



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1004492A3

NUMERO DE DEPOT : 9000738

Classif. Internat.: A01N

Date de délivrance : 01 Décembre 1992

Le Ministre des Affaires Economiques,

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 23 Juillet 1990 à 11h00
à l' Office de la Propriété Industrielle

ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : NOVO NORDISK A/S
Novo Allé, DK-2880 BAGSVAERD(DANEMARK)

représenté(e)(s) par : NICHELS William, SOLVAY - Département Prop. Indus., Rue de Ransbeek, 310 - 1120 BRUXELLES.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : COMPOSITIONS CONTENANT DES PRODUITS PESTICIDES BIOSYNTHETIQUES ET AU MOINS UN TANNIN, PROCEDES POUR LEUR PRODUCTION ET LEUR UTILISATION.

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 01 Décembre 1992
PAR DELEGATION SPECIALE :

WUYTS L.
Directeur.

Compositions contenant des produits pesticides
biosynthétiques et au moins un tannin, procédés
pour leur production et leur utilisation

La présente invention concerne des compositions contenant des produits pesticides biosynthétiques provenant de microorganismes de la famille des Bacillacées ainsi que des procédés pour leur production et leur utilisation.

5 Le procédé d'obtention des produits pesticides biosynthétiques provenant de microorganismes comporte généralement les étapes principales suivantes :

- fermentation du microorganisme jusqu'à l'obtention d'une culture,
- 10 - récolte de cette culture et
- formulation du produit sous forme de pâte, poudre, granulé ou crème.

La récolte de la culture est une étape délicate dans ce procédé, en effet cette étape qui consiste principalement en une
15 séparation de la culture sous forme de biomasse et du liquide de culture, est une des causes de perte de produit et donc du faible rendement généralement obtenu.

De plus la matière active du produit pesticide est un composé sensible de par sa structure biologique qui est dénaturée
20 aisément si certaines conditions ne sont pas respectées, telles que notamment la température, le pH, les solvants, les additifs.

Les faibles rendements observés lors de la récolte sont dus notamment à la mauvaise séparation de nombreux constituants de la culture qui est plus ou moins visqueuse, aux effets mécaniques de
25 la séparation qui engendrent la dégradation de la matière active du produit pesticide, et donc entraînent une baisse de son activité biologique, à l'addition d'adjuvants qui affectent la stabilité de la composition et/ou son aspect physique tel que la fluidité de la pâte, la décantation de la pâte ou de la crème
30 lors du stockage, la dispersion de la composition dans l'eau.

Par ailleurs, on observe également une baisse apparente de l'activité biologique, en particulier lorsque la composition est formulée sous forme de pâte. Cette formulation est avantageuse dans certains cas, car elle évite l'étape du séchage qui dégrade plus ou moins le produit et qui est onéreuse, elle est cependant
5 nécessaire pour une conservation de longue durée.

En effet, lors du calcul du bilan de l'activité biologique, on observe un déficit de 30 à 50 % entre l'activité biologique de la culture et celle de la pâte, alors qu'on observe un déficit
10 inférieur entre l'activité biologique de la poudre, provenant du séchage de cette pâte, et celle de la culture. L'activité biologique de la pâte n'est donc apparemment pas totalement disponible ou accessible.

La présente invention vise à procurer des compositions qui
15 ne présente plus ces inconvénients. Notamment, elle vise à procurer des compositions ayant une activité biologique la plus élevée possible et obtenues de façon économique c'est à dire en évitant les pertes de rendement à tous les niveaux, aussi bien du point de vue de la quantité que de la qualité, comme de l'acti-
20 vité biologique, tout en étant stable et en présentant un aspect physique satisfaisant. De plus on observe que les compositions selon l'invention ont une activité biologique particulièrement élevée.

L'invention concerne à cet effet des compositions contenant
25 des produits pesticides biosynthétiques, provenant de micro-organismes de la famille des Bacillacées, et au moins un tannin ou un dérivé de tannin.

Les compositions préférées selon l'invention sont celles qui contiennent l'acide tannique.

30 Dans les compositions selon l'invention le tannin ou le dérivé de tannin peut être présent à des doses variables compatibles avec le produit pesticide biosynthétique particulier mis en oeuvre. En général la quantité de tannin ou de dérivé de tannin est comprise entre 0,01 et 20 % en poids de la
35 composition.

Lorsqu'on met en oeuvre l'acide tannique, la quantité mise

en oeuvre est comprise entre 0,05 et 15 % et de préférence entre 0,1 et 5 % en poids de la composition.

Par pesticides biosynthétiques provenant de microorganismes de la famille des Bacillacées, on entend également des micro-
5 organismes transformés par insertion d'ADN codant pour la fabrication de toxines et provenant d'autres microorganismes.

Les pesticides biosynthétiques provenant de la famille des Bacillacées peuvent se trouver dans les compositions concentrées selon l'invention sous des formes très diverses. Ainsi, ils
10 peuvent se présenter sous la forme des organismes eux-mêmes à un stade quelconque de leur évolution, en ce comprises les formes végétatives éventuelles, tels quels, en association avec leur milieu de culture, sous forme totalement ou partiellement lysée, sous forme totalement ou partiellement sporulée, sous une forme
15 ayant libéré partiellement ou totalement les spores par divers moyens tels que l'autolyse bactérienne, ou sous la forme des produits qui sont excrétés spontanément par les organismes tels que les exotoxines, sous la forme des produits que l'on peut extraire de ces organismes tels que les endotoxines par toute
20 méthode connue en elle-même impliquant ou non une lyse de l'organisme en cause, sous la forme des produits éventuellement libérés par les organismes au cours de certaines étapes de leur évolution (cristaux ou endotoxines associés ou non aux spores) ou encore sous plusieurs de ces formes simultanément.

25 Ces différentes formes peuvent éventuellement être associées à des résidus du milieu de culture. De bons résultats ont été obtenus avec le mélange contenant les spores, les cristaux ou les endotoxines associés et éventuellement des exotoxines qui se forment spontanément lors de l'autolyse de la bactérie en fin de
30 sporulation. Un tel mélange peut contenir, outre les spores, les cristaux associés ou non aux spores et les exotoxines éventuelles, des cellules ou des débris de cellules ainsi que des produits solides résiduaux de milieu nutritif mis en oeuvre lors de la culture.

35 Comme microorganismes de la famille des Bacillacées convenant bien en général comme source de pesticides

biosynthétiques, on utilise les microorganismes du genre *Bacillus* tels que le *Bacillus thuringiensis*, le *Bacillus sphaericus*, le *Bacillus popilliae*, le *Bacillus cereus*, le *Bacillus larvae*, le *Bacillus lentimorbus*, le *Bacillus fribourgensis* et le *Bacillus penetrans* (Pasteuria).

De bons résultats ont été obtenus avec les *Bacillus sphaericus* et les *Bacillus thuringiensis* de tous sérotypes, y compris les bactéries issues de transformation génétique, et plus particulièrement les *Bacillus sphaericus* de sérotypes 1a, 2a2b, 2a2c, 5a5b, 6, 25, 26a26b, 26a26c et les *Bacillus thuringiensis* de sérotypes 1, 3a, 3a3b, 4, 6, 7, 8, 8a8b, 9, 10 et 14. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le *Bacillus sphaericus* de sérotypes 5a5b et 25 et les *Bacillus thuringiensis* de sérotypes 1 (variété thuringiensis), 3a3b (variété kurstaki), 6 (variétés subtoxicus et entomocidus), 7 (variété aizawai), 8a8b (variété morrisoni) et 14 (variété israëlensis). Les divers types de *Bacillus thuringiensis* et de *Bacillus sphaericus* peuvent être mis en oeuvre dans les compositions selon l'invention sous forme des microorganismes eux-mêmes, tels quels ou lysés, de leurs spores, des endotoxines ou des cristaux associés ou non à leurs spores ou sous plusieurs de ces formes. Ces différentes formes peuvent éventuellement être associées à des résidus du milieu de culture. De bons résultats ont été obtenus en utilisant le mélange contenant des spores et les cristaux associés qui se forme spontanément lors de l'autolyse de la bactérie en fin de sporulation. Un tel mélange peut contenir, outre les spores et les cristaux associés ou non aux spores, des cellules ou des débris de cellules ainsi que des produits solides résiduaux du milieu nutritif mis en oeuvre lors de la culture.

Les compositions selon l'invention peuvent se présenter sous la forme d'une suspension de particules solides de produits pesticides biosynthétiques dans un liquide ou sous la forme d'un solide telle qu'une poudre ou un granulé.

Les compositions selon l'invention peuvent contenir en outre divers autres additifs dont la nature et la fonction dépendent de l'utilisation de ces compositions et qui sont connus par l'homme

du métier.

Les compositions selon l'invention peuvent également contenir des résidus de la fabrication du pesticide biosynthétique.

5 Lorsque les compositions selon l'invention se présentent sous forme de suspensions dans un liquide, ces suspensions contiennent en général de 10 à 45 % en poids et le plus souvent de 15 à 40 % en poids de produits pesticides biosynthétiques. Le liquide doit être inerte vis-à-vis des pesticides biosynthétiques
10 et il ne doit notamment pas les désactiver ni provoquer leur coagulation ni toute autre altération physique. Le liquide peut être constitué par un solvant unique ou par un mélange de solvants. En général, le solvant contient de l'eau.

De bons résultats ont été obtenus lorsque le solvant
15 contient au moins 80 % et le plus souvent au moins 95 % en poids d'eau. En général, le liquide présent dans la composition selon l'invention est constitué essentiellement d'eau.

La présente invention concerne également des procédés pour la fabrication des compositions contenant des produits pesticides
20 biosynthétiques selon l'invention.

Un procédé qui convient pour la fabrication des compositions selon l'invention comporte notamment les étapes suivantes :

- 1) dans une première étape, on cultive le microorganisme dans un milieu de culture jusqu'à l'obtention d'une culture abondante
25 de ce microorganisme,
- 2) dans une deuxième étape, on ajoute à la culture obtenue une quantité de tannin ou de dérivé de tannin,
- 3) dans une troisième étape, on sépare l'eau de la culture contenant le tannin ou le dérivé de tannin en vue d'obtenir
30 une pâte.
- 4) dans une quatrième étape, on procède à la formulation de la pâte ainsi obtenue.

En général, lors de la deuxième étape, la quantité nécessaire de tannin ou de dérivés de tannin est comprise entre 0,05
35 et 4 % en poids de la culture, habituellement entre 0,1 et 3 % et de préférence entre 0,25 et 2 %.

La troisième étape qui consiste à séparer l'eau de la culture, est réalisée par des techniques habituelles de séparation d'eau telles que la centrifugation, l'ultrafiltration, la précipitation par addition d'un non-solvant tel que l'acétone, la
5 filtration ou la floculation de manière à obtenir une pâte. De préférence elle est réalisée par centrifugation et/ou ultrafiltration.

Les autres additifs éventuels sont ensuite ajoutés à cette pâte lors de la formulation.

10 Dans le cas du *Bacillus thuringiensis* et du *Bacillus sphaericus*, le milieu de culture est prélevé par exemple à la fin de la phase de sporulation.

Un autre procédé consiste à séparer du milieu de culture des microorganismes générateurs de produits pesticides biosynthé-
15 tiques, à la fin de la phase de sporulation, des fractions riches en endotoxines ou en spores ou en ces deux produits simultanément. Ces fractions sont ensuite traitées selon les mêmes techniques que celles utilisées pour le traitement des pâtes.

Pour obtenir des compositions sous forme de poudres sèches,
20 on sèche la pâte ainsi obtenue par des techniques habituelles telles que le séchage par atomisation, le séchage par lyophilisation ou le séchage en tambour de manière à obtenir des particules solides contenant en général moins de 12 % et de préférence moins de 7 % d'eau.

25 Une autre technique consiste à ajouter les autres additifs éventuels à la pâte avant de la sécher et à soumettre le mélange au séchage selon l'une ou l'autre des techniques indiquées ci-avant.

Pour obtenir les compositions selon l'invention sous forme
30 de suspensions, on peut disperser les particules solides de pesticide dans une phase liquide qui contient de préférence de l'eau et qui contient en outre le tannin ou le dérivé de tannin ainsi que les autres additifs éventuels, pour former une crème.

35 La présente invention concerne également un procédé pour l'utilisation des compositions.

Les compositions selon l'invention peuvent être utilisées

comme pesticides et plus particulièrement comme agents pour éliminer les insectes à un stade quelconque de leur développement. Pour ce faire, elles sont pulvérisées sur les surfaces infestées, végétaux, fleuves, rivières et toute étendue d'eau
5 selon toutes méthodes connues en elles-mêmes telles que la pulvérisation manuelle, la pulvérisation mécanique et plus particulièrement la pulvérisation par voie aérienne. Elles peuvent notamment être pulvérisées sur les surfaces infestées par des insectes et plus particulièrement par des lépidoptères, des
10 diptères, des coléoptères, des aphaniptères, des orthoptères, des isoptères et des homoptères.

Les doses à mettre en oeuvre sont fonction du pesticide biosynthétique utilisé et de la cible à éliminer.

Dans le cas du *Bacillus thuringiensis* et du *Bacillus sphaericus*, on pulvérise en général de 50 à 5000 g de particules
15 solides à l'hectare. Les compositions selon l'invention peuvent être pulvérisées telles quelles lorsqu'elles se présentent sous forme de suspensions. Elles peuvent être également dispersées, diluées ou émulsionnées dans un diluant comme l'eau ou un diluant
20 organique. Dans ce cas, on les dilue par 1 à 300 fois, habituellement 2 à 120 fois et de préférence 4 à 60 fois leur volume de diluant.

Les exemples qui suivent servent à illustrer l'invention.

Exemple 1

25 Dans un fermenteur BIOLAFFITE de 15 l équipé d'un agitateur, d'une sonde de pH, d'une sonde d'oxygène, d'un système d'aération, stérilisable, on introduit 450 g de farine de soja contenant 52 % environ de protéines, 250 g d'amidon hydrolysé, 20 g de KH_2PO_4 , 20 g de K_2HPO_4 , 3,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,12 g de
30 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,14 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 1,5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ et 10 l d'eau.

On mélange ce milieu de culture jusqu'à ce qu'il soit homogène ; on amène le pH de ce milieu à 7.

On stérilise ce milieu de culture à 120°C durant 30 minutes.

35 On le refroidit jusqu'à amener le milieu de culture à une température de 30°C et on introduit stérilement dans le

fermenteur 1 l d'une culture de *Bacillus thuringiensis* sérotype 14 (variété israelensis) en phase de croissance.

Le fermenteur est agité à 450 tours par minute et aéré à 0,4 vvm (volume d'air par volume de milieu par minute).

5 Après 32 heures, le *Bacillus thuringiensis* se présente sous la forme d'une bactérie sporulée partiellement lysée. Cette culture contient $1,1 \cdot 10^9$ spores par ml, son pH est de 7,5 et sa matière sèche est de 3 g par l.

10 L'activité insecticide de cette culture est mesurée à l'aide d'*Aedes aegypti* d'après la méthode de titrage biologique de H. de Barjac et I. Larget, WHO-VBC-79.744. Elle s'éleve à 300 u/ml +/- 20 %.

On ajoute 2 pour mille d'acide citrique en poudre au produit ainsi obtenu.

15 Le pH de ce produit est ajusté à 4 par addition d'acide phosphorique.

Dans 500 g du produit ainsi obtenu, on introduit 5 g de tannin, de marque TANIN PB5 de la société PHARMACHEMIC et contenant 99 % d'acide tannique.

20 L'activité insecticide du produit obtenu est, aux erreurs de mesure près, égale à celle de la culture, les acides et le tannin ajoutés ne sont donc pas toxiques pour les insectes cibles.

Le produit est alors concentré par centrifugation pour donner une pâte contenant environ 12 % de matières sèches.

25 Cette pâte a une activité insecticide de 2800 u/mg +/- 20 %. Cette pâte est fluide et stable dans le temps.

Exemple 2 R (de comparaison)

On réalise une culture de *Bacillus thuringiensis* sérotype 14 comme à l'exemple 1. Puis on prépare une pâte identique à celle 30 de l'exemple 1 à l'exception de l'addition de tannin.

La pâte obtenue a une activité insecticide de 1500 u/mg +/- 20 %.

35 Les résultats comparés entre l'exemple 1 selon l'invention et l'exemple 2R de comparaison mettent en évidence que l'incorporation d'acide tannique à la culture avant la centrifugation permet de faciliter la récolte, d'améliorer le rendement de

centrifugation, de mettre à disposition la matière active du produit.

Exemple 3R (de comparaison)

5 On réalise une culture de *Bacillus thuringiensis* sérotype 14
comme à l'exemple 1. Puis on prépare une pâte identique à celle
de l'exemple 1 à l'exception de l'addition de tannin qui est
remplacé par l'addition de 0,1 % de silice , silice de marque
AEROSIL R 972 de la Société DEGUSSA.

10 L'activité insecticide de la pâte obtenue s'élève à
1300 u/mg +/- 20 %. La pâte est compacte et ne se disperse pas
dans l'eau.

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

1 - Compositions contenant des produits pesticides bio-synthétiques provenant de microorganismes de la famille des Bacillacées caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins un
5 tannin ou un dérivé de tannin.

2 - Compositions selon la revendication 1 caractérisées en ce qu'elles contiennent de l'acide tannique.

3 - Compositions selon la revendication 1 ou 2 caractérisées en ce que la quantité de tannin ou de dérivé de tannin est
10 comprise entre 0,01 et 20 % en poids de la composition.

4 - Compositions selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisées en ce que les microorganismes de la famille des Bacillacées sont des microorganismes des types Bacillus thuringiensis ou Bacillus sphaericus.

15 5 - Procédé pour la fabrication de compositions selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- 1) dans une première étape, on cultive le microorganisme dans un milieu de culture jusqu'à l'obtention d'une culture abondante
20 de ce microorganisme,
- 2) dans une deuxième étape, on ajoute à la culture obtenue une quantité de tannin ou de dérivé de tannin,
- 3) dans une troisième étape, on sépare l'eau de la culture contenant le tannin ou le dérivé de tannin en vue d'obtenir
25 une pâte,
- 4) dans une quatrième étape, on procède à la formulation de la pâte ainsi obtenue.

6 - Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que dans la deuxième étape on ajoute à la culture une quantité de
30 tannin ou de dérivé de tannin comprise entre 0,05 et 4 % en poids de la culture.

7 - Procédé pour éliminer les insectes, caractérisé en ce qu'on pulvérise sur les surfaces infestées les compositions selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.



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 9000738
BO 2493

| 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.5) |
| X | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 5, 4 août 1986, page 254, abrégé no. 37441g, Columbus, Ohio, US; H.S. SALAMA et al.: "Possible extension of the activity spectrum of Bacillus thuringiensis strains through chemical additives", & J. APPL. ENTOMOL. 1986, 101(3), 304-13 * Abrégé * | 1-4,7 | A 01 N 63/00 // (A 01 N 63/00 A 01 N 65:00) |
| A | WO-A-8 200 943 (BATTELLE DEVELOPMENT CORP.) | | |
| | | | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5) |
| | | | A 01 N |
| | | Date d'achèvement de la recherche | Examineur |
| | | 25-03-1991 | DONOVAN T.M. |
| <p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</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 & : membre de la même famille, document correspondant</p> | | | |

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

BE 9000738
BO 2493

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 12/04/91

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 |
|---|------------------------|---|------------------------|
| WO-A- 8200943 | 01-04-82 | EP-A- 0059707 | 15-09-82 |
| ----- | | | |