

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2015/075391 A1**

(51) Classification internationale des brevets :  
C12N 9/42 (2006.01) C12N 15/56 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2014/052984

(22) Date de dépôt international :  
21 novembre 2014 (21.11.2014)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
13 61509 22 novembre 2013 (22.11.2013) FR

(71) Déposants : IFP ENERGIES NOUVELLES [FR/FR]; 1 & 4, avenue Bois Préau, F-92500 Rueil Malmaison (FR). PROTÉUS [FR/FR]; ZI de la Vigne aux Loups 23 rue Bossuet, F-91160 Longjumeau (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS - [FR/—]; 3, rue Michel Ange, Paris Cedex 16, 75794 (FR).

(72) Inventeurs : MARGEOT, Antoine; 212 rue Marcadet, F-75018 Paris (FR). BENOIT, Yves; 10 rue Carnot, F-95480 Pierrelaye (FR). PERSILLON, Cécile; 3 rue de la Comtesse, F-30000 Nîmes (FR). AYRINHAC, Céline; 7 lotissement le Coteau, F-30350 Domessargues (FR). ULLMANN, Christophe; 5, rue Deparcieux, F-30000 Nîmes (FR). BONZOM, Olivier; 5 rue de la servie, F-30000 Nîmes (FR). FORT, Sébastien; 55 chemin du Parc, F-38410 Vaulnaveys-le-Haut (FR). ARMAND, Sylvie; 23 rue Marquian, F-38100 Grenoble (FR). PETIT, Maud; 14 rue Jean Baptiste Ducrocq, F-59700 Marcq En Baroeul (FR). LENON, Marine; 27 Chemin de Vinay, F-38360 Sassenage (FR).

(74) Mandataire : CABINET PLASSERAUD; 52 rue de la Victoire, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))
- avec la partie de la description réservée au listing des séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : ENDOGLUCANASE VARIANTS HAVING IMPROVED ACTIVITY, AND USES OF SAME

(54) Titre : VARIANTS D'ENDOGLUCANASES A ACTIVITE AMELIOREE ET LEURS UTILISATIONS

(57) Abstract : The present invention relates to the expression and optimisation of enzymes involved in the breakdown of lignocellulosic biomass. The present invention relates more specifically to variants of *Trichoderma reesei* endoglucanase I, and the use of said variants having an improved performance in methods of breaking down cellulose and producing biofuel.

(57) Abrégé : La présente invention porte sur l'expression et l'optimisation d'enzymes impliquées dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique. La présente invention porte plus particulièrement sur des variants de l'endoglucanase 1 de *Trichoderma reesei*, ainsi que sur l'utilisation de ces variants à performance améliorée dans des procédés de dégradation de la cellulose et de production de biocarburant.



WO 2015/075391 A1

**VARIANTS D'ENDOGLUCANASES A ACTIVITE AMELIOREE ET LEURS  
UTILISATIONS**

La possibilité de produire de l'éthanol à partir de la  
5 cellulose a reçu beaucoup d'attention en raison de la  
disponibilité de grandes quantités de matière première  
ainsi que de l'intérêt de l'éthanol à titre de carburant.  
Les matières premières naturelles cellulosiques pour un tel  
processus sont désignées par le terme "biomasse". De  
10 nombreux types de biomasse, par exemple le bois, les  
résidus agricoles, les cultures herbacées et les déchets  
solides municipaux, ont été considérés comme des matières  
premières potentielles pour la production de biocarburant.  
Ces matières sont constituées principalement de cellulose,  
15 d'hémicellulose et de lignine.

La cellulose est un polymère constitué de molécules de  
glucose reliées par des liens beta 1-4, qui sont très  
résistants à la dégradation ou à la dépolymérisation. Une  
20 fois la cellulose convertie en glucose, celui-ci est  
facilement fermenté en biocarburant, par exemple l'éthanol,  
en utilisant une levure.

Les plus anciennes méthodes étudiées pour convertir la  
25 cellulose en glucose sont basées sur l'hydrolyse acide. Ce  
processus peut se faire en présence d'acides concentrés ou  
dilués. Cependant, plusieurs inconvénients tels que la  
mauvaise récupération de l'acide lors de l'utilisation  
d'acides concentrés et la faible production de glucose dans  
30 le cadre de l'utilisation d'acides dilués nuisent à  
l'économie du processus d'hydrolyse acide.

Pour surmonter les inconvénients du processus  
d'hydrolyse acide, les processus de conversion de la

cellulose ont porté plus récemment sur l'hydrolyse enzymatique, à l'aide d'enzymes de type cellulase. Cette hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique (par exemple, la cellulose) présente cependant l'inconvénient d'être un procédé industriel coûteux. De ce fait, il est nécessaire d'utiliser des souches de microorganismes sécréteurs de cellulases de plus en plus performantes. À ce titre, beaucoup de microorganismes comportent des enzymes qui hydrolysent la cellulose, tels que les champignons *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Hemicola*, *Fusarium* ainsi que des bactéries telles que *Thermomonospora*, *Bacillus*, *Cellulomonas* et *Streptomyces*. Les enzymes sécrétées par ces microorganismes possèdent trois types d'activités utiles dans la conversion de la cellulose en glucose et se divisent en trois groupes: les endoglucanases, qui attaquent les fibres de celluloses aléatoirement en interne, les exoglucanases qui vont attaquer les extrémités des fibres en libérant du cellobiose, et les  $\beta$ -glucosidases qui vont hydrolyser ce cellobiose en glucose. D'autres classes d'enzymes telles que les hémicellulases ou la classe d'enzymes récemment découverte des polysaccharides mono-oxygénases peuvent jouer également un rôle dans l'efficacité de l'hydrolyse.

Il y a un intérêt industriel fort pour la diminution du coût de l'hydrolyse enzymatique, et cette diminution passe par l'utilisation d'une dose réduite d'enzymes et donc des cocktails d'enzymes plus efficaces. En conséquence, plusieurs demandes de brevets décrivent des enzymes naturelles aux capacités supérieures à celles de *Trichoderma reesei*, ou des variants améliorés par génie génétique. On peut citer les demandes de brevet US2010304464, WO2010066411 et WO2013029176 concernant les exoglucanases, les demandes WO2007109441, WO2012149192 et

WO2010076388 concernant les endoglucanases, les demandes WO2010029259, WO2010135836 ou WO2010022518 concernant les beta-glucosidases, ou encore les demandes WO12135659, WO12149344 concernant les polysaccharides mono-oxygénases.

5

Les enzymes hydrolysant la biomasse lignocellulosique sont classées dans le système CAZy (Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. Nucleic acids research, 37, D233-8) sur des critères principalement structuraux. Les endoglucanases peuvent appartenir aux familles GH 5, 6, 7, 8, 9, 12, 16, 18, 19, 26, 44, 45, 48, 51, 74 et 124.

15

Pour qu'une hydrolyse de la biomasse lignocellulosique soit efficace et économiquement rentable, le mélange enzymatique doit comporter des proportions équilibrées d'enzymes ayant des activités enzymatiques diverses, entre autres, mais non exclusivement, du type exoglucanases, endoglucanases, xylanases et  $\beta$ -glucosidases. A titre d'exemple, dans les mélanges natifs de *Trichoderma reesei* on constate généralement la présence de 60-70% d'exoglucanases, 15-20% d'endoglucanases, quelques pourcentages d'hémicellulases et environ 5-10% de  $\beta$ -glucosidases. Ce mélange convient pour hydrolyser la majorité des substrats prétraités (ex. type paille de blé explosée à la vapeur en conditions acides) avec des rendements acceptables. En somme, l'augmentation de l'activité endoglucanase ne doit pas se faire au détriment des autres activités enzymatiques. Les spécificités fonctionnelles de ces enzymes sont aujourd'hui mal connues. Le génome de *Trichoderma reesei* comporte au moins 3 enzymes principales, issues des familles 7 (EG1, cel7b), 5 (EG2,

30

cel5a) et 12 (EG3, Cell12a). Les enzymes EG1 et EG2 sont les endoglucanases majoritaires et peuvent représenter jusqu'à 10-20% en masse du cocktail d'enzymes complet produit par *T. reesei*.

5

Les endoglucanases (EC 3.2.1.4), premières enzymes à agir sur la cellulose, sont connues pour avoir un rôle majeur dans l'hydrolyse en augmentant le nombre de sites que peuvent attaquer les exoglucanases tout en diminuant le degré de polymérisation des microfibrilles attaquées. De récents travaux (Szijártó, N., Siika-aho, M., Sontag-Strohm, T., & Viikari, L. (2011). Liquefaction of hydrothermally pretreated wheat straw at high-solids content by purified *Trichoderma* enzymes. *Bioresource technology*, 102(2), 1968-74) soulignent leur rôle dans la diminution de la viscosité de la biomasse au cours des premières heures de l'hydrolyse. Cette diminution de viscosité peut avoir un impact très important sur les coûts opératoires du procédé.

20

Le problème de viscosité est exacerbé dans le cas de procédés imposant le recours à une basse température telle que la saccharification simultanée à la fermentation (SSF), qui met en jeu à la fois les enzymes hydrolysant la biomasse et le micro-organisme qui convertit les monomères de sucres en éthanol.

25

L'hydrolyse et la fermentation peuvent être réalisées suivant différents schémas. Le plus courant consiste en une hydrolyse et une fermentation séparées (SHF - Separate Hydrolysis and Fermentation). Cette méthode permet d'optimiser chaque étape par le maintien des conditions optimales de réaction. Cette fermentation s'effectue de manière extemporanée, à une température comprise entre environ 28°C et environ 30°C, tandis que

30

l'hydrolyse a lieu généralement à une température d'au moins 45°C. Cependant, en SHF, les sucres libérés en fin de réaction sont présents à très forte concentration et entraînent une inhibition des enzymes, ralentissant l'efficacité du procédé. Pour éviter ces inconvénients, un autre type de procédé peut être envisagé. En SSF, les deux étapes (hydrolyse et fermentation des hexoses) ont lieu de manière simultanée, empêchant l'accumulation des sucres à des concentrations inhibitrices pour les enzymes. Les coûts d'investissement sont également réduits grâce à l'utilisation d'un seul réacteur. Le taux d'hydrolyse est plus élevé suite à l'absence d'inhibition car les sucres libérés sont utilisés immédiatement pour la fermentation en éthanol. Dans cette méthode, la température du réacteur constitue nécessairement un compromis entre les températures optimales d'hydrolyse et de fermentation, typiquement entre environ 30°C et environ 35°C. Cependant, à une telle température, l'activité des enzymes cellulolytiques est diminuée de 30% environ.

20

La SSF permet également l'expression d'enzymes dégradant la cellulose dans l'organisme fermentant les sucres, ce qui permet de limiter, ou dans un cas extrême de supprimer le recours aux enzymes produites lors d'une étape séparée. Cependant, produire de grandes quantités d'enzymes avec les organismes fermentaires et donc obtenir une activité importante peut s'avérer problématique et limite la viabilité de ces approches.

30

En conséquence, l'obtention d'enzymes maintenant une activité endoglucanase efficace aux températures optimales d'hydrolyse et de fermentation (soit entre 30°C et 50°C) tout en gardant la proportion de l'ensemble des enzymes du

mélange serait un gain significatif pour le procédé de conversion de biomasse lignocellulosique en biocarburant.

### Description de l'invention

5

Les inventeurs ont développé un polypeptide ayant une activité endoglucanase améliorée, notamment par rapport à l'activité endoglucanase de la protéine sauvage EG1 de séquence SEQ ID NO :2. EG1 correspond à l'endoglucanase 1  
10 de *Trichoderma reesei*.

Dans cette optique, les déposants, ont eu le grand mérite de trouver, après de nombreuses recherches, un polypeptide isolé ou purifié ayant une activité  
15 endoglucanase améliorée par rapport à l'activité endoglucanase de la protéine de référence EG1 (SEQ ID NO :2).

L'invention concerne donc un polypeptide choisi dans le groupe consistant en :

- 20 i) une séquence d'acides aminés choisie parmi SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :12; SEQ ID NO :14 SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :24 et SEQ ID NO :26;
- 25 ii) une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 70%, préférentiellement 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99%, par rapport à la séquence SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :10, SEQ ID  
30 NO :12; SEQ ID NO :14 SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :24 ou SEQ ID NO :26.

De préférence, le polypeptide tel que décrit précédemment est caractérisé en ce que son expression dans un organisme fermentaire est au moins égale à l'expression de la protéine de référence EG1 (SEQ ID NO :2).

5

Selon l'invention, le pourcentage d'identité d'une séquence donnée par rapport à SEQ ID NO :4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ou 26, correspond au nombre de résidus identiques entre cette séquence donnée et SEQ ID NO :4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ou 26 divisé par le nombre de résidus dans SEQ ID NO :4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ou 26. Lorsqu'on utilise la base de données GenomeQuest, ledit pourcentage d'identité par rapport à SEQ ID NO : 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ou 26 correspond au pourcentage d'identité d'Interrogation (% id Query), où Interrogation correspond à la séquence SEQ ID NO :4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ou 26.

20 L'homme du métier pourra par exemple déterminer l'augmentation ou autrement dit l'amélioration de l'activité enzymatique soit à l'aide du substrat Carboxy-Méthyl-Cellulose (CMC), soit avec un substrat chromogénique (p-Nitrophenyl glycoside). L'activité enzymatique sera  
25 respectivement révélée par dosage colorimétrique des sucres réducteurs ou bien du nitrophénol libérés.

De préférence, le polypeptide de l'invention a une activité enzymatique améliorée d'au moins 10%,  
30 préférentiellement d'au moins 20%, préférentiellement d'au moins 30%, par rapport à l'activité endoglucanase de la protéine EG1 de séquence d'acides aminés SEQ ID NO :2.

Un exemple de protocole, que l'homme du métier pourra utiliser pour déterminer si un polypeptide selon l'invention présente une activité enzymatique améliorée par rapport à celle de la protéine de référence EG1 (SEQ ID NO 5 :2), est le suivant :

- formation d'une culture stock d'*E. coli* exprimant un polypeptide selon l'invention pendant toute la nuit à 37°C;
- ensemencement d'un milieu de culture LB avec 1% de culture stock à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité 10 optique de 0.4 ;
- culture desdites cellules à 20°C pendant 18h ;
- centrifugation pendant 5 minutes à 7900 rpm ;
- resuspension des culots cellulaires avec du tampon citrate phosphate 100 mM à pH 5 contenant 1 mg/mL de 15 lysozyme (DO<sub>600</sub> finale 100);
- incubation des cellules resuspendues 30 minutes sur la glace ;
- lyse des cellules par 3 cycles de congélation/décongélation ;
- 20 -fractionnement de l'ADN par sonication ;
- centrifugation 30 minutes à 13000 rpm ;
- incubation de 100 µL de surnageant de cassage avec 100 µL de tampon citrate phosphate 100 mM à pH 5 contenant 1% de CMC pendant 6h à 35 et 50°C ;
- 25 -prélèvement de 100 µL de réaction ;
- ajout de 100 µL de réactif DNS (Miller, 1959);
- incubation 5 minutes à 100°C ;
- incubation 3 minutes sur la glace ;
- centrifugation pendant 10 minutes à 3000 rpm ;
- 30 -lecture de la densité optique à 540 nm sur 150 µL de surnageant.

L'invention a également pour objet un acide nucléique purifié ou isolé codant au moins un polypeptide tel que

décrit précédemment. Le TABLEAU 1 ci-dessous comprend les identifications des séquences nucléiques et peptidiques pour EG1 de *T. reesei* ("sauvage"), les endoglucanases putatives de *Chaetomium globosum* (C) et d'*Aspergillus fumigatus* (A), ainsi que pour les polypeptides et nucléotides de l'invention.

De préférence, ledit acide nucléique purifié ou isolé peut être choisi parmi les séquences suivantes: SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :7, SEQ ID NO :9, SEQ ID NO :11; SEQ ID NO :13, SEQ ID NO :15, SEQ ID NO :17, SEQ ID NO :19, SEQ ID NO :21, SEQ ID NO :23 et SEQ ID NO :25.

**TABLEAU 1**

15

<b>Clones</b>	<b>Acide nucléique</b>	<b>Polypeptide</b>
EG1 (sauvage)	SEQ ID NO :1	SEQ ID NO :2
76B4	SEQ ID NO :3	SEQ ID NO :4
105F11	SEQ ID NO :5	SEQ ID NO :6
107H12	SEQ ID NO :7	SEQ ID NO :8
154E4	SEQ ID NO :9	SEQ ID NO :10
202C12	SEQ ID NO :11	SEQ ID NO :12
272A9	SEQ ID NO :13	SEQ ID NO :14
278F10	SEQ ID NO :15	SEQ ID NO :16
293B2	SEQ ID NO :17	SEQ ID NO :18
309A11	SEQ ID NO :19	SEQ ID NO :20
11G8	SEQ ID NO :21	SEQ ID NO :22
92A12	SEQ ID NO :23	SEQ ID NO :24
240H12	SEQ ID NO :25	SEQ ID NO :26
Gène C	SEQ ID NO :27	SEQ ID NO :28
Gène A	SEQ ID NO :29	SEQ ID NO :30

L'invention porte également sur un vecteur comprenant un acide nucléique tel que décrit précédemment.

Selon l'invention, on entend par « vecteur » toute séquence d'ADN dans laquelle il est possible d'insérer des fragments d'acide nucléique étranger, les vecteurs permettant d'introduire de l'ADN étranger dans une cellule hôte. On peut citer de manière non-exhaustive comme vecteurs : les plasmides, les cosmides, les chromosomes artificiels de levures (YAC), les chromosomes artificiels de bactéries (BAC), les chromosomes artificiels dérivés du bactériophage P1 (PAC) ou les vecteurs dérivés de virus.

Selon l'invention, l'acide nucléique tel que décrit précédemment pourra être lié opérationnellement à un promoteur, un terminateur ou toute autre séquence nécessaire à son expression dans la cellule hôte.

Le vecteur selon l'invention pourra également porter un marqueur de sélection. On entend par « marqueur de sélection » un gène dont l'expression confère aux cellules qui le contiennent une caractéristique permettant de les sélectionner. Il s'agit par exemple d'un gène de résistance aux antibiotiques.

L'invention a également pour objet une cellule hôte isolée comprenant soit au moins l'un des polypeptides tels que décrit précédemment, soit au moins l'un des acides nucléiques tels que décrit précédemment ou soit au moins l'un des vecteurs tels que décrit précédemment.

L'homme du métier pourra introduire l'un des polypeptides, l'un des acides nucléiques ou l'un des vecteurs tels que décrit précédemment dans la cellule hôte par des méthodes conventionnelles bien connues. Par exemple, on peut citer le traitement au chlorure de

calcium, l'électroporation, l'utilisation d'un pistolet à particules.

Selon un mode de réalisation, l'homme du métier pourra  
5 introduire dans la cellule hôte et par des méthodes conventionnelles, plusieurs copies d'un acide nucléique codant un polypeptide ayant une activité endoglucanase améliorée selon l'invention.

10 Selon un mode de réalisation, la cellule hôte isolée telle que décrite précédemment est choisie parmi *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Humicola*, *Myceliophthora*, *Chrysosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Thermomonospora*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*,  
15 *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Yarrowia*, *Pichia* et *Saccharomyces*.

Selon un mode de réalisation préféré, la cellule hôte isolée telle que décrite précédemment est choisie parmi  
20 *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Myceliophthora thermopila*, *Chrysosporium lucknowense*, *Neurospora crassa*, *Humicola grisea*,  
25 *Penicillium pinophilum*, *Penicillium oxalicum*, *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium saccharolyticum*, *Clostridium benjerinckii*, *Clostridium butylicum*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolityca* et *Saccharomyces cerevisiae*.

30

Selon un mode de réalisation préféré, la cellule hôte isolée telle que décrite précédemment est choisie parmi *Trichoderma reesei* et *Saccharomyces cerevisiae*.

L'invention a également pour objet l'utilisation de l'un quelconque des polypeptides décrits précédemment pour l'hydrolyse de la cellulose.

5 L'invention a également pour objet l'utilisation de l'un quelconque des polypeptides décrits précédemment pour la production de biocarburant.

10 Selon l'invention, le terme biocarburant peut être défini comme étant tout produit issu de la transformation de la biomasse et pouvant être utilisé à des fins énergétiques. D'une part et sans vouloir se limiter, on peut citer à titre d'exemple des biogaz, des produits pouvant être incorporés (éventuellement après  
15 transformation ultérieure) à un carburant ou être un carburant à part entière, tels que des alcools (l'éthanol, le butanol et/ou l'isopropanol selon le type d'organisme fermentaire utilisé), des solvants (acétone), des acides (butyrique), des lipides et leurs dérivés (acides gras à  
20 courtes ou longues chaînes, esters d'acides gras), ainsi que l'hydrogène.

De manière préférée, le biocarburant selon l'invention est un alcool, par exemple l'éthanol, le  
25 butanol et/ou l'isopropanol. Plus préférentiellement, le biocarburant selon l'invention est l'éthanol.

Dans un autre mode de réalisation, le biocarburant est du biogaz.

30

Dans un autre mode de réalisation, le produit est une molécule intéressant l'industrie chimique, comme par exemple, un autre alcool tel que le 1,2-propane diol, le 1,3-propane diol, le 1,4-butane diol, le 2,3-butane diol,

des acides organiques comme l'acide acétique, propionique, acrylique, butyrique, succinique, malique, fumarique, citrique, itaconique, ou des hydroxyacides comme l'acide glycolique, hydroxypropionique, ou lactique.

5

On décrit ci-dessous un mode de réalisation de production d'un cocktail enzymatique utile pour l'hydrolyse de la lignocellulose.

Les souches de champignons filamenteux, de préférence 10 *Trichoderma*, plus préférentiellement *T. reesei*, capables d'exprimer au moins un polypeptide selon l'invention sont cultivées en fermenteurs, en présence d'un substrat carboné, tel que le lactose ou le glucose, choisi pour la croissance du microorganisme. Dans un mode de réalisation, 15 ce substrat carboné, selon sa nature, est introduit dans le fermenteur avant stérilisation ou est stérilisé séparément et introduit dans le fermenteur après stérilisation de ce dernier pour obtenir une concentration initiale de 20 à 35 g/L.

20 Une solution aqueuse contenant le substrat choisi pour la production des enzymes est ensuite ajoutée. Une composition enzymatique agissant sur la biomasse lignocellulosique produite par les champignons est enfin récupérée par filtration du milieu de culture. Dans cette 25 composition, on retrouve notamment, la  $\beta$ -glucosidase, l'exoglucanase et l'endoglucanase selon l'invention.

Dans un mode de réalisation, la solution aqueuse contenant le substrat choisi pour la production des enzymes est préparée à la concentration de 200-250 g/L. Cette 30 solution contient en outre de préférence un substrat inducteur tel que le lactose. Cette solution aqueuse est injectée après l'épuisement du substrat carboné initial de façon à apporter une quantité optimisée, comprise entre 35 et 45 mg/g de cellules ("fed batch"). Pendant cette phase

de "fed batch", la concentration résiduelle en sucre dans le milieu de culture est inférieure à 1 g/L et les enzymes agissant sur la biomasse lignocellulosique sont sécrétées par le champignon. Ces dernières peuvent être récupérées  
5 par filtration du milieu de culture.

L'invention a pour objet une composition enzymatique apte à agir sur la biomasse lignocellulosique, ladite composition enzymatique étant produite par des  
10 champignons filamenteux et comprenant au moins un polypeptide ayant une activité endoglucanase améliorée par rapport à l'activité endoglucanase de la protéine de référence EG1. Par « champignons filamenteux », on entend notamment *Trichoderma*, plus préférentiellement *T. reesei*.

15

Enfin, l'invention a pour objet un procédé de production de biocarburant à partir de la biomasse comprenant les étapes successives suivantes :

- mise en suspension en phase aqueuse de la  
20 biomasse à hydrolyser;

- hydrolyse en présence d'une composition enzymatique de la biomasse lignocellulosique telle que décrite précédemment de manière à produire un hydrolysât contenant du glucose;

25 - fermentation du glucose de l'hydrolysât de manière à produire un moût de fermentation;

- séparation du biocarburant du moût de fermentation.

30 Dans un mode de réalisation, la biomasse à hydrolyser est mise en suspension en phase aqueuse à raison de 6 à 40% de matière sèche, de préférence 20 à 30%. Le pH est ajusté entre 4 et 5,5; de préférence entre 4,8 et 5,2 et la température entre 40 et 60°C, de préférence entre 45

et 50°C. La réaction d'hydrolyse est démarrée par l'ajout de la composition enzymatique agissant sur la biomasse lignocellulosique; la quantité habituellement utilisée est de 10 à 30 mg de protéines excrétées par gramme de substrat prétraité ou moins. La réaction dure généralement de 15 à 48 heures. La réaction est suivie par dosage des sucres libérés, notamment le glucose. La solution de sucres est séparée de la fraction solide non hydrolysée, essentiellement constituée de lignine, par filtration ou centrifugation et ensuite traitée dans une unité de fermentation.

Après l'étape de fermentation, le biocarburant est séparé du moût de fermentation par exemple par distillation.

15

Un autre objet de l'invention est un procédé de production de biocarburant à partir de la biomasse, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :

20 - mise en suspension en phase aqueuse de la biomasse à hydrolyser;

- ajout simultané d'une composition enzymatique telle que définie précédemment et d'un organisme fermentaire de manière à produire un moût de fermentation;

25 - séparation du biocarburant du moût de fermentation.

De préférence, la composition enzymatique et l'organisme fermentaire sont ajoutés simultanément puis incubés à une température comprise entre 30°C et 35°C pour produire un moût de fermentation.

30

Selon ce mode de réalisation, la cellulose présente dans la biomasse est convertie en glucose, et en même temps, dans le même réacteur, l'organisme fermentaire (par

exemple une levure) convertit le glucose en produit final selon un procédé de SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) connu de l'homme du métier. Selon les capacités métaboliques et hydrolytiques de l'organisme fermentaire, le bon déroulement de l'opération peut nécessiter l'addition d'une quantité plus ou moins importante de mélange cellulolytique exogène.

Dans un autre mode de réalisation, l'organisme fermentaire produit le polypeptide objet de l'invention par sécrétion ou en surface de sa cellule, éventuellement conjointement à d'autres enzymes agissant sur la biomasse lignocellulosique, limitant ou supprimant ainsi le besoin en enzymes produites par le champignon filamenteux. De préférence, l'organisme fermentaire est une cellule hôte telle que décrite précédemment.

Ainsi, de préférence, l'invention a pour objet un procédé de production de biocarburant à partir de la biomasse, comprenant les étapes successives suivantes :

- mise en suspension en phase aqueuse de la biomasse à hydrolyser ;
- ajout d'une ou plusieurs cellules hôtes telles que décrites précédemment, avec un organisme fermentaire et/ou une composition enzymatique telle que décrite précédemment, de manière à produire un moût de fermentation ;
- séparation du biocarburant du moût de fermentation.

De préférence, les cellules hôtes avec la composition enzymatique et/ou l'organisme fermentaire, sont ajoutées puis incubés à une température comprise entre 30°C et 35°C pour produire un moût de fermentation.

L'utilisation du polypeptide présentant une meilleure activité endoglucanase selon la présente invention présente ainsi l'avantage d'obtenir un meilleur rendement de production de glucose tout en employant moins  
5 d'enzyme qu'auparavant, ce qui présente également un avantage économique.

D'autres aspects, objets, avantages et caractéristiques de l'invention, seront présentés à la  
10 lecture de la description non restrictive qui suit et qui décrit des modes de réalisation préférés de l'invention donnés par le biais d'exemples et des FIGURES.

La FIGURE 1 est un graphique représentant l'hydrolyse  
15 de la CMC 1% par l'endoglucanase de référence (EG1) et son mutant (154E4) sécrétés dans le milieu de culture par les souches Sc $\alpha$ -EG1 et Sc $\alpha$ -154E4 respectivement.

La FIGURE 2 est un graphique présentant les résultats  
de SHF pour le cocktail issu de la souche 154E4/8 (SEQ ID  
20 NO :10), un cocktail de référence produit par la souche CL847  $\Delta$ EG1 ( $\Delta$ EG1) supplémenté en  $\beta$ -glucosidase et un autre cocktail de référence produit par la souche CL847  $\Delta$ EG1 retransformée avec le gène de référence EG1 ( $\Delta$ EG1cEG1) supplémenté en  $\beta$ -glucosidase.

La FIGURE 3 est un graphique présentant les résultats  
de SHF pour le cocktail issu de la souche 11G8/10 (SEQ IQ  
25 NO :22), un cocktail de référence produit par la souche CL847  $\Delta$ EG1 ( $\Delta$ EG1) supplémenté en  $\beta$ -glucosidase et un autre cocktail de référence produit par la souche CL847  $\Delta$ EG1  
30 retransformée avec le gène de référence EG1 ( $\Delta$ EG1cEG1) supplémenté en  $\beta$ -glucosidase.

La FIGURE 4 est un graphique présentant les résultats de SSF pour les deux cocktails issus des souches 154E4/2

154 E4/8 (SEQ ID NO :10), un cocktail de référence produit par la souche CL847  $\Delta$ EG1 ( $\Delta$ EG1) supplémenté en  $\beta$ -glucosidase et un autre cocktail de référence produit par la souche CL847  $\Delta$ EG1 retransformée avec le gène de référence EG1 ( $\Delta$ EG1cEG1) supplémenté en  $\beta$ -glucosidase.

La FIGURE 5 est un graphique présentant les résultats de SSF pour les trois cocktails issus des souches 11G8/10, 11G8/12 et 11G8/13 (SEQ ID NO :22), un cocktail de référence produit par la souche CL847  $\Delta$ EG1 ( $\Delta$ EG1) supplémenté en  $\beta$ -glucosidase et un autre cocktail de référence produit par la souche CL847  $\Delta$ EG1 retransformée avec le gène de référence EG1 ( $\Delta$ EG1cEG1) supplémenté en  $\beta$ -glucosidase.

## 15 EXEMPLES

### EXEMPLE 1 : 1er tour de L-shuffling

La séquence du gène de référence EG1 de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO :1) a été soumise à un premier tour de L-shuffling selon le procédé décrit dans EP1104457B1 avec les gènes de l'endoglucanase putative de *Chaetomium globosum* (SEQ ID NO :29) et de l'endoglucanase d'*Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO :27) présentant chacune environ 60% d'identité avec le gène de référence SEQ ID NO :1.

### 1-Criblage à haut débit

Un test de criblage à haut débit a été mis au point afin de sélectionner les meilleurs clones issus du L-shuffling, c'est-à-dire ceux présentant au moins 20% d'amélioration de l'activité endoglucanase par rapport à l'enzyme de référence SEQ ID NO :2.

Le test de criblage à haut débit a été réalisé selon les étapes suivantes :

- 5 - isolement sur gélose des clones de *E. coli* exprimant les variants de L-shuffling de l'enzyme recombinante selon l'invention et mise en pré-cultures en milieu LB desdites colonies pendant la nuit à 37°C ;
- 10 - inoculation d'un milieu LB à 6% avec la pré-culture puis incubation 5 heures à 37°C puis 17 heures à 20°C ;
- centrifugation 10 minutes à 3000 rpm ;
- lyse des cellules par ajout de 80 µL d'une solution de lysozyme à 1 mg/mL dans du tampon citrate phosphate 0,1 M à pH 5 ;
- 15 - incubation pendant 4 heures à température ambiante ;
- ajout de 80 µL de tampon citrate phosphate 0,1 M pH 5 contenant 1% de carboxy-méthyl cellulose ;
- 20 - incubation 17 heures à 35°C ;
- centrifugation pendant 10 minutes à 3000 rpm ;
- prélèvement de 100 µL de surnageant ;
- ajout de 100 µL de réactif DNS ;
- incubation 10 minutes à 100°C puis 5 minutes sur la
- 25 glace ;
- lecture de la DO à 540 nm sur 120 µL.

Dans ces conditions de criblage haut débit, une amélioration de l'activité endoglucanase (augmentation de la DO à 540 nm) par rapport à l'enzyme de référence EG1 (SEQ ID NO :2) a été trouvée dans plusieurs clones, dont notamment les clones 76B4, 105F11, 107H12, 154E4, 202C12, 272A9, 278F10, 293B2 et 309A11.

**2-Détermination de l'amélioration de l'activité endoglucanase**

**2-1/ Sur le substrat carboxy-méthyl cellulose (CMC)**

5

Afin de d'estimer le kcat des variants sélectionnés au premier tour de L-shuffling par rapport à l'enzyme de référence (SEQ ID NO :2), on procède de la façon suivante :

- 10 - préparation d'une culture stock d'*E. coli* exprimant une enzyme recombinante selon l'invention pendant toute la nuit à 37°C ;
- ensemencement d'un milieu de culture LB avec 1% de culture stock à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm de 0.4 ;
- 15 - culture desdites cellules à 20°C pendant 18 heures ;
- centrifugation pendant cinq minutes à 7900 rpm ;
- resuspension des culots cellulaires avec du tampon citrate phosphate 0.1M à pH 5 contenant 1 mg/mL de lysozyme (DO<sub>600</sub> finale 100);
- 20 - incubation des cellules resuspendues 30 minutes sur la glace ;
- lyse des cellules par 3 cycles de congélation/décongélation ;
- 25 - fractionnement de l'ADN par sonication pendant 3 secondes à puissance 5 ;
- centrifugation 30 minutes à 13000 rpm ;
- incubation de 100 µL de surnageant de cassage avec 100 µL de tampon citrate phosphate 0.1 M à pH 5
- 30 contenant 1% de CMC pendant 6 heures à 35 et 50°C ;
- prélèvement de 100 µL de réaction ;
- ajout de 100 µL de réactif DNS ;
- incubation 5 minutes à 100°C ;

- incubation 3 minutes sur la glace ;
- centrifugation 10 minutes à 3000 rpm ;
- lecture de la densité optique à 540 nm sur 150 µL.

5 Selon l'invention, le calcul des kcat est fait de la façon suivante :

- expression des DO à 540 nm en fonction de la quantité de protéine d'intérêt (en nM) ;
- soustraction de la valeur du témoin négatif ;
- 10 - division par le coefficient de la gamme étalon de glucose (différentes quantités de glucose sont révélées avec le DNS) ;
- division par le temps de réaction (360 minutes).

Le TABLEAU 2 présente la valeur des kcat ainsi que le  
15 facteur d'amélioration obtenus pour les clones 76B4, 105F11, 107H12, 154E4, 202C12, 236C11, 272A9, 278F10, 293B2 et 309A11 par rapport à la protéine de référence EG1 (SEQ ID NO :2) dans les conditions expérimentales du test d'activité sur CMC.

20

**TABLEAU 2 : Activité endoglucanase sur CMC**

	Clone	35°C		50°C	
		Kcat (min <sup>-1</sup> )	Facteur amélioration	Kcat (min <sup>-1</sup> )	Facteur amélioration
Clones du premier tour	<b>76B4</b>	0,25	1	0,35	1,1
	<b>105F11</b>	1,13	4,7	1,24	4
	<b>107H12</b>	1,06	4,4	1,14	3,7
	<b>154E4</b>	1,27	5,3	3,39	10,9
	<b>202C12</b>	0,73	3	0,61	2
	<b>236C11</b>	0,12	5,3	0,05	0,2
	<b>272A9</b>	0,99	4,1	2,33	7,5
	<b>278F10</b>	0,95	4	1,06	3,4
	<b>293B2</b>	1,04	4,3	1,78	5,7
	<b>309A11</b>	1,07	4,5	0,6	1,9
<b>Protéine de référence</b>	<b>EG1</b>	0,24	1	0,31	1

Les résultats montrent, pour ces clones, une amélioration d'activité enzymatique par rapport à l'enzyme de référence SEQ ID NO :2.

5           **2-2/ Sur le substrat phosphoric acid swollen cellulose (PASC)**

L'amélioration d'activité des clones 76B4, 105F11, 107H12, 154E4, 202C12, 236C11, 272A9, 278F10, 293B2 et 10 309A11 a ensuite été confirmée sur un second substrat : phosphoric acid swollen cellulose (PASC).

La détermination du kcat sur ce substrat est effectuée selon le même protocole que décrit précédemment. Le 15 substrat CMC est remplacé par le substrat PASC à la même concentration.

Le TABLEAU 3 présente la valeur des kcat ainsi que le facteur d'amélioration obtenus pour les clones 76B4, 105F11, 20 107H12, 154E4, 202C12, 236C11, 272A9, 278F10, 293B2 et 309A11 par rapport à la protéine de référence EG1 (SEQ ID NO :2) dans les conditions expérimentales du test d'activité sur PASC.

25           **TABLEAU 3 : Activité endoglucanase sur PASC**

	Clone	35°C		50°C	
		Kcat (min <sup>-1</sup> )	Facteur amélioration	Kcat (min <sup>-1</sup> )	Facteur amélioration
Clones du premier tour	76B4	0,0116	1,66	0,0127	1,81
	105F11	0,0099	1,41	0,0109	1,56
	107H12	0,0069	0,99	0,0068	0,97
	154E4	0,0101	1,44	0,0104	1,49
	202C12	0,0098	1,4	0,0097	1,39
	236C11	0,0102	1,46	0,0103	1,47
	272A9	0,0103	1,47	0,0099	1,41
	278F10	0,0094	1,34	0,0091	1,3
	293B2	0,0089	1,27	0,0088	1,26
	309A11	0,0102	1,46	0,0089	1,27
<b>Protéine de référence</b>	<b>EG1</b>	0,007	1	0,007	1

Ces résultats montrent une amélioration de l'activité enzymatique par rapport à l'enzyme de référence EG1 (SEQ ID NO :2).

### **EXEMPLE 2 : 2ème tour de L-shuffling**

Les gènes améliorés 105F11, 154E4, 202C12, 272A9, 278F10 et 309A10 (respectivement SEQ ID NO :5, 9, 11, 13, 15, 19) obtenus au premier tour d'évolution ont par la suite été soumis à un deuxième tour de L-shuffling (toujours selon le procédé breveté décrit dans EP1104457B1). Afin de favoriser la reconstruction sur un squelette de la séquence de *Trichoderma*, le gène de référence EG1 (SEQ ID NO :1) a été réintroduit en tant que gène parent pour le deuxième tour de L-shuffling.

### **1-Criblage à haut débit**

Un test de criblage à haut débit tel que décrit précédemment a été effectué sur les clones obtenus à la suite de ce second tour de L-shuffling afin de sélectionner

les meilleurs. Le test d'activité a été réduit à 2 heures (contre 17 heures pour le criblage des clones issus du premier tour d'évolution) pour tenir compte des améliorations obtenues avec le premier tour de L-shuffling.

5

L'activité des clones générés est comparée à l'activité obtenue avec le clone 154E4. Ce clone, issu du premier tour de L-shuffling, est celui qui a permis d'obtenir la meilleure amélioration d'activité.

10

Dans ces conditions de criblage, une amélioration de l'activité endoglucanase par rapport au clone de référence 154E4 (SEQ ID NO :10) a été trouvée dans plusieurs clones, dont notamment les clones 11G8 et 240H12.

15

## 2-Détermination de l'amélioration de l'activité endoglucanase

### 2-1/ Sur le substrat carboxy-méthyl cellulose (CMC)

20

Afin de déterminer le kcat, les activités des clones 11G8, 92A12 et 240H12 ont été mesurées par le test d'activité tel que décrit précédemment. La durée du test d'activité a été réduite à une heure d'incubation avec le substrat pour tenir compte des améliorations de ces clones.

25

Le TABLEAU 4 présente les valeurs du kcat ainsi que le facteur d'amélioration obtenus pour les clones 11G8, 92A12 et 240H12 par rapport au clone 154E4 (SEQ ID NO :10) dans ces conditions expérimentales.

30

#### **TABLEAU 4 : Activité endoglucanase sur CMC**

	Clone	35°C		50°C	
		Kcat (min <sup>-1</sup> )	Facteur amélioration	Kcat (min <sup>-1</sup> )	Facteur amélioration
Clones du deuxième tour	11G8	804,7	1,8	944,2	1,9
	92A12	420	0,94	478,5	0,95
	240H12	488,6	1,1	590,8	1,2
Protéine de référence	154E4	446,4	1	501,3	1

Les résultats montrent une amélioration d'activité par rapport au clone de référence 154E4 pour les clones 11G8 et 240H12.

### 2-2/ Sur le substrat phosphoric acid swollen cellulose (PASC)

L'amélioration d'activité des clones 11G8, 92A12 et 240H12 a ensuite été confirmée sur un second substrat : phosphoric acid swollen cellulose (PASC).

Afin de déterminer le kcat, l'activité de ces clones a été mesurée à 35 et 50°C par le test d'activité tel que décrit précédemment avec PASC comme substrat.

Le TABLEAU 5 présente les valeurs du kcat ainsi que le facteur d'amélioration obtenu pour les clones 11G8, 92A12 et 240H12 par rapport au clone 154E4 (SEQ ID NO :10) dans ces conditions expérimentales.

**TABLEAU 5 : Activité endoglucanase sur PASC**

	Clone	35°C		50°C	
		Kcat (min <sup>-1</sup> )	Facteur amélioration	Kcat (min <sup>-1</sup> )	Facteur amélioration
Clones du deuxième tour	11G8	1,37	0,8	1,72	1,1
	92A12	1,36	0,81	1,7	1,04
	240H12	1,87	1,1	1,9	1,2
Protéine de référence	154E4	1,68	1	1,63	1

L'activité du clone 11G8 n'est pas améliorée à 35°C sur ce substrat par rapport au clone de référence 154E4. Par contre, l'activité du clone 11G8 est améliorée à 50°C. L'activité du clone 240H12 est améliorée à 35°C et à 50°C.

**EXEMPLE 3 : Clonage d'un variant endoglucanase 1 issu du premier tour de L-shuffling dans une souche *T. reesei* CL847**

**ΔEG1**

La construction du fragment d'ADN à insérer dans *T. reesei*, contenant le clone 154E4 issu du premier tour du L-shuffling, a été réalisée par fusion PCR. Le fragment d'une longueur d'environ 5,4 kb était constitué du gène de la résistance à la phléomycine, de la séquence codante du clone 154E4 sous contrôle du promoteur et suivie par le terminateur *cbh1*. De la même manière, le gène de référence EG1 (SEQ ID NO :1) de *T. reesei* a été amplifié et fusionné entre le promoteur et terminateur *cbh1*, résultant en une deuxième construction.

Des protoplastes d'une souche *T. reesei* CL847 ΔEG1 ont été transformés selon une méthode classique connue de l'homme de l'art, par choc calcique et PEG, avec 5 µg de chaque construction, à savoir le fragment d'ADN contenant soit le gène 154E4 soit EG1. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu sélectif PDA/saccharose contenant 30 µg/L de phléomycine. Quatorze clones de chaque

transformation ont été repiqués. Après trois repiquages pour isoler des clones purs, sept clones ayant intégré le gène natif et cinq clones ayant intégré le variant 154E4 et sécrétant un niveau de protéines comparable à la souche CL847, ont finalement été obtenus.

**1-Criblage à l'aide d'un test d'activité sur carboxyméthylcellulose (CMC)**

10 Les 11 clones ont été mis en culture dans des plaques 24 puits contenant le milieu suivant :

800  $\mu$ L H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%, 4,2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,3 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,5 g CornSteep, 1 mL Oligo Ferment, 11,6 g acide maléique, 10 g SolkaFloc et 20 g lactose par litre de milieu. Le pH est

15 ajusté à 5,8-6,0. Après 5 jours de culture à 30°C, le surnageant est prélevé et l'équivalent de 10 mg/L de protéines (mesurées par la méthode de Lowry) est utilisé pour un test d'activité sur CMC. 150  $\mu$ L d'une solution CMC 2% dans du tampon citrate 50 mM pH 4,8 sont mélangés avec

20 150  $\mu$ L de tampon citrate contenant 10 mg/L de protéines. La réaction est incubée à 50°C ou 35°C pendant 10 minutes, puis inactivée au bain-marie bouillant. Après centrifugation pendant 5 minutes, 20  $\mu$ L de surnageant sont prélevés pour réaliser un dosage de sucres réducteurs à

25 l'aide de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS). La réduction du DNS et la formation de l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique sont suivis par lecture de l'absorption à 540 nm, et les sucres réducteurs quantifiés à l'aide d'une gamme de glucose.

30

Le TABLEAU 6 résume les activités obtenues avec les clones contenant le variant 154E4, en comparaison avec la souche de référence CL847, la souche CL847  $\Delta$ EG1, et la souche CL847  $\Delta$ EG1 retransformée avec le gène de référence

EG1 ( $\Delta$ EG1cEG1, moyenne obtenue avec les quatre meilleurs transformants).

**TABLEAU 6 : Activité endoglucanase sur CMC**

5

Clone	Activité spécifique 50°C ( $\mu$ mol/mg/min)	Rapport 154E4/ $\Delta$ EG1cEG1 (50°C)	Activité spécifique 35°C ( $\mu$ mol/mg/min)	Rapport 154E4/ $\Delta$ EG1cEG1 (35°C)
<b>CL847</b>	12,9 $\pm$ 3,1		9,7 $\pm$ 0,4	
<b><math>\Delta</math>EG1</b>	6,4 $\pm$ 0,4		-	
<b><math>\Delta</math>EG1cEG1</b>	16,8 $\pm$ 2,5		12,1 $\pm$ 1,0	
<b>154E4/2</b>	22,5 $\pm$ 2,9	1,3	12,7 $\pm$ 2,0	1,1
<b>154E4/8</b>	24,1 $\pm$ 1,9	1,4	12,5 $\pm$ 2,0	1,0
<b>154E4/9</b>	20,2 $\pm$ 3,9	1,2	7,4 $\pm$ 2,2	0,6

Les résultats montrent que les activités des variants 154E4 sont entre 1,2 et 1,4 fois supérieures à celles des clones retransformés avec le gène de référence EG1 (SEQ ID NO :1). L'amélioration est visible à 35°C et à 50°C.

10

**2-Clonage du variant 11G8 obtenu après le 2ème tour de L-shuffling dans une souche *T. reesei* CL847  $\Delta$ EG1 et criblage des transformants :**

15

Le variant 11G8 a été cloné entre le promoteur et le terminateur *cbh1* dans le plasmide pUT1040 contenant un gène de résistance à la phléomycine comme marqueur, à l'aide d'une double digestion BamH1/XhoI. 5  $\mu$ g de ce vecteur ont été utilisés pour la transformation de la souche *T. reesei* CL847  $\Delta$ EG1. La transformation des protoplastes a été réalisée dans les mêmes conditions que pour le variant 154E4. A l'issue du processus de transformation et de trois repiquages successifs réalisés dans le but d'obtenir des

20

clones purs, treize clones avec une production de protéines semblable à la souche CL847 ont été obtenus et ont été soumis au screening par mesure d'activité CMC<sub>Case</sub>. Le test d'activité est identique au criblage des clones contenant le variant 154E4 du premier tour de L-shuffling. Six clones exprimant le variant 11G8 montrent une activité CMC<sub>Case</sub> plus importante que celle de la souche  $\Delta$ EG1cEG. Les deux meilleurs transformants ont une activité augmentée de 70% par rapport à la souche exprimant le gène de référence EG1 (SEQ ID NO :1).

Le TABLEAU 7 résume les activités obtenues avec les clones contenant le variant 11G8, en comparaison avec la souche de référence CL847, la souche CL847  $\Delta$ EG1, et la souche CL847  $\Delta$ EG1 retransformée avec le gène de référence EG1 ( $\Delta$ EG1cEG1, moyenne obtenue avec les quatre meilleurs transformants).

**TABLEAU 7 : Activité endoglucanase sur CMC**

20

Clone	Activité spécifique 50°C ( $\mu$ mol/mg/min)	Rapport 11G8/ $\Delta$ EG1 cEG1 (50°C)	Activité spécifique 35°C ( $\mu$ mol/mg/min)	Rapport 11G8/ $\Delta$ EG1cEG1 (35°C)
CL847	20,8 $\pm$ 0,8		11,8 $\pm$ 0,5	
$\Delta$ EG1	-		3,3 $\pm$ 1,1	
$\Delta$ EG1cEG1	13,2 $\pm$ 2,2		9,1 $\pm$ 0,7	
11G8/6	15,6 $\pm$ 1,8	1,2	10,0 $\pm$ 0,4	1,1
11G8/7	17,3 $\pm$ 0,7	1,3	10,8 $\pm$ 0,9	1,2
11G8/9	17,9 $\pm$ 0,4	1,4	11,9 $\pm$ 0,2	1,3
11G8/10	15,0 $\pm$ 0,3	1,1	13,9 $\pm$ 1,6	1,5
11G8/12	17,0 $\pm$ 0,1	1,3	15,7 $\pm$ 0,8	1,7
11G8/13	17,3 $\pm$ 1,2	1,3	15,6 $\pm$ 0,4	1,7

Les résultats montrent que les activités des variants 11G8 sont entre 1,1 et 1,7 fois supérieures à celles des clones retransformés avec le gène de référence SEQ ID NO :1. L'amélioration est visible à 35°C et à 50°C.

5

**Exemple 4 : Expression recombinante de l'endoglucanase de référence EG1 et du variant amélioré 154E4 chez *Saccharomyces cerevisiae***

10 **1- Production des protéines EG1 de référence et 154E4 dans le milieu extracellulaire**

Les gènes de l'endoglucanase de *Trichoderma reesei* (EG1) et du variant 154E4 ont été clonés sans leur peptide signal dans le vecteur pESC-Leu $\alpha$ Myc (CNRS-CERMAV). Cette construction permet l'expression des protéines dans le milieu de culture de la souche *Saccharomyces cerevisiae* EBY100, auxotrophe pour la leucine et le tryptophane (Boder ET et Wittrup KD, Biotechnol Prog, 1998, 14:55-62). Ce plasmide permet de placer l'expression des gènes sous le contrôle du promoteur GAL1 inductible au galactose, et possède le gène marqueur de sélection de l'auxotrophie (Leu2) qui permet la sélection des transformants.

25 La transformation de *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 a été réalisée selon les méthodes classiques connues de l'homme de l'art (transformation de levures par choc thermique et acétate de lithium). Les transformants ont été sélectionnés sur milieu YNB 0,67%-Glc 2%-Trp 0,01%.

30

Un transformant pour chaque gène (Sc $\alpha$ -EG1 et Sc $\alpha$ -154E4) a été utilisé pour ensemercer 15 mL d'un milieu minimum YNB 0,67%-Glc 2%-SD-Trp 0,01%. SD est un mélange d'acides aminés (40 mg/L d'adénine sulfate; 20 mg/L de L-arginine;

100 mg/L de L-acide aspartique; 100 mg/L de L-acide glutamique; 20 mg/L de L-histidine; 30 mg/L de L-lysine; 20 mg/L de L-méthionine; 50 mg/L de L-phénylalanine; 375 mg/L de L-sérine; 200 mg/L de L-thréonine; 30 mg/L de L-tyrosine; 150 mg/L de L-valine et 20 mg/L d'uracile). Après 24 heures de préculture à 30°C sous agitation à 220 rpm, les 2 souches Sc $\alpha$ -EG1 et Sc $\alpha$ -154E4 ont été utilisées pour ensemercer (DO<sub>600</sub> de 0,5) 150 mL de milieu YNB 0,67%-Gal 2%-SD-Trp 0,01%. Les cultures ont été incubées à 25°C sous agitation à 220 rpm. Après 8 heures d'incubation, 6 mL de citrate de sodium à pH 5,6 ont été ajoutés à chaque culture afin de stabiliser le pH à 5.

Après 4 jours d'incubation, 20 mL de culture ont été prélevés. Le surnageant de culture a été obtenu après centrifugation à 3000 g, à 4°C pendant 5 minutes.

## **2-Détermination de l'activité endoglucanase sur p-nitrophényl- $\beta$ -lactoside**

20

L'activité endoglucanase des surnageants de culture a été mesurée par hydrolyse du substrat p-nitrophenyl- $\beta$ -lactoside (pNPL) dans un volume de 700  $\mu$ L dans les conditions suivantes :

25

- 50 mM de tampon citrate à pH 5 ;
- 2 mM de pNPL ;
- 605  $\mu$ L et 90  $\mu$ L de surnageant de culture des souches Sc $\alpha$ -154E4 ;
- Incubation à 35°C ou 50°C pendant 30 min pour la souche Sc $\alpha$ -EG1.

30

La réaction a été arrêtée en ajoutant 100  $\mu$ L de carbonate de sodium 1M à 100  $\mu$ L du milieu réactionnel. La concentration en para-nitrophénol (pNP) libéré par

hydrolyse du pNPL a été déterminée par mesure de l'absorbance à 415 nm par comparaison avec une gamme étalon de para-nitrophénol (linéaire de 0,36  $\mu\text{M}$  à 360  $\mu\text{M}$ ).

5 Le TABLEAU 8 présente les résultats d'activité endoglucanase (AE en  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$  de culture) sur pNPL à 35°C et 50°C des milieux de culture des souches Sc $\alpha$ EG1 et Sc $\alpha$ 154E4.

10

15

**TABLEAU 8 : Activité endoglucanase sur pNPL à 35°C et 50°C des milieux de culture des souches Sc $\alpha$ EG1 et Sc $\alpha$ 154E4.**

	AE à 35°C	AE à 50°C	Ratio d'activité 35°C/50°C	Amélioration de l'AE à 35°C
<b>Sc<math>\alpha</math>-EG1</b>	1,17	1,18	1	-
<b>Sc<math>\alpha</math>- 154E4</b>	45,0	61,1	1,4	38,5

20

Les résultats obtenus montrent une amélioration à 35°C de l'activité enzymatique de la souche Sc $\alpha$ -154E4 d'un facteur proche de 40 par rapport à la souche exprimant la protéine de référence EG1 de *T. reesei* (SEQ ID NO :2).

25 L'ampleur de l'amélioration d'activité constatée par rapport à *E. coli* et *T. reesei* suggère que l'enzyme a non seulement une activité spécifique améliorée mais qu'elle est également surexprimée et/ou mieux sécrétée.

### 3- Détermination de l'activité endoglucanase sur carboxyméthylcellulose

- 5 L'activité endoglucanase des surnageants de culture a été mesurée par hydrolyse de la carboxyméthylcellulose (CMC) dans un volume de 700  $\mu$ L dans les conditions suivantes:
- 50 mM de tampon citrate à pH 5 ;
  - 10 - 1% de CMC ;
  - 210  $\mu$ L de surnageant de culture des souches Sc $\alpha$ -EG1 et Sc $\alpha$ -154E4 respectivement dialysés contre du tampon citrate 50 mM pH 5 sur membrane de 10 kDa et concentrés 2 fois ;
  - 15 - Incubation à 35°C pendant 48 heures.

La réaction a été arrêtée en ajoutant 150  $\mu$ L de réactif au DNS à 100  $\mu$ L du milieu réactionnel. Après chauffage pendant 5 minutes à 100°C et refroidissement dans la glace,

20 la quantité de sucres réducteurs libérés a été déterminée par mesure de l'absorbance à 550 nm par comparaison avec une gamme étalon réalisée avec du glucose.

La FIGURE 1 présente les résultats d'hydrolyse de la

25 CMC 1% par l'endoglucanase de référence EG1 (SEQ ID NO :2) et son mutant 154E4 (SEQ ID NO :10) respectivement sécrétées dans le milieu de culture des souches Sc $\alpha$ -EG1 et Sc $\alpha$ -154E4 .

30 Les résultats de la FIGURE 1 montrent que pendant les premières heures de réaction, la quantité de sucres réducteurs libérés par 1 mL de culture de la souche Sc $\alpha$ -154E4 est environ 10 fois plus importante qu'avec 1 mL de Sc $\alpha$ -EG1. L'ampleur de l'amélioration d'activité constatée

par rapport à *E. coli* et *T. reesei* suggère que l'enzyme a non seulement une activité spécifique améliorée mais qu'elle est également surexprimée et/ou mieux sécrétée.

5

**Exemple 5 : Production d'enzymes par *T. reesei* en fioles alimentées**

Les souches de référence et celles présentant la  
10 meilleure activité sur CMC (CL847,  $\Delta$ EG1,  $\Delta$ EG1cEG1, 154E4/2, 154E4/8, 11G8/10, 11G8/12, 11G8/13) ont été cultivées en fioles Erlenmeyer de 250 mL. 55 mL de milieu F45 (10 g/L de tampon dipotassium phthalate pH 6, 4.2g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 300 mg/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 150 mg/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g/L cornsteep, 0,07%  
15 acide orthophosphorique, 5 mg/L  $\text{FeSO}_4$ , 1,4 mg/L  $\text{MnSO}_4$ , 1,4 mg/L  $\text{ZnSO}_4$ , 3,7 mg/L  $\text{CoCl}_2$  et 12,5 g/L glucose) sont ensemencés et agités à 150 rpm et 30°C. La production d'enzymes se fait en deux phases : une phase batch sur glucose et une phase fed-batch sur lactose. Des  
20 prélèvements réguliers permettent de déterminer le moment où la concentration de glucose passe en dessous de 3 g/L. A ce stade, une alimentation fed-batch à l'aide d'un pousse-seringues (6 voies) est lancée. Les cultures sont alimentées par une solution de 50 g/L lactose et 0,3%  $\text{NH}_3$  à  
25 un débit de 40 mg de sucre / g de biomasse par heure. Des prélèvements journaliers sont réalisés pour déterminer le pH, le poids sec et la concentration de protéines dans le surnageant. Après 5 jours de culture en fed-batch, la culture est filtrée sur un filtre de 0,45  $\mu\text{m}$  et le  
30 surnageant congelé.

La concentration finale de protéines a été de l'ordre de 3 à 4 g/L. Si la concentration était inférieure à 3 g/L, les surnageants ont été concentrés sur colonne (Vivaspin MWC05, Sartorius).

**Exemple 6 : Efficacité des enzymes issus du L-shuffling en hydrolyse de biomasse lignocellulosique selon un procédé**

5 **SHF**

Le substrat de référence utilisé est une paille de blé ayant subi un prétraitement par explosion à la vapeur (19 bars - 3 minutes) après imprégnation acide à 0.01% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pendant 10 heures, lavée, neutralisée à pH 5, pressée, séchée. Le tableau 9 présente la composition du substrat de référence.

Composition	% m / m
WIS	97,52
Teneur en cendres	5
Cellulose	51,7
Xylanes corrigés	3,57
Hémicellulose	4,14
Lignine de Klason (surestimée)	36,49
Acétyl	0,6

15 **Tableau 9 : Composition de la paille utilisée pour les essais d'hydrolyse**

Les hydrolyses ont été réalisées à 10% de matière sèche m/m soit un équivalent de 5,4% de cellulose m/m. Le taux de protéines est fixé à 10 mg/g de matière sèche soit environ 19 mg/g de cellulose. La concentration des cocktails enzymatiques a été mesurée par la méthode de Lowry en utilisant la BSA comme référence. Chaque cocktail a été supplémenté en activité  $\beta$ -glucosidase à hauteur de 120  $\pm$  2 UI/g de cellulose, en ajoutant de la  $\beta$ -glucosidase SP188 (Novozymes).

Les essais sont effectués en tubes Eppendorf de 2mL utile (1g réactionnel) contenant :

- $0,11 \pm 0,001$  g de substrat paille lavée
  - $0,9 \pm 0,02$  mL de milieu réactionnel d'hydrolyse composé de tampon acétate 50 mM - pH 4,8 et chloramphénicol (0,05 g/L)
- 5 - entre  $0,1$  et  $0,2 \pm 0,02$  g de cocktail enzymatique en fonction de leur taux de protéines.

Les hydrolyses enzymatiques sont réalisées à  $45 \pm 2$  °C sous agitation type vortex à 900 rotations par minute dans  
10 un *Thermomixer Comfort Eppendorf*.

Tous les essais sont effectués en duplicat avec des temps de prélèvement fixés à t 24, 48 et 96 heures avec pour certains des prélèvements à t 72 heures.

15 A chaque temps de prélèvement, les hydrolysats sont ébouillantés 5 minutes dans les tubes Eppendorf sacrifiés. Ces tubes sont ensuite refroidis et centrifugés. Le dosage du glucose est effectué par HPLC. Parallèlement les résidus solides de chaque tube Eppendorf sont lavés et centrifugés  
20 3 fois avant d'être séchés à 105°C pendant 24 heures de façon à évaluer les WIS (Water Insoluble Solids). Le calcul du rendement d'hydrolyse est effectué en tenant compte des WIS.

25 Les cocktails issus de l'exemple 5 ont été évalués. Deux tests témoins sont effectués avec les cocktails de référence supplémentés également en  $\beta$ -glucosidase pour comparaison : un cocktail produit par la souche CL847  $\Delta$ EG1 ( $\Delta$ EG1) et un cocktail produit par la souche CL847  $\Delta$ EG1  
30 retransformée avec le gène de référence EG1 ( $\Delta$ EG1cEG1).

La FIGURE 2 présente les résultats de SHF pour le cocktail issu de la souche 154/8 exprimant le variant 154E4 (SEQ ID NO :10).

Les résultats présentés en FIGURE 2 montrent que la  
5 vitesse initiale d'hydrolyse du cocktail produit par le variant 154E4 est supérieure à celles des cocktails de référence  $\Delta$ EG1 et  $\Delta$ EG1cEG1. Le rendement final d'hydrolyse est également supérieur à celui des cocktails de référence  $\Delta$ EG1 et  $\Delta$ EG1cEG1.

10

La FIGURE 3 présente les résultats de SHF pour le cocktail issu de la souche 11G8/10 exprimant le variant 11G8 (SEQ ID NO :22).

Les résultats présentés en FIGURE 3 montrent que la  
15 vitesse initiale d'hydrolyse du cocktail produit par le variant 11G8 est supérieure à celles des cocktails de référence  $\Delta$ EG1 et  $\Delta$ EG1cEG1. Le rendement final d'hydrolyse est également supérieur à celui des cocktails de référence  $\Delta$ EG1 et  $\Delta$ EG1cEG1.

20

#### **Exemple 7 : Efficacité des enzymes en hydrolyse de biomasse lignocellulosique selon un procédé SSF**

25 Le substrat utilisé est le même que celui décrit en tableau 9 (Exemple 6).

Les SSF sont réalisées en triplicat dans des réacteurs de laboratoire. Ils sont constitués des éléments suivants :

- 30
- un flacon en verre de 30 mL de volume utile ;
  - un bouchon de sécurité en polyétheréthercétone (Peek) ;

- 5 - une soupape unidirectionnelle DV-118 commercialisée par la société Vaplock fixée à travers le bouchon. La soupape est configurée pour s'ouvrir en sortie lorsque la pression relative dans le flacon est supérieure à 70 mbar ;
- 10 - un tube creux en polypropylène, emmanché à travers un second traversant le bouchon et équipé au niveau de l'extrémité inférieure dudit tube d'un septum ;
- un joint plat disposé entre le goulot du flacon et le bouchon.

Le principe de mise en œuvre des bioréacteurs est le  
15 suivant : le CO<sub>2</sub> produit lors de la fermentation éthanolique s'accumule dans le ciel situé au-dessus du milieu réactionnel entraînant par accumulation une augmentation de la pression dans le bioréacteur (P<sub>G</sub>). Lorsque P<sub>G</sub> devient supérieure à la pression d'ouverture de  
20 la soupape unidirectionnelle (P<sub>S</sub>), celle-ci s'ouvre pour laisser échapper une quantité de gaz qui est par exemple déterminée par pesée. Lorsque P<sub>G</sub> < P<sub>S</sub>, la soupape se referme jusqu'à ce que P<sub>G</sub> soit supérieur à P<sub>S</sub>. Ainsi le bioréacteur en fonctionnement est toujours sous pression de  
25 manière à assurer un milieu anaérobie stable pour la fermentation. La quantité d'éthanol produite est évaluée par la production de CO<sub>2</sub> estimée par perte de poids à partir de l'équation stœchiométrique de fermentation du glucose en éthanol suivante :

30



Le milieu de culture utilisé pour la SSF est un milieu aqueux qui comprend :

- un tampon acétate 50 mM pour pH 5 ;
- du chloramphénicol à 0,1 g/L ;
- du milieu nutritif à 3 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,4 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et 1 g/L d'extrait de levure.

Les SSF ont été réalisées à  $10 \pm 0,01\%$  m/m de matière sèche soit un équivalent de 5,4% cellulose m/m pour une masse réactionnelle totale de  $15 \pm 0,003$  g. Le taux de protéines est fixé à  $10 \pm 0,01$  mg de cellulases par gramme de matière sèche, soit environ 19 mg/g cellulose. La concentration des cocktails enzymatiques a été mesurée par la méthode de Lowry en utilisant la BSA (Bovine Serum Albumine) comme référence. Chaque cocktail a été  
10  
15  
supplémenté en activité  $\beta$ -glucosidase à hauteur de  $120 \pm 2$  UI/g cellulose, en ajoutant de la  $\beta$ -glucosidase SP188 (Novozymes).

La levure de fermentation des sucres (*Saccharomyces cerevisiae*, souche Ethanol Red, Fermentis, France) est  
20  
ajoutée dans le milieu pour obtenir une teneur de  $2 \pm 0,1$  g/kg.

Les enzymes et les levures sont ajoutées dans les bioréacteurs après une heure de conditionnement de la  
25  
paille de blé prétraitée à 35°C avec le tampon, le chloramphénicol et le milieu de culture.

La réaction de SSF est conduite à une température d'environ 35°C, en plaçant le bioréacteur de laboratoire  
30  
dans un incubateur de type INFORS Multitron HT Standard avec une vitesse de rotation orbitale de 150 tours par minute.

Au cours du temps, la perte de masse a été suivie par pesée des bioréacteurs. A la fin de la réaction, le moût de fermentation est chauffé à 100°C pendant 5 minutes, refroidi et centrifugé pour séparer les matières solides non hydrolysées du jus de fermentation. Ce dernier est  
5 ensuite analysé par chromatographie en phase gazeuse afin de déterminer sa concentration en éthanol.

Les cocktails issus de l'exemple 5 ont été évalués.  
10 Deux tests témoins sont effectués avec les cocktails de référence supplémentés également en  $\beta$ -glucosidase pour comparaison : un cocktail produit par la souche CL847  $\Delta$ EG1 ( $\Delta$ EG1) et un cocktail produit par la souche CL847  $\Delta$ EG1 retransformée avec le gène de référence EG1 ( $\Delta$ EG1cEG1).

15

La FIGURE 4 présente les résultats de SSF pour les 2 cocktails exprimant l'endoglucanase 154E4 (moyenne des résultats obtenus avec les 2 variants).

20 Les résultats présentés en FIGURE 4 montrent que l'avancement (production d'éthanol pour la même dose d'enzymes) de la SSF sur 100 heures pour les 2 cocktails exprimant l'endoglucanase 154E4 est supérieur à ceux des cocktails de référence  $\Delta$ EG1 et  $\Delta$ EG1cEG1.

25

La FIGURE 5 présente les résultats de SSF pour les 3 cocktails exprimant l'endoglucanase 11G8 (moyenne moyenne des résultats obtenus avec les 2 variants).

30 Les résultats présentés en FIGURE 5 montrent que l'avancement de la SSF sur 100 heures pour les 3 cocktails exprimant l'endoglucanase 11G8 (moyenne) est supérieur à ceux des cocktails de référence  $\Delta$ EG1 et  $\Delta$ EG1cEG1.

**REVENDICATIONS**

1. Polypeptide isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il a une activité endoglucanase améliorée par rapport à l'activité endoglucanase de la protéine de référence EG1, ledit polypeptide étant choisi dans le groupe consistant en :
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- i) une séquence d'acides aminés choisie parmi SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :12; SEQ ID NO :14 SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :24 et SEQ ID NO :26;
  - ii) une séquence d'acides aminés présentant, par rapport à la séquence SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :12; SEQ ID NO :14 SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :24 ou SEQ ID NO :26, un pourcentage d'identité d'au moins 70%, préférentiellement d'au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99%.
2. Acide nucléique purifié ou isolé, caractérisé en ce qu'il code au moins un polypeptide selon la revendication 1.
3. Acide nucléique purifié ou isolé selon la revendication 2 choisi parmi les séquences suivantes: SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :7, SEQ ID NO :9, SEQ ID NO :11; SEQ ID NO :13, SEQ ID NO :15, SEQ ID NO :17, SEQ ID NO :19, SEQ ID NO :21, SEQ ID NO :23 et SEQ ID NO :25.
4. Vecteur caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique selon l'une des revendications 2 ou 3.

5. Cellule hôte isolée caractérisée en ce qu'elle comprend l'acide nucléique selon l'une des revendications **2** ou **3** ou le vecteur selon la revendication **4**.
- 5   **6.** Cellule hôte isolée selon la revendication **5**, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Humicola*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Thermomonospora*, *Myceliophthora*, *Chrysosporium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*,  
10   *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Yarrowia*, *Pichia* et *Saccharomyces*.
7. Cellule hôte isolée selon la revendication **5** ou **6**, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi *Trichoderma*  
15   *reesei*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Neurospora crassa*, *Humicola grisae*, *Myceliophthora thermopila*, *Chrysosporium lucknowense*, *Penicillium*  
20   *pinophilum*, *Penicillium oxalicum*, *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium saccharolyticum*, *Clostridium benjerinckii*, *Clostridium butylicum*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolityca*, *Saccharomyces cerevisiae*.
- 25   **8.** Utilisation dudit polypeptide selon la revendication **1** pour l'hydrolyse de la cellulose.
9. Utilisation dudit polypeptide selon la revendication **1** pour la production de biocarburant.  
30
- 10.** Composition enzymatique apte à agir sur la biomasse lignocellulosique, ladite composition enzymatique étant produite par des champignons filamenteux et comprenant au moins un polypeptide selon la revendication **1**.

- 11.** Procédé de production de biocarburant à partir de la biomasse, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :
- 5 - mise en suspension en phase aqueuse de la biomasse à hydrolyser ;
- hydrolyse en présence d'une composition enzymatique selon la revendication **10** de la biomasse lignocellulosique de manière à produire un hydrolysat
- 10 contenant du glucose ;
- fermentation du glucose de l'hydrolysat de manière à produire un moût de fermentation ;
- séparation du biocarburant du moût de fermentation.
- 12.** Procédé de production de biocarburant à partir de la biomasse, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :
- 15 - mise en suspension en phase aqueuse de la biomasse à hydrolyser ;
- 20 - ajout simultané d'une composition enzymatique selon la revendication **10** et d'un organisme fermentaire de manière à produire un moût de fermentation ;
- séparation du biocarburant du moût de fermentation.
- 13.** Procédé selon la revendication 12, dans lequel l'organisme fermentaire est choisi parmi une cellule hôte selon l'une des revendications 5 ou 6.
- 14.** Procédé de production de biocarburant à partir de la
- 30 biomasse, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :
- mise en suspension en phase aqueuse de la biomasse à hydrolyser ;

- ajout d'une ou plusieurs cellules hôtes selon l'une des revendications 5 à 7, avec un organisme fermentaire et/ou une composition enzymatique selon la revendication **10**, de manière à produire un moût de fermentation ;
- 5 - séparation du biocarburant du moût de fermentation.

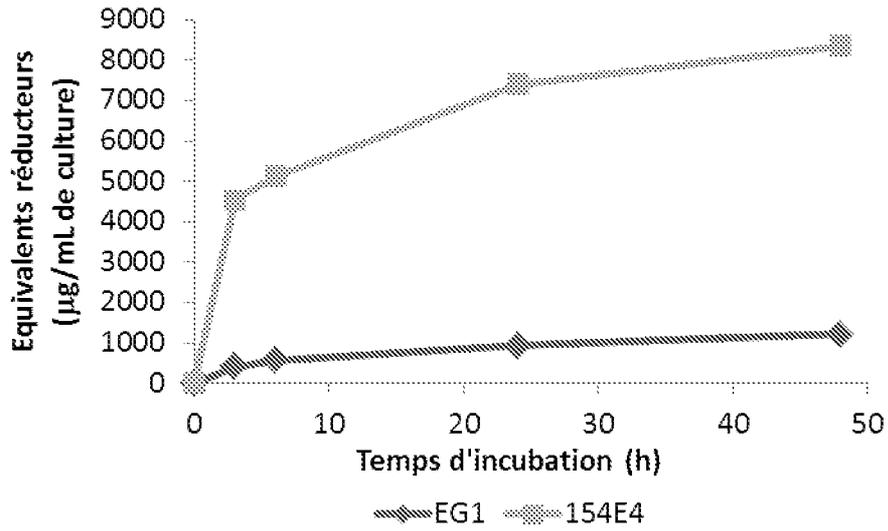


FIGURE 1

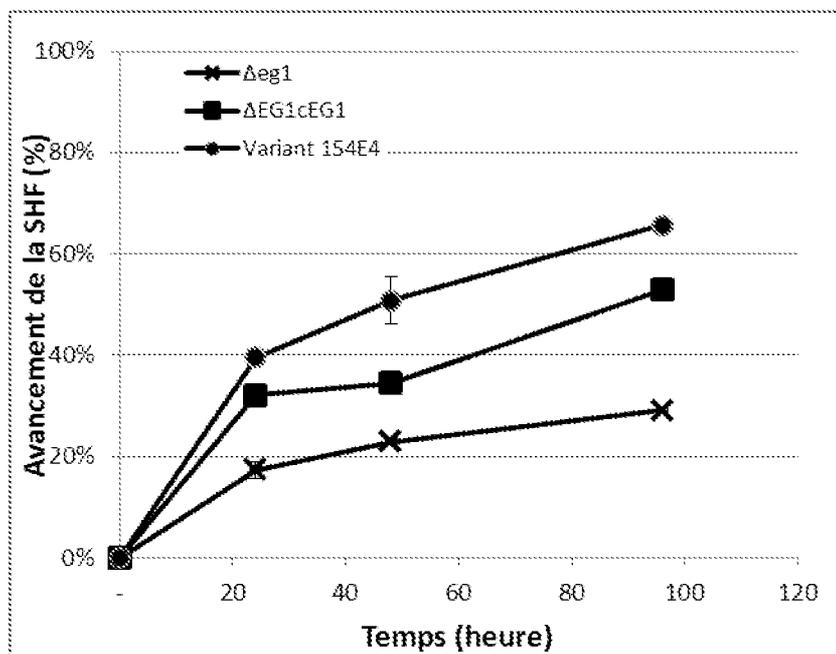


FIGURE 2

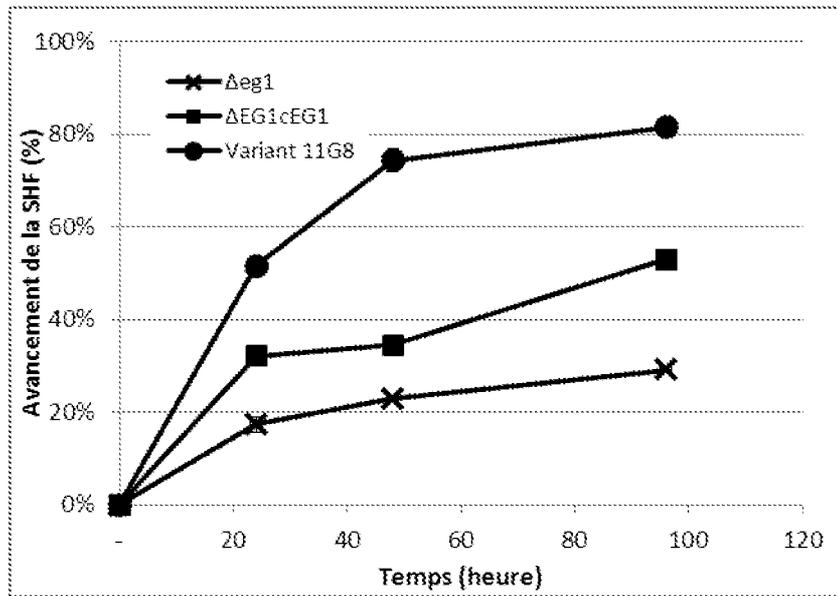


FIGURE 3

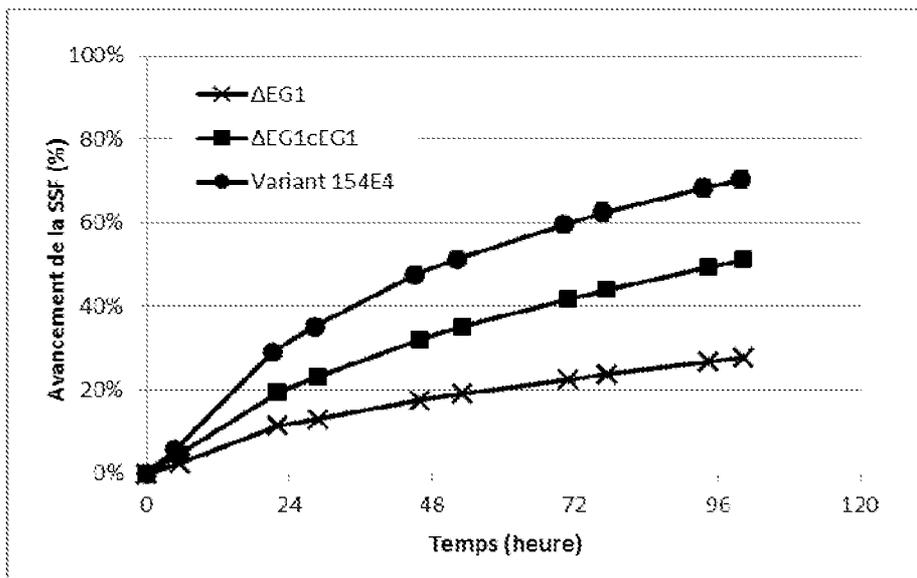


FIGURE 4

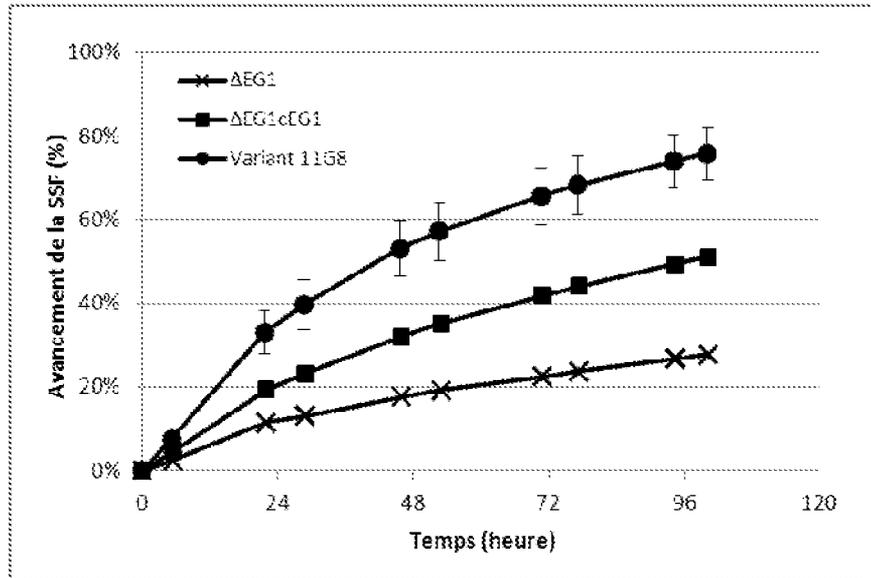


FIGURE 5

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/FR2014/052984

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
INV. C12N9/42 C12N15/56  
ADD.  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12N  
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
EPO-Internal, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2011/153516 A2 (MASCOMA CORP [US]; BREVNOVA ELENA [US]; MCBRIDE JOHN E [US]; WISWALL E) 8 December 2011 (2011-12-08) The query sequence SEQ ID NO:4 has 86.00 % identity over 442 positions in a common overlap with subject GSP:AZQ23336 (length: 459) from WO2011153516-A2 published on 2011-12-08. The query sequence SEQ ID NO:8 has 94.41 % identity in a common overlap with subject GSP:AZQ23342 (length: 395) from WO2011153516-A2 published on 2011-12-08. The query sequence SEQ ID NO:6 has 82.10 % identity in a common overlap with subject GSP:AZQ23336 (length: 459) from WO2011153516-A2 published on 2011-12-08. The query sequence SEQ ID NO:10 has 85.83 % identity over 374 positions in a common overlap (range (q:s): 1-373:20-393) with -/--</p>	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search <b>5 March 2015</b>	Date of mailing of the international search report <b>17/03/2015</b>
--	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer <b>Vix, Olivier</b>
--	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR2014/052984

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>subject GSP:AZQ23342 (length: 395) from WO2011153516-A2 published on 2011-12-08.</p> <p>-----</p> <p>WO 2012/044915 A2 (NOVOZYMES INC [US]; WOGULIS MARK [US]; HARRIS PAUL [US]; OSBORN DAVID) 5 April 2012 (2012-04-05) La séquence query SEQ ID NO:15 a 89.69 % d'identité (89.69 % de similarité) sur 1319 positions dans une portion (range (q:r): 1-1316:67-1379) commune avec le résultat GSN:AZU67015 (longueur: 1380) divulgué dans WO2012044915-A2 publié le 2012-04-05.; page 87 - page 101; claims 1-2,13-15</p> <p>-----</p>	1-14
X	<p>WO 2012/036810 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; CHOKHAWALA HARSHAI AKSHAY [US]; KIM TAE-WAN [US]) 22 March 2012 (2012-03-22) The query sequence SEQ ID NO:6 has 79.46 % identity (81.46 % over the entire subject, 80.00 % over the entire query) in a common overlap (range (q:s): 1-445:1-437) with subject GSP:AZU33754 (length: 437) from WO2012036810-A2 published on 2012-03-22.; the whole document</p> <p>-----</p>	1-14
X	<p>WO 2013/028701 A1 (CODEXIS INC) 28 February 2013 (2013-02-28) The query sequence SEQ ID NO:8 has 94.41 % identity (89.87 % over the entire subject, 94.41 % over the entire query) in a common overlap (range (q:s): 1-376:20-395) with subject PL_PROT:US20130323822 A1 225 (length: 395) from US2013323822-A1 published on 2013-12-05.; the whole document</p> <p>-----</p>	1-14
X	<p>WO 2008/148131 A1 (NOVOZYMES INC [US]; LOPEZ DE LEON ALFREDO [US]; DING HANSHU [US]; BROW) 4 December 2008 (2008-12-04) The query sequence SEQ ID NO:3 has 83.18 % identity (83.18 % similarity) over 767 positions in a common overlap (range (q:s): 19-783:85-846) with subject GSN:AUM21695 (length: 1377) from WO2008148131-A1 published on 2008-12-04.; the whole document</p> <p>-----</p>	1-14
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2014/052984

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2011/057140 A1 (NOVOZYMES INC [US]; MCBRAYER BRETT [US]; SHAGHASI TARANA [US]; VLASENK) 12 May 2011 (2011-05-12)            La séquence query SEQ ID NO:11 a 88.04 % d'identité (88.04 % de similarité) sur 1321 positions dans une portion (range (q:r): 1-1319:67-1379) commune avec le résultat GSN:AZI04897 (longueur: 1380) divulgué dans W02011057140-A1 publié le 2011-05-12.;            the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14
X	<p>GUNSELI BAYRAM AKCAPINAR ET AL: "From in silico to in vitro: Modelling and production of Trichoderma reesei endoglucanase 1 and its mutant in Pichia pastoris",            JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY,            vol. 159, no. 1-2, 1 May 2012 (2012-05-01), pages 61-68, XP055039736,            ISSN: 0168-1656, DOI:            10.1016/j.jbiotec.2012.01.001            the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14
Y	<p>WO 2010/088387 A1 (NOVOZYMES INC [US]; NOVOZYMES AS [DK]; SCHNORR KIRK [DK]; REY MICHAEL) 5 August 2010 (2010-08-05)            La séquence query SEQ ID NO:15 a 89.69 % d'identité (89.69 % de similarité) sur 1319 positions dans une portion (range (q:r): 1-1316:67-1379) commune avec le résultat GSN:AYG55471 (longueur: 1380) divulgué dans W02010088387-A1 publié le 2010-08-05.;            the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14
Y	<p>WO 2009/085935 A2 (NOVOZYMES AS [DK]; HARRIS PAUL [US]; MAIYURAN SUCHINDRA [US]; BROWN KI) 9 July 2009 (2009-07-09)            La séquence query SEQ ID NO:11 a 88.04 % d'identité (88.04 % de similarité) sur 1321 positions dans une portion (range (q:r): 1-1319:67-1379) commune avec le résultat GSN:AZI04897 (longueur: 1380) divulgué dans W02011057140-A1 publié le 2011-05-12.;            the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR2014/052984

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 2011/059740 A1 (NOVOZYMES INC [US]; NOVOZYMES AS [DK]; BROWN KIMBERLY [US]; ABBATE ERI) 19 May 2011 (2011-05-19) La séquence query SEQ ID NO:3 a 83.18 % d'identité (83.18 % de similarité) sur 767 positions dans une portion (range (q:r): 19-783:85-846) commune avec le résultat GSN:AZH96925 (longueur: 1377) divulgué dans US2011099671-A1 publié le 2011-04-28.; the whole document -----</p>	1-14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2014/052984

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011153516 A2	08-12-2011	CA 2801577 A1	08-12-2011
		CN 103124783 A	29-05-2013
		EP 2576762 A2	10-04-2013
		US 2013323822 A1	05-12-2013
		US 2014308724 A1	16-10-2014
		WO 2011153516 A2	08-12-2011
WO 2012044915 A2	05-04-2012	CN 103221538 A	24-07-2013
		EP 2622069 A2	07-08-2013
		US 2013217079 A1	22-08-2013
		WO 2012044915 A2	05-04-2012
WO 2012036810 A2	22-03-2012	AU 2011302536 A1	14-03-2013
		CA 2811206 A1	22-03-2012
		CN 103119159 A	22-05-2013
		EP 2616542 A2	24-07-2013
		JP 2013539971 A	31-10-2013
		US 2015037845 A1	05-02-2015
		WO 2012036810 A2	22-03-2012
WO 2013028701 A1	28-02-2013	EP 2748317 A1	02-07-2014
		US 2013052698 A1	28-02-2013
		US 2013052713 A1	28-02-2013
		US 2015010981 A1	08-01-2015
		WO 2013028701 A1	28-02-2013
WO 2008148131 A1	04-12-2008	BR PI0812035 A2	14-10-2014
		CA 2687609 A1	04-12-2008
		CN 101784659 A	21-07-2010
		EP 2069489 A1	17-06-2009
		US 2009019608 A1	15-01-2009
		US 2012011619 A1	12-01-2012
		US 2012252068 A1	04-10-2012
		WO 2008148131 A1	04-12-2008
WO 2011057140 A1	12-05-2011	CA 2780179 A1	12-05-2011
		CN 102947442 A	27-02-2013
		EP 2496694 A1	12-09-2012
		US 2011111453 A1	12-05-2011
		US 2014051130 A1	20-02-2014
		WO 2011057140 A1	12-05-2011
WO 2010088387 A1	05-08-2010	CN 102388134 A	21-03-2012
		EP 2391715 A1	07-12-2011
		US 2012096597 A1	19-04-2012
		WO 2010088387 A1	05-08-2010
WO 2009085935 A2	09-07-2009	AU 2008343105 A1	09-07-2009
		CA 2709490 A1	09-07-2009
		CN 101952420 A	19-01-2011
		EA 201070764 A1	30-12-2010
		EP 2235173 A2	06-10-2010
		EP 2653539 A1	23-10-2013
		JP 2011507525 A	10-03-2011
		KR 20100105849 A	30-09-2010
		MX 293208 B	06-12-2011
		NZ 586014 A	27-07-2012
		NZ 598403 A	27-07-2012

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2014/052984

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		US 2010304434 A1	02-12-2010	
		US 2013117892 A1	09-05-2013	
		WO 2009085935 A2	09-07-2009	
-----				
WO 2011059740	A1	19-05-2011	CA 2776336 A1	19-05-2011
			CN 102666847 A	12-09-2012
			EP 2494042 A1	05-09-2012
			US 2012260371 A1	11-10-2012
			WO 2011059740 A1	19-05-2011
-----				

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2014/052984

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> INV. C12N9/42 C12N15/56 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N		
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 cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2011/153516 A2 (MASCOMA CORP [US]; BREVNOVA ELENA [US]; MCBRIDE JOHN E [US]; WISWALL E) 8 décembre 2011 (2011-12-08) The query sequence SEQ ID NO:4 has 86.00 % identity over 442 positions in a common overlap with subject GSP:AZQ23336 (length: 459) from WO2011153516-A2 published on 2011-12-08. The query sequence SEQ ID NO:8 has 94.41 % identity in a common overlap with subject GSP:AZQ23342 (length: 395) from WO2011153516-A2 published on 2011-12-08. The query sequence SEQ ID NO:6 has 82.10 % identity in a common overlap with subject GSP:AZQ23336 (length: 459) from WO2011153516-A2 published on 2011-12-08. The query sequence SEQ ID NO:10 has 85.83 % identity over 374 positions in a common overlap (range (q:s): 1-373:20-393) with -/--	1-14
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> 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 international 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 international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international 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 internationale a été effectivement achevée  5 mars 2015		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  17/03/2015
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  Vix, Olivier

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>subject GSP:AZQ23342 (length: 395) from WO2011153516-A2 published on 2011-12-08.</p> <p>-----</p> <p>WO 2012/044915 A2 (NOVOZYMES INC [US]; WOGULIS MARK [US]; HARRIS PAUL [US]; OSBORN DAVID) 5 avril 2012 (2012-04-05) La séquence query SEQ ID NO:15 a 89.69 % d'identité (89.69 % de similarité) sur 1319 positions dans une portion (range (q:r): 1-1316:67-1379) commune avec le résultat GSN:AZU67015 (longueur: 1380) divulgué dans WO2012044915-A2 publié le 2012-04-05.; page 87 - page 101; revendications 1-2,13-15</p>	1-14
X	<p>-----</p> <p>WO 2012/036810 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; CHOKHAWALA HARSHAI AKSHAY [US]; KIM TAE-WAN [US]) 22 mars 2012 (2012-03-22) The query sequence SEQ ID NO:6 has 79.46 % identity (81.46 % over the entire subject, 80.00 % over the entire query) in a common overlap (range (q:s): 1-445:1-437) with subject GSP:AZU33754 (length: 437) from WO2012036810-A2 published on 2012-03-22.; le document en entier</p>	1-14
X	<p>-----</p> <p>WO 2013/028701 A1 (CODEXIS INC) 28 février 2013 (2013-02-28) The query sequence SEQ ID NO:8 has 94.41 % identity (89.87 % over the entire subject, 94.41 % over the entire query) in a common overlap (range (q:s): 1-376:20-395) with subject PL_PROT:US20130323822_A1_225 (length: 395) from US2013323822-A1 published on 2013-12-05.; le document en entier</p>	1-14
X	<p>-----</p> <p>WO 2008/148131 A1 (NOVOZYMES INC [US]; LOPEZ DE LEON ALFREDO [US]; DING HANSHU [US]; BROW) 4 décembre 2008 (2008-12-04) The query sequence SEQ ID NO:3 has 83.18 % identity (83.18 % similarity) over 767 positions in a common overlap (range (q:s): 19-783:85-846) with subject GSN:AUM21695 (length: 1377) from WO2008148131-A1 published on 2008-12-04.; le document en entier</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-14

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WO 2011/057140 A1 (NOVOZYMES INC [US]; MCBRAYER BRETT [US]; SHAGHASI TARANA [US]; VLASENK) 12 mai 2011 (2011-05-12)                      La séquence query SEQ ID NO:11 a 88.04 % d'identité (88.04 % de similarité) sur 1321 positions dans une portion (range (q:r): 1-1319:67-1379) commune avec le résultat GSN:AZI04897 (longueur: 1380) divulgué dans W02011057140-A1 publié le 2011-05-12.;                      le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14
X	<p>GUNSELI BAYRAM AKCAPINAR ET AL: "From in silico to in vitro: Modelling and production of Trichoderma reesei endoglucanase 1 and its mutant in Pichia pastoris",                      JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY,                      vol. 159, no. 1-2, 1 mai 2012 (2012-05-01), pages 61-68, XP055039736,                      ISSN: 0168-1656, DOI:                      10.1016/j.jbiotec.2012.01.001                      le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14
Y	<p>WO 2010/088387 A1 (NOVOZYMES INC [US]; NOVOZYMES AS [DK]; SCHNORR KIRK [DK]; REY MICHAEL) 5 août 2010 (2010-08-05)                      La séquence query SEQ ID NO:15 a 89.69 % d'identité (89.69 % de similarité) sur 1319 positions dans une portion (range (q:r): 1-1316:67-1379) commune avec le résultat GSN:AYG55471 (longueur: 1380) divulgué dans W02010088387-A1 publié le 2010-08-05.;                      le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14
Y	<p>WO 2009/085935 A2 (NOVOZYMES AS [DK]; HARRIS PAUL [US]; MAIYURAN SUCHINDRA [US]; BROWN KI) 9 juillet 2009 (2009-07-09)                      La séquence query SEQ ID NO:11 a 88.04 % d'identité (88.04 % de similarité) sur 1321 positions dans une portion (range (q:r): 1-1319:67-1379) commune avec le résultat GSN:AZI04897 (longueur: 1380) divulgué dans W02011057140-A1 publié le 2011-05-12.;                      le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-14

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>WO 2011/059740 A1 (NOVOZYMES INC [US]; NOVOZYMES AS [DK]; BROWN KIMBERLY [US]; ABBATE ERI) 19 mai 2011 (2011-05-19)                      La séquence query SEQ ID NO:3 a 83.18 % d'identité (83.18 % de similarité) sur 767 positions dans une portion (range (q:r): 19-783:85-846) commune avec le résultat GSN:AZH96925 (longueur: 1377) divulgué dans US2011099671-A1 publié le 2011-04-28.;                      le document en entier                      -----</p>	1-14

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2014/052984

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2011153516	A2	08-12-2011	CA 2801577	A1 08-12-2011
			CN 103124783	A 29-05-2013
			EP 2576762	A2 10-04-2013
			US 2013323822	A1 05-12-2013
			US 2014308724	A1 16-10-2014
			WO 2011153516	A2 08-12-2011
-----				
WO 2012044915	A2	05-04-2012	CN 103221538	A 24-07-2013
			EP 2622069	A2 07-08-2013
			US 2013217079	A1 22-08-2013
			WO 2012044915	A2 05-04-2012
-----				
WO 2012036810	A2	22-03-2012	AU 2011302536	A1 14-03-2013
			CA 2811206	A1 22-03-2012
			CN 103119159	A 22-05-2013
			EP 2616542	A2 24-07-2013
			JP 2013539971	A 31-10-2013
			US 2015037845	A1 05-02-2015
			WO 2012036810	A2 22-03-2012
			-----	
WO 2013028701	A1	28-02-2013	EP 2748317	A1 02-07-2014
			US 2013052698	A1 28-02-2013
			US 2013052713	A1 28-02-2013
			US 2015010981	A1 08-01-2015
			WO 2013028701	A1 28-02-2013
-----				
WO 2008148131	A1	04-12-2008	BR PI0812035	A2 14-10-2014
			CA 2687609	A1 04-12-2008
			CN 101784659	A 21-07-2010
			EP 2069489	A1 17-06-2009
			US 2009019608	A1 15-01-2009
			US 2012011619	A1 12-01-2012
			US 2012252068	A1 04-10-2012
			WO 2008148131	A1 04-12-2008
			-----	
WO 2011057140	A1	12-05-2011	CA 2780179	A1 12-05-2011
			CN 102947442	A 27-02-2013
			EP 2496694	A1 12-09-2012
			US 2011111453	A1 12-05-2011
			US 2014051130	A1 20-02-2014
			WO 2011057140	A1 12-05-2011
-----				
WO 2010088387	A1	05-08-2010	CN 102388134	A 21-03-2012
			EP 2391715	A1 07-12-2011
			US 2012096597	A1 19-04-2012
			WO 2010088387	A1 05-08-2010
-----				
WO 2009085935	A2	09-07-2009	AU 2008343105	A1 09-07-2009
			CA 2709490	A1 09-07-2009
			CN 101952420	A 19-01-2011
			EA 201070764	A1 30-12-2010
			EP 2235173	A2 06-10-2010
			EP 2653539	A1 23-10-2013
			JP 2011507525	A 10-03-2011
			KR 20100105849	A 30-09-2010
			MX 293208	B 06-12-2011
			NZ 586014	A 27-07-2012
			NZ 598403	A 27-07-2012

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2014/052984

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		US 2010304434 A1	02-12-2010
		US 2013117892 A1	09-05-2013
		WO 2009085935 A2	09-07-2009
-----			
WO 2011059740 A1	19-05-2011	CA 2776336 A1	19-05-2011
		CN 102666847 A	12-09-2012
		EP 2494042 A1	05-09-2012
		US 2012260371 A1	11-10-2012
		WO 2011059740 A1	19-05-2011
-----			