0015-5632, DOI: 10.1007/S12223-013-0271-5 [extrait le 2013-07-31]

Le document D1 décrit une méthode de transformation par électrochocs de *Streptomyces diastatochromogenes* 1628 après un traitement des cellules par une solution tampon comprenant 20 µg/ml de pénicilline G et 3 µg/ml de N, O-diacetylmuramidase qui a une activité lysozyme, afin de produire de légères fissures dans la paroi cellulaire. Les cellules à une densité de 1×10^9 sont alors transformées par des chocs électriques d'une intensité de 12 kV/cm en présence de 2 µg d'ADN plasmidique. Les cellules transformées sont ensuite cultivées dans un milieu de culture de type YEME durant 2 à 3 heures.

La même méthode est décrite par le document D2.

Au vu des documents et D1 et D2, la revendication 1 n'est pas nouvelle.

Point VIII

L'expression [*plasmide AND*] manque de clarté.