

## (12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 52682 A1**
- (51) Cl. internationale : **C12N 15/00; C12N 15/52; C12P 1/00**
- (43) Date de publication : **30.09.2022**
- 
- (21) N° Dépôt : **52682**
- (22) Date de Dépôt : **05.03.2021**
- (71) Demandeur(s) : **Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Route d'immouzer BP 2626, FES, 30000 (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **IBNSOUDA Saad ; ELAMIN Oumaima ; HAGGOU Abdellatif ; IRAQUI HOUSSAINI Mohammed**
- (74) Mandataire : **Ibnsouda Saad**
- 
- (54) Titre : **Production du lycopène en utilisant une nouvelle souche bactérienne surproduisant ce pigment**
- (57) Abrégé : La présente invention s'inscrit dans le cadre des efforts déployés pour améliorer le rendement du lycopène, un antioxydant puissant, produit par fermentation microbienne. L'invention concerne l'utilisation d'une nouvelle souche bactérienne mutée pour la production du lycopène avec un rendement important et les conditions de production de ce pigment. Ladite souche est isolée après mutagenèse par les rayons UV de *Mycobacterium smegmatis* MC2 155 contenant le plasmide pC51 qui porte les gènes crt E, crt B et crt I impliqués dans la biosynthèse du lycopène. Le mutant, ainsi isolé et contenant le vecteur pC51, produit ce pigment avec un rendement important (25.463 mg par g de poids sec) lorsque la culture est réalisée à pH 5,5 en présence de la lumière à une température de 37°C et sous agitation de 120 rpm. Le procédé, ainsi mis au point, pourrait être utilisé comme un système de production industrielle de ce carotène à intérêt médical et biotechnologique.

**Titre :** Production du lycopène en utilisant une nouvelle souche bactérienne surproduisant ce pigment

**Abrégé**

La présente invention s'inscrit dans le cadre des efforts déployés pour améliorer le rendement du lycopène, un antioxydant puissant, produit par fermentation microbienne. L'invention concerne l'utilisation d'une nouvelle souche bactérienne mutée pour la production du lycopène avec un rendement important et les conditions de production de ce pigment. Ladite souche est isolée après mutagenèse par les rayons UV de *Mycobacterium smegmatis* MC<sup>2</sup> 155 contenant le plasmide pC51 qui porte les gènes *crt E*, *crt B* et *crt I* impliqués dans la biosynthèse du lycopène. Le mutant, ainsi isolé et contenant le vecteur pC51, produit ce pigment avec un rendement important (25.463 mg par g de poids sec) lorsque la culture est réalisée à pH 5,5 en présence de la lumière à une température de 37°C et sous agitation de 120 rpm. Le procédé, ainsi mis au point, pourrait être utilisé comme un système de production industrielle de ce carotène à intérêt médical et biotechnologique.

**Titre :** Production du lycopène en utilisant une nouvelle souche bactérienne surproduisant ce pigment

## **Description**

### **Domaine technique**

Notre invention s'inscrit dans le cadre de la production naturelle et biologique des molécules à intérêts biotechnologique et médicale, et plus particulièrement l'invention concerne la production du lycopène, par biosynthèse en utilisant une nouvelle souche bactérienne.

### **Etat de l'art antérieur**

Les caroténoïdes sont des pigments rouge, jaune et orange largement répandus dans la nature. Ils sont par définition des tétraterpénoïdes ayant un enchaînement de huit unités isoprénoïdes, de ce fait ils possèdent un squelette carboné comprenant 40 atomes de carbone. La caractéristique la plus importante, responsable de leurs propriétés et fonctions spéciales, est la présence de plusieurs doubles liaisons conjuguées constituant le chromophore de la molécule. À ce jour, plus de 750 caroténoïdes différents sont identifiés, les plus abondants étant le  $\beta$  carotène, le lycopène, la lutéine, la  $\beta$ -cryptoxanthine, l' $\alpha$ -carotène et le zéaxanthine. Environ 20 caroténoïdes différents sont identifiés dans le sang humain.

Les caroténoïdes sont divisés en deux grandes classes, la première comprend les caroténoïdes hydrocarbonés appelés carotènes, tels que l' $\alpha$ -carotène, le  $\beta$ -carotène et le lycopène. La deuxième classe contient les dérivés oxygénés des caroténoïdes hydrocarbonés, appelés xanthophylles. Dans les xanthophylles, l'atome d'oxygène peut être présent sous la forme d'un alcool (par exemple, la lutéine), d'une cétone (par exemple, la canthaxanthine), d'un mélange d'alcool et de cétone (par exemple, l'astaxanthine) ou d'esters d'alcool (par exemple, la fucoxanthine).

Le lycopène (formule moléculaire :  $C_{40}H_{56}$ ) est un pigment phytochimique rouge. Il est présent avec une concentration considérable dans certains fruits et légumes, notamment les tomates. Le lycopène est le caroténoïde le plus répandu dans le corps humain. Il est classé parmi les antioxydants les plus puissants. C'est aussi l'un des caroténoïdes les plus commerciaux (Chen *et al.*, 2016).

La voie de biosynthèse du lycopène est présentée dans la figure 2. De manière universelle, les caroténoïdes sont biosynthétisés à partir de l'isopentényl pyrophosphate (IPP ; C5) et de son isomère le diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP). Ces deux précurseurs sont dérivés soit de la voie du déoxyxylulose phosphate (MEP) soit de la voie de l'acide mévalonique (MVA). Les organismes photosynthétiques, y compris les micro-algues et les plantes, utilisent principalement la voie MVA, tandis que les bactéries et les champignons synthétisent l'IPP et le DMAPP principalement via la voie MEP.

L'IPP et son isomère DMAPP sont condensés ensuite pour générer le géranyl pyrophosphate (GPP ; C10), ce dernier est transformé en farnésyl pyrophosphate (FPP ; C15) puis en géranylgéranyl diphosphate (GGPP ; C20).

La réaction clé pour la formation du squelette des carotènes est la condensation de deux molécules de géranyl diphosphate (20 carbones), qui conduit à la formation du phytoène (incolore) : le premier caroténoïde à 40 carbones. La formation des carotènes colorés nécessite un système d'extension de doubles liaisons par une série de réactions de désyhydrogénation. La désaturation du phytoène donne successivement le phytofluène, le  $\zeta$ -carotène, le neurosporène et le lycopène.

Le lycopène suscite un grand intérêt en raison de ses excellentes performances dans l'amélioration de la réponse immunitaire et la prévention des maladies chroniques, notamment l'ostéoporose, certains types de cancer, et les maladies cardiovasculaires (Liu *et al.*, 2012). Au cours des dernières années, la demande du lycopène a augmenté en raison de son utilisation dans les aliments pour animaux et dans les industries agro-alimentaire, pharmaceutique, cosmétique (Sevgili et Erkmen, 2019). De plus, le lycopène est utilisé en tant qu'antioxydant pour réduire les dommages cellulaires ou tissulaires et en tant qu'agent colorant dans les produits alimentaires (Sevgili et Erkmen, 2019). Cela rend le lycopène très attrayant dans différents domaines : industries agro-alimentaires, ainsi que la médecine et les formulations cosmétiques.

Actuellement, il existe trois méthodes principales de production de lycopène :

- Le lycopène peut être extrait des tomates. Les produits obtenus par cette méthode sont de haute qualité et ont une activité naturelle. Cependant, cette méthode est limitée par le climat, le nombre limité des sources des plantes, le coût élevé de production du au

processus complexe de purification dû au mélange des caroténoïdes, en plus, le processus de production s'accompagne du rejet d'une grande quantité de gaz résiduaire, de déchets liquides et de résidus de déchets (VallecillaYepez et Ciftci 2018).

- Le lycopène peut être aussi obtenu par synthèse chimique. Cette méthode présente les avantages d'un faible coût en matière première, des conditions de réaction douces et d'un rendement élevé. Mais le grand inconvénient de cette méthode réside dans la difficulté de contrôler la stéréo-sélectivité des doubles liaisons, le risque des réactifs chimiques résiduels, l'instabilité du produit et la sécurité (Li et al. 2020).
- Le lycopène peut être produit par des microorganismes naturels ou hétérologues. Cette méthode n'est pas affectée par la saison, la région, le climat, les grandes surfaces occupées par la culture des plantes, et présente comme avantages : un faible coût, un produit naturel de haute qualité, une sécurité élevée, en plus, cette méthode est respectueuse de l'environnement (Li, Z., et al., 2019). Plusieurs microorganismes sont rapportées comme des producteurs du lycopène : *Blakeslea trispora* est utilisé à échelle semi-industriel pour produire le lycopène. Mais le problème c'est qu'il est important d'ajouter des agents bloquants qui sont généralement utilisés pour inhiber la transformation du lycopène en  $\beta$ -carotène catalysée par la lycopène cyclase chez *B.trispora* (Hernández-Almanza et al.2016).

*Escherichia coli* est largement étudié comme un producteur possible du lycopène, Bien qu'elle ait montré un fort potentiel de synthèse du lycopène, les endotoxines bactériennes et les protéines toxiques potentiellement pathogènes ont limité sa production commerciale (Xie et al., 2014). Alternativement, *Saccharomyces cerevisiae* a été aussi utilisée en tant qu'hôte pour la synthèse du lycopène. Cependant, un processus de régulation transcriptionnel complexe, la compétition du contournement métabolique, l'incompatibilité entre les levures hôtes et la voie hétérologue, et un apport insuffisant de précurseurs sont des contraintes importantes affectant le rendement en lycopène dans la levure (Chen et al., 2016).

Le Brevet numéro JP2012139165 A divulgue un procédé de production du lycopène en utilisant un microorganisme du genre *Paracoccus*, mais le problème réside dans le mélange des caroténoïdes produits et les étapes lourdes de purification nécessaire pour purifier le lycopène

### **Exposé de l'invention**

La production du lycopène par fermentation est le moyen qui suscite le plus d'intérêt en raison de la demande des consommateurs pour des additifs alimentaires de haute qualité et «naturels». Cette voie de biosynthèse s'avère être une alternative biologique intéressante en raison de son rendement important et son coût réduit. Les mycobactéries peuvent être des producteurs possibles du lycopène. En effet, plusieurs espèces mycobactériennes sont colorées et sont connues par leur capacité de synthétiser des caroténoïdes. En plus, elles ont une membrane cellulaire très riche en lipide et sont donc considérablement avantageuses pour accumuler une grande quantité du lycopène. Elles présentent cependant un inconvénient, c'est la lenteur de leur croissance. Ainsi, la présente invention est donc relative à l'obtention d'une bactérie capable de produire une grande quantité du lycopène. Plus précisément, la présente invention concerne l'utilisation d'un mutant de *Mycobacterium smegmatis* MC<sup>2</sup> 155 qui présente une productivité améliorée du lycopène lorsqu'il est transformé avec un plasmide contenant les gènes de production de ce pigment (Figure 3). Ce mutant est obtenu après mutagenèse par les rayons UV. En plus du rendement important, ce mutant produit principalement le lycopène, ce qui pourrait constituer un grand avantage pour une éventuelle utilisation industrielle. En effet, dans ce cas, les étapes de purification coûteuses et lourdes peuvent être évitées.

La présente invention concerne également un procédé de production du lycopène comprenant les paramètres physicochimiques de la culture de cette bactérie et l'extraction du lycopène à partir des cellules bactériennes ou d'une solution de culture.

### **Brève description des figures**

La figure 1 présente la structure du lycopène

La figure 2 présente la voie de biosynthèse du lycopène chez les bactéries non-photosynthétiques

La figure 3 présente la Carte physique du plasmide pC51 : Les pointillés représentent le vecteur pHLD69. Symboles ; pr : le promoteur lacZ. Les sites de restriction des endonucléases sont abrégés comme suit : B : *Bam*H I ; E : *Eco*R I ; K : *Kpn* I ; P : *Pst* I ; S : *Sph* I. Les gènes *crtE*, *crtB* et *crtI* codent respectivement pour la GGPP synthase (synthèse du GGPP), la phytoène synthase (synthèse du phytoène à partir du GGPP) et la phytoène désaturase (transformation du phytoène en lycopène). Le vecteur pHLD69 est constitué du vecteur pUC19, du gène de

résistance à la kanamycine et de l'origine de répllication du plasmide pAL5000 (Houssaini-Iraqi et *al.*, 2001).

La figure 4 présente les colonies en chou-fleur de différentes souches de *M. smegmatis* ; A : Mutant de *M. smegmatis* contenant le plasmide pC51 (souche AI) ; B : *M. smegmatis* non transformé.

La figure 5 présente l'analyse chromatographique de l'extrait du *M. smegmatis* AI, M : extrait de *M. smegmatis* AI.

La figure 6 présente le spectre d'absorption du pigment de *M. smegmatis* AI.

### **Exposé détaillé du mode de réalisation de l'invention**

La présente invention porte sur l'utilisation d'un mutant de la bactérie *Mycobacterium smegmatis* MC<sup>2</sup> 155 pour produire le lycopène.

La dite souche est déposée auprès des Collections Coordonnées Marocaines de Micro-organismes sous le numéro CCMMP6. Cette souche correspond au mutant de *M. smegmatis* MC<sup>2</sup> 155 ne contenant pas de plasmide. La souche AI est la souche CCMMP6 contenant le plasmide pC51.

La Souche bactérienne objet de l'invention est capable de produire une grande quantité de lycopène lorsqu'elle est transformée par les gènes *crtE*, *crtB* et *crtI* de la biosynthèse de ce pigment.

Un autre volet de l'invention est le procédé de production de lycopène qui comporte les étapes suivantes :

- Transformation de *Mycobacterium smegmatis* MC<sup>2</sup> 155 par le plasmide pC51 contenant les gènes *CrtE*, *CrtB* et *CrtI* impliqués dans la biosynthèse du lycopène.
- Mutagenèse de *Mycobacterium smegmatis* MC<sup>2</sup> 155 contenant le plasmide pC51
- Culture de la souche *M. smegmatis* AI obtenue après mutagenèse
- Extraction du lycopène à partir de la souche AI
- Quantification du lycopène

La souche objet de l'invention est obtenue par mutation génétique des cellules de *Mycobacterium smegmatis* par exposition aux rayons ultraviolettes.

Selon l'invention, l'éape de mutation génétique se fait par exposition à la lumière Ultraviolette UV dans les conditions suivantes :

- a. Un temps d'exposition à la lumière UV d'environ 10 min ;
- b. Une distance d'exposition d'environ 57 cm, et
- c. Une intensité de la lumière UV d'environ 6 W-254 nm

### **Exemple 1 : Transformation de *M. smegmatis* MC<sup>2</sup> 155 par électroporation**

*M. smegmatis* MC<sup>2</sup> 155 est transformé avec le plasmide pC51 contenant les gènes *crt E*, *crt B* et *crt I* responsables de la production du lycopené (Houssaini-Iraqi et *al.*, 2001). Pour ce faire, *M. smegmatis* est cultivé dans le milieu Sauton liquide à 37°C pendant 2 jours (DO<sub>600</sub> = 0,3), 1 ml de la culture liquide est centrifugé et le culot est lavé au moins 5 fois avec de l'eau distillée stérile, les cuves d'électroporation sont lavées avec de l'alcool et rincées avec de l'eau distillée stérile. 40 µL des cellules de *M. smegmatis* sont électrotransformées par 2 µL d'ADN plasmidique en utilisant une cuve d'électroporation de 0,2 cm. L'électroporation se fait par une impulsion électrique grâce à un électroporateur en utilisant les paramètres suivants : résistance, 200 Ω ; tension électrique, 2,5 kV ; capacité, 25 µF. Le mélange ADN-bactéries est transféré immédiatement dans 960 µL de milieu LB liquide puis incubé à 37°C pendant au moins 3 heures. La culture est centrifugée à 5000 rpm pendant 5 minutes, puis le culot est repris dans 100 µL de LB liquide. Les cellules sont alors étalées sur milieu LB solide additionné à la Kanamycine à 50 µg /ml et incubées à 37°C pendant 5 jours. L'un des clones, obtenu après la transformation, est utilisé dans les expériences de mutagenèse. Ce clone produit une faible quantité de lycopené (1,41 ± 0,09 mg / g du poids sec).

### **Exemple 2 : Mutagenèse de *Mycobacterium smegmatis* MC<sup>2</sup> 155 contenant le plasmide pC51**

La mutagenèse par UV est réalisée de la manière suivante : les cellules de *Mycobacterium smegmatis*, contenant le plasmide pC51, sont cultivées sur la gélose Sauton à 37 °C pendant 7 jours puis diluées à une concentration de 10<sup>4</sup> cellules / ml. Des aliquotes 100 µL de cette culture diluée sont étalées par la suite sur gélose LB. Les cultures sont ensuite exposées aux UV (boîtes ouvertes) en utilisant une lampe ultraviolette (6 W-254nm tube ; Vilber Lourmat, French) située

à une distance de 57 cm. Le temps d'exposition aux UV varie de 4 min à 12 min (4 min, 6 min, 8 min, 10 min, 11 min et 12 min). Un témoin est préparé dans les mêmes conditions mais non exposé aux UV. Les boîtes sont ensuite incubées dans une étuve à 37°C pendant 7 jours à l'obscurité. Cette manipulation est répétée plusieurs fois afin d'augmenter la chance d'obtenir une souche qui produit le lycopène avec un rendement important.

Ces expériences de mutagenèse ont permis l'isolement d'un clone très rouge (*M. smegmatis* AI, figure 4). *M. smegmatis* AI est la souche CCMMP6 contenant le plasmide pC51

### **Exemple 3 : Extraction du lycopène à partir de *M. smegmatis* AI**

L'extraction du lycopène est réalisée comme suivant : *M. smegmatis* AI est cultivée sur le milieu LB solide pendant 7 jours. Après cette incubation, les colonies sont repiquées par la suite dans un volume de chloroforme-méthanol (1:1). Après centrifugation, le surnageant est évaporé et le résidu pigmenté est solubilisé dans l'acétone, une incubation de 2 heures à 4°C est nécessaire pour l'élimination des phospholipides. Après centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min, le surnageant est évaporé et un mélange eau méthanol-éther de pétrole (5:45:50) est ajouté sur le résidu. Après avoir bien agité, le mélange est centrifugé à 1000 rpm pendant 5 min. A l'issue de cette centrifugation, deux phases sont obtenues, une épiphase contenant les carotènes, et une hypophase contenant les xanthophylles, l'épiphase est récupérée pour les analyses ultérieures. Après extraction des caroténoïdes, le culot bactérien est séché, puis son poids sec est déterminé. Cette expérience est répétée au moins 3 fois. Afin de séparer les différents carotènes produits, une analyse chromatographique sur plaque de silice en aluminium (15 x 4 cm Silica gel 60 F<sub>254</sub>) est réalisée. L'extrait des carotènes est concentré puis déposé sur une plaque de silice, l'éluant utilisé est un mélange d'éther de pétrole-acétone (99,5 : 0,5 (V/V)). Après la migration, la zone correspondante au lycopène sur le chromatogramme est grattée (Figure 5), puis le lycopène est récupéré dans l'acétone. Après évaporation, le résidu est solubilisé dans l'hexane. Dans la mesure du possible, toutes les procédures sont effectuées dans l'obscurité. Le lycopène de la tomate est purifié puis utilisé comme témoin.

### **Exemple 4 : Identification et quantification du lycopène**

Pour identifier le lycopène, le spectre d'absorption de la fraction purifiée contenant le pigment, est déterminé pour les longueurs d'onde comprises entre 390 nm et 525 nm. Le spectre ainsi

déterminé est utilisé pour l'identification du pigment extrait (Figure 6). Cette identification est réalisée en comparant le spectre d'absorption obtenu avec les données de la littérature.

Pour quantifier le lycopène produit, la souche de *M. smegmatis* AI est cultivée sur gélose sauton pendant sept jours. Les pigments sont extraits comme décrit ci-dessus. La teneur des extraits en lycopène est déterminée à 470 nm (avec un spectrophotomètre (BK-UV1000 ; BIOBASE, Chine) par la loi de Beer-Lambert, le coefficient d'extinction utilisé est 3400. La teneur en lycopène est exprimée en mg/g de poids sec.

### **Exemple 5 : détermination des paramètres physicochimiques optimaux**

Pour déterminer les paramètres physicochimiques optimums (la durée d'incubation, le pH initial, la température, l'agitation et la lumière) pour la production du lycopène, des cultures de 50 ml de *M. smegmatis* AI, de même densité optique, sont incubées pendant 12 jours. Des échantillons sont prélevés toutes les 24 h pour déterminer la croissance microbienne et la production du lycopène. Les résultats optimaux de chaque expérience sont conservés puis reportés dans les autres expériences.

Remarque :

- ✓ Pour étudier l'effet de ces paramètres sur la croissance microbienne, celle-ci est suivie par la mesure de la turbidité à 600 nm. Pour cela, des aliquotes de 2 ml de chaque culture sont introduits dans une cuve, puis les absorptions sont déterminées à l'aide du spectrophotomètre (MAPADA V-1200). L'expérience est répétée trois fois.
- ✓ L'extraction et la quantification du lycopène sont réalisées selon la méthode décrite précédemment.

D'après l'invention, la souche, *M. smegmatis* AI produit le lycopène avec un rendement important de 25.463 mg/g de poids sec lorsque la culture est incubée pendant 7 j ( $D.O_{600\text{ nm}} = 1,1$ ) à pH 5,5 en présence de la lumière à une température de 37°C et sous agitation de 120 rpm.

### **Application industrielle**

La présente invention peut être appliquée pour la production naturelle et biologique des molécules à intérêts biotechnologique et notamment la production du lycopène.

**Revendications**

1. Souche bactérienne déposée auprès des Collections Coordonnées Marocaines de Micro-organismes sous Numéro CCMMP6, caractérisée en ce qu'elle produit sélectivement le lycopène.
2. Souche bactérienne, selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par mutation génétique dans le génome bactérien de la souche *Mycobacterium smegmatis* MC<sup>2</sup> 155.
3. Souche bactérienne, selon les revendications 1 et 2, caractérisée en ce qu'elle est capable de produire une grande quantité de lycopène lorsqu'elle est transformée par les gènes *crtE*, *crtB* et *crtI* de la biosynthèse de ce pigment.
4. Procédé de production de lycopène caractérisé par l'utilisation de la souche selon l'une des revendications précédentes.
5. Procédé de production de lycopène, selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :
  - a. Transformation de *Mycobacterium smegmatis* MC2 155 par le plasmide pC51 contenant les gènes *CrtE*, *CrtB* et *CrtI* impliqués dans la biosynthèse du lycopène ;
  - b. Mutagenèse de *Mycobacterium smegmatis* MC2 155 contenant le plasmide pC51 ;
  - c. Culture de la souche *M. smegmatis* AI obtenue après mutagenèse ;
  - d. Extraction du lycopène à partir de la souche AI ; et
  - e. Quantification du lycopène.
6. Procédé de production du lycopène, selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il permet d'obtenir un rendement dépassant 25 mg par g de poids sec.
7. Procédé de production du lycopène, selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il donne un rendement dépassant 25mg par g de poids sec lorsque la culture est incubée pendant 7 jours à pH 5,5 en présence de la lumière à une température de 37°C et sous agitation de 120 rpm.
8. Procédé de production de lycopène, selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape de mutagenèse se fait par exposition à la lumière Ultraviolette UV dans les conditions suivantes :
  - a. Un temps d'exposition à la lumière UV d'environ 10 min ;
  - b. Une distance d'exposition d'environ 57 cm, et
  - c. Une intensité de la lumière UV d'environ 6 W-254 nm

## Dessins

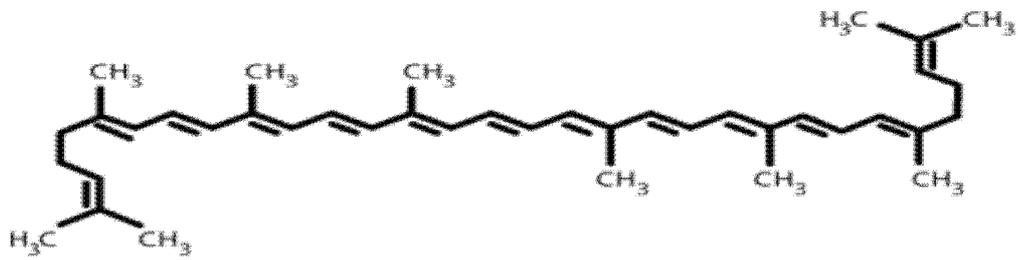
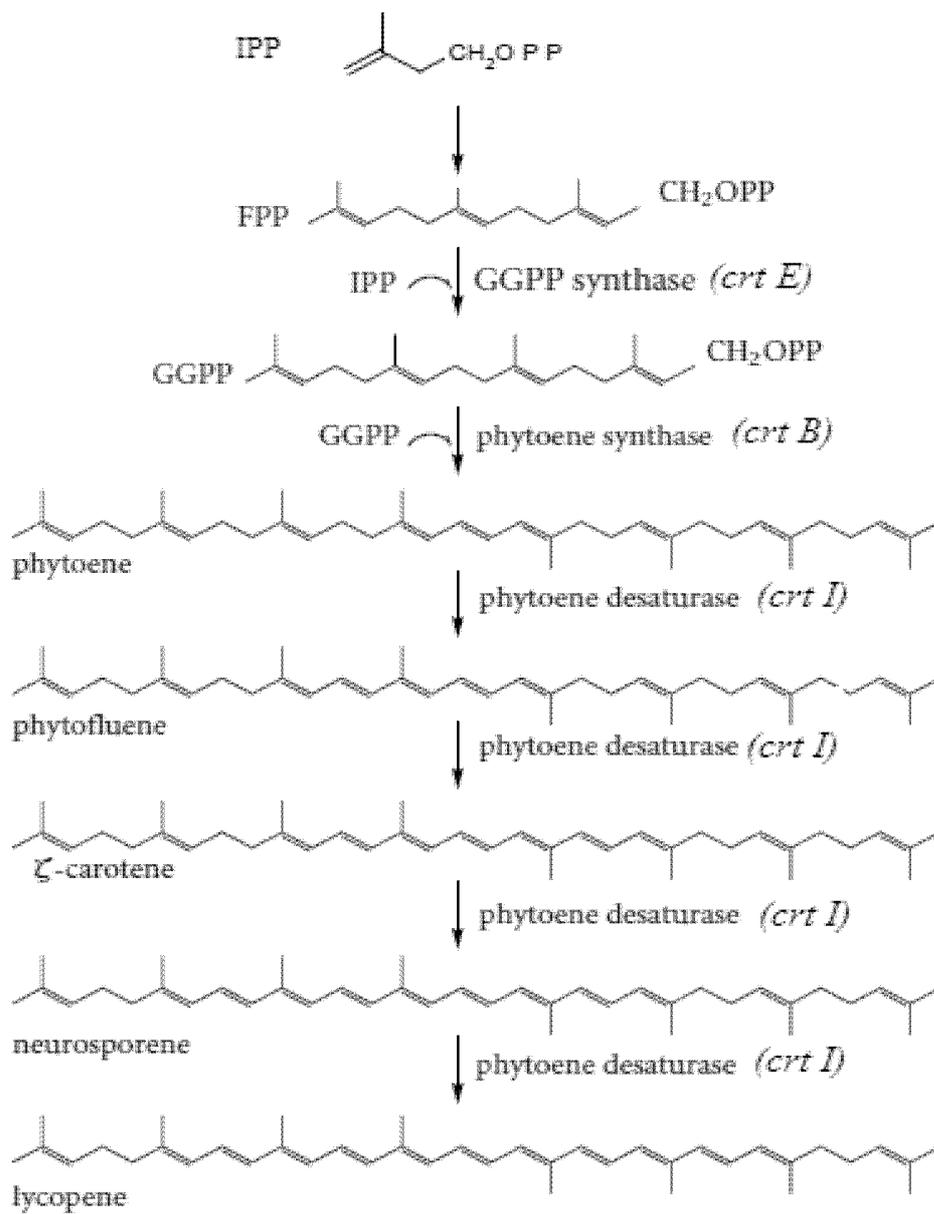
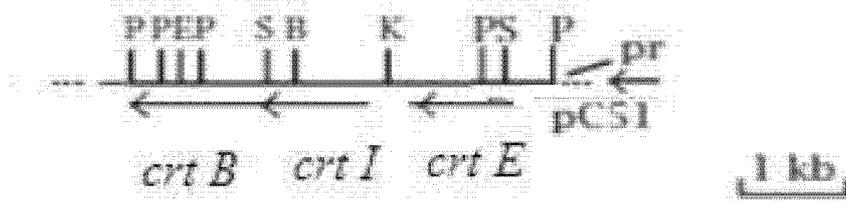


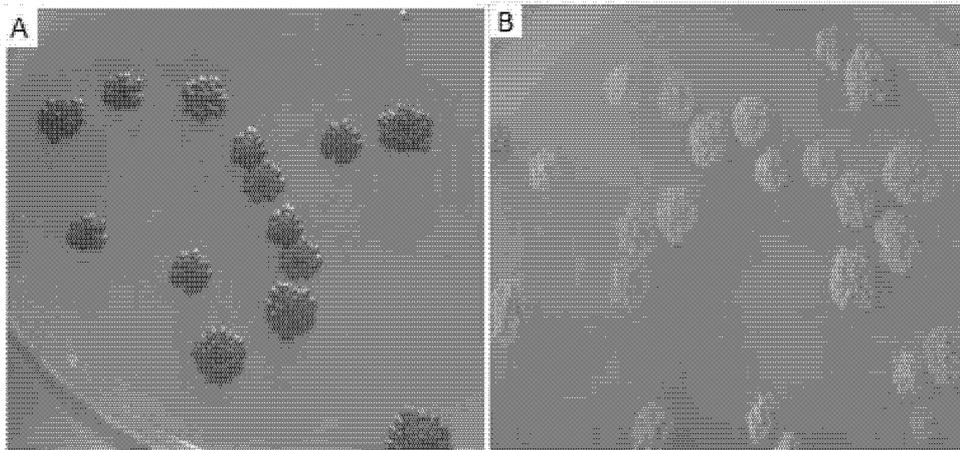
Figure 1 : Structure du lycopène



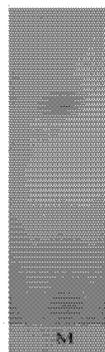
**Figure 2 :** Voie de biosynthèse du lycopène chez les bactéries non-photosynthétiques



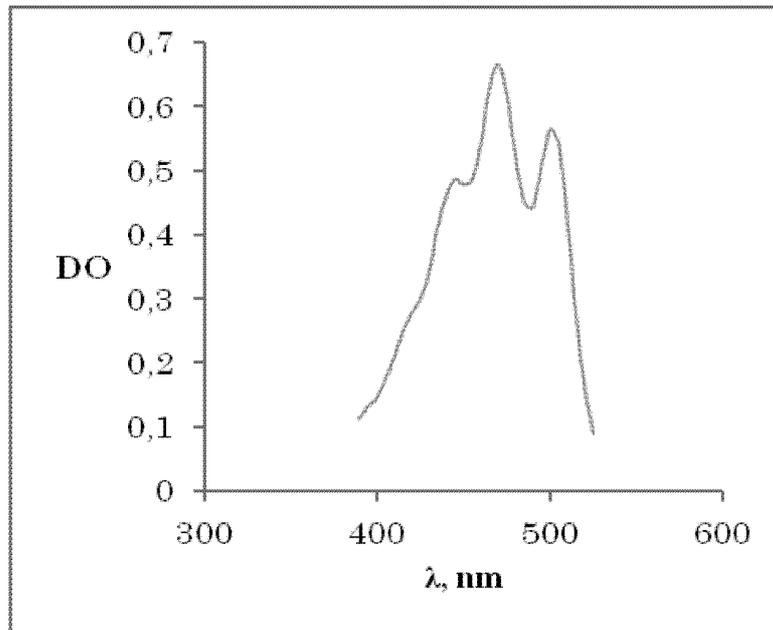
**Figure 3 :** Carte physique du plasmide pC51 (Houssaini-Iraqi et *al.*, 2001).



**Figure 4 :** Colonies en chou-fleur de différentes souches de *M. smegmatis* ; A : Mutant rouge de *M. smegmatis* contenant le plasmide pC51 (souche AI) ; B : *M. smegmatis* non transformé.



**Figure 5 :** Analyse chromatographique de l'extrait *M. smegmatis* AI, M : extrait de *M. smegmatis* AI



**Figure 6** : Spectre d'absorption du pigment de *M. smegmatis* AI.

**RAPPORT DE RECHERCHE  
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**  
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la  
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée  
par la loi 23-13)

<b>Renseignements relatifs à la demande</b>	
N° de la demande : 52682	Date de dépôt : 05/03/2021
Déposant : Université Sidi Mohammed Ben Abdellah	
Intitulé de l'invention : Production du lycopène en utilisant une nouvelle souche bactérienne surproduisant ce pigment	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site <a href="http://worldwide.espacenet.com">http://worldwide.espacenet.com</a> , et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport <input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité <input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de forme et de clarté <input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
Examineur : LAHCHIMI Fatima Zahra	Date d'établissement du rapport : 14/10/021
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	

**Partie 1 : Considérations générales****Cadre 1 : base du présent rapport**

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description  
8 Pages
- Revendications  
8
- Planches de dessin  
4 Pages

**Partie 2 : Rapport de recherche**

Classement de l'objet de la demande :

CIB : C12N1/21, C12P1/04, C12N15/00, C12P 5/02, C12N15/52

CPC : C12N1/21, C12P1/04, C12N15/00, C12P 5/02, C12N15/52

Plateformes et bases de données électroniques de recherche :

EPOQUENET, WPI, ScienceDirect, ORBIT

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
X	Lycopene production in mycobacterium smegmatis by expression of crt genes from mycobacterium aurum and protective effect of lycopene in vivo and in vitro against uv radiation; international journal of pharmacy and pharmaceutical sciences; ISSN- 0975-1491 Vol 10, Issue 9 ; 30/07/2018 ; Tout le document	1-8

**\*Catégories spéciales de documents cités :**

--« 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

--« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

--« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs

--« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

**Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité****Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

Nouveauté	Revendications aucune Revendications 1-8	Oui Non
Activité inventive	Revendications aucune Revendications 1-8	Oui Non
Application Industrielle	Revendications 1-8 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1 : Lycopene production in mycobacterium smegmatis by expression of crt genes from mycobacterium aurum and protective effect of lycopene in vivo and in vitro against uv radiation;

**1. Nouveauté et activité inventive :**

Le document D1 décrit l'ensemble des caractéristiques techniques de la présente invention, à savoir :

- La souche bactérienne obtenue par mutation génétique dans le génome bactérien de la souche Mycobactérieum smegmatis MC2 155 par le plasmide Pc51 contenant les gènes CrtE, CrtB, CrtI impliqués dans la biosynthèse du lycopéne.
- Et le procédé de production de lycopéne par l'utilisation de la souche revendiquée avec l'ensemble des étapes (la transformation du Mycobactérieum smegmatis MC2 155, la mutagénèse, la culture de la souche, l'extraction du lycopéne et sa quantification).

En se basant sur ce qui précède, l'objet des revendications 1-8 de la présente invention ne répond pas au critère de nouveauté conformément à l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Etant pas nouvelles, les revendications 1-8 n'impliquent pas une activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

**2. Application industrielle**

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.