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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
7 juin 2012 (07.06.2012)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/072793 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 9/04 (2006.01) *C12N 9/92* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2011/071616

(22) Date de dépôt international :
2 décembre 2011 (02.12.2011)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
10/04709 3 décembre 2010 (03.12.2010) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)* : **Lesaffre et Compagnie** [FR/FR]; 41 rue Etienne Marcel, F-75001 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **DESFOUGERES, Thomas** [FR/FR]; 20 rue du Dr Guerin, F-59960 Neuville en Ferrain (FR). **PIGNEDE, Georges** [FR/FR]; 3 chemin des Dames, F-59700 Marcq en Baroeul (FR).

(74) Mandataire : **TOUATI, Catherine**; 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

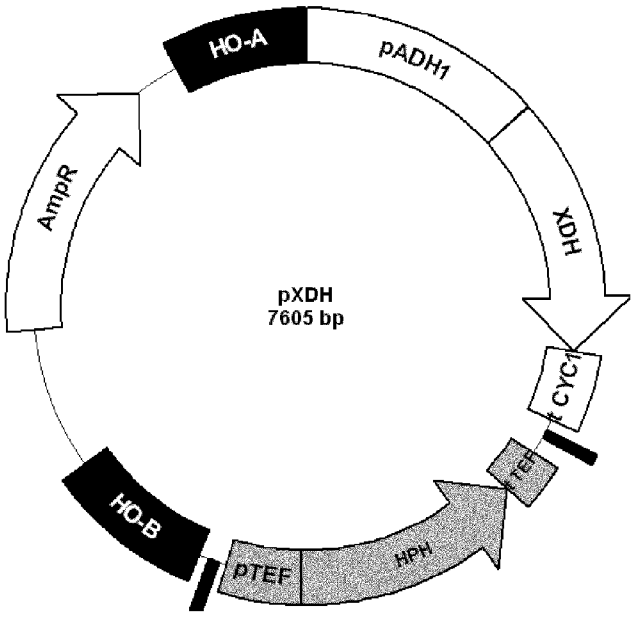
(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : METHOD FOR PREPARING AN INDUSTRIAL YEAST, INDUSTRIAL YEAST AND USE IN THE PRODUCTION OF ETHANOL FROM AT LEAST ONE PENTOSE

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION D'UNE LEVURE INDUSTRIELLE, LEVURE INDUSTRIELLE ET APPLICATION A LA PRODUCTION D'ETHANOL A PARTIR D'AU MOINS UN PENTOSE

Figure 1



(57) Abstract : The present invention relates to the field of methods for obtaining ethanol-producing yeast strains, of yeast strains thus produced, and of the industrial production of ethanol from said strains. More especially, the present invention describes, in most general terms, a method for preparing yeasts from *Saccharomyces cerevisiae* strains by means of the integration, into the genome of the yeast, of at least one gene encoding xylose isomerase and of at least one gene encoding xylitol dehydrogenase. The strain of the invention is of use for producing ethanol from a medium comprising at least one pentose, preferably xylose or a xylose and arabinose mixture.

(57) Abrégé : La présente invention a trait au domaine des procédés d'obtention de souches de levure productrices d'éthanol, des souches ainsi produites, et de la production industrielle d'éthanol à partir desdites souches. Plus spécialement la présente invention décrit dans son aspect le plus général, un procédé de préparation de levures à partir de souches de Saccharomyces cerevisiae par l'intégration

[Suite sur la page suivante]

WO 2012/072793 A1

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

— *avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel biologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis, séparément, et non avec la description (règles 13bis.4.d)i) et 48.2.a) viii))*

— *avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))*

dans le génome de la levure d'au moins un gène codant la Xylose Isomérase et d'au moins un gène codant la Xylitol DésHydrogénase. La souche de l'invention est utile pour la production d'éthanol à partir d'un milieu comprenant au moins un pentose, de préférence le xylose ou un mélange xylose et arabinose.

PROCEDE DE PREPARATION D'UNE LEVURE INDUSTRIELLE, LEVURE INDUSTRIELLE ET APPLICATION A LA PRODUCTION D'ETHANOL A PARTIR D'AU MOINS UN PENTOSE

DOMAINE TECHNIQUE

La présente invention se rapporte au domaine des procédés d'obtention de souches de levure productrices d'éthanol, des levures ainsi produites, et de la production industrielle d'éthanol à partir desdites levures. Plus spécialement la présente invention concerne dans son aspect le plus général, un procédé de préparation de levures à partir de souches de *Saccharomyces cerevisiae* dites industrielles, lesdites levures et leur application à la production industrielle d'éthanol à partir de milieux industriels contenant au moins un pentose, notamment le xylose.

ETAT DE LA TECHNIQUE

Le point commun de la plupart des approches de l'art antérieur du domaine consiste en des procédés visant l'amélioration de souches au patrimoine génétique connu et/ou construit et dont les aptitudes à produire de l'éthanol sont étudiées en général dans des milieux et dans des conditions « idéales » de laboratoire.

En effet, la littérature scientifique ainsi que les documents brevet analysés par la Demanderesse enseignent, le plus souvent, des procédés d'obtention de souches haploïdes ou diploïdes, faiblement tolérantes aux stress notamment aux fortes concentrations d'éthanol et/ou aux températures élevées et/ou aux inhibiteurs de fermentation. En outre, ces procédés nécessitent pour la plupart d'avoir recours, pour ces souches, à l'utilisation de marqueurs d'auxotrophie et/ou de marqueurs de résistance à des antibiotiques qui peuvent les disqualifier pour une utilisation ultérieure en milieu industriel pour des raisons évidentes de coût voire quelquefois de santé ou de respect de l'environnement.

Les propriétés de croissance des souches développées antérieurement sont en général insuffisantes et ces souches n'ont jamais été confrontées aux impératifs de production de biomasse à l'échelle industrielle, à savoir pour n'en citer que trois : fort taux de croissance, aptitude au séchage, stabilité en conservation.

Si des performances dites fermentaires (aptitude à la production anaérobie d'éthanol) sont obtenues dans des milieux synthétiques ou définis dits de laboratoire avec ces souches antérieures, elles ne sont pas transposables en général, dans des milieux industriels comportant des mélanges complexes issus par exemple de résidus de traitement de la cellulose qui renferment des composés toxiques pouvant inhiber à différents niveaux la machinerie cellulaire de la levure, notamment furfural, HMF, dérivés phénoliques, acide acétique. En outre, l'aptitude au « scale up » ou transposition d'échelle de ces procédés antérieurs de production d'éthanol est rarement documentée.

Le document WO 2008/133665 enseigne la production d'alcool à partir d'une souche de levure au « contexte génétique » de type :

- Gène STP15 muté (F117S, Y195H, K218R).
- Gènes codant pour XI / XR / XDH ou XK exogènes.

« XI » désigne la xylose isomérase, « XR » désigne la xylose réductase, « XDH » désigne la xylitol déshydrogénase, et « XK » désigne la D-xylulokinase.

Le document WO 2005/113774 décrit un opéron recombinant comprenant deux séquences d'acide nucléique codant respectivement une XI d'*E. coli* et une XDH de *Trichoderma reesei* dans le cadre de la production de xylitol.

Le document Plos Genetics de Gavin Sherlok et al., publié le 13 mai 2010, décrit un gène *XDH1* présent dans certaines souches particulières de *Saccharomyces cerevisiae*, codant possiblement une xylitol déshydrogénase.

Le document au nom de Dawid Brat, Eckard Boles et Beate Wiedemannn, dans Appl. Environ. Microbiol., avril 2009, vol 75, n°8, p. 2304-

2311, décrit l'expression chez *Saccharomyces cerevisiae* du gène de la xylose isomérase issu de *Clostridium phytofermentans.*

Il ressort de cette revue des documents de l'art antérieur, ainsi que des travaux des inventeurs de la présente invention, qu'étant donné les contextes/patrimoines génétiques très différents des souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* mises en œuvre dans le but de croître sur et/ou fermenter le xylose, les conséquences par exemple, d'une surexpression et/ou d'une délétion de gènes natifs et/ou de l'introduction d'un ou de plusieurs gènes hétérologues ne se peuvent prédire.

RESUME DE L'INVENTION

Aussi, La Demanderesse étudiant de nombreuses souches de type alcool, brassicoles et de boulangerie, a constaté de manière surprenante que l'introduction dans des souches de levure de cassettes d'expression ou de délétion déterminées de sorte à y exprimer une voie métabolique XI-XDH, rendait celles-ci particulièrement performantes dans la production d'éthanol. De plus, la demanderesse a constaté que l'introduction de l'acide nucléique codant XI n'est pas suffisante à elle seule pour la fermentation efficace du Xylose.

De manière générale, la demanderesse a constaté que l'introduction de cassettes d'expression d'un gène codant pour une enzyme apte à transformer tout hydrate de carbone (notamment D-xylose) en xylulose (D-xylulose) et d'un gène codant pour une enzyme apte à transformer tout pentol (notamment xylitol) en xylulose en une seule étape, rendait toutes souches ainsi modifiées particulièrement performantes dans la croissance sur et/ou la fermentation du xylose.

Par « enzyme apte à transformer le xylose en xylulose », on entend une enzyme xylose isomérase.

Par « enzyme apte à transformer en une seule étape le xylitol en xylulose », on entend une enzyme xylitol déshydrogénase.

En effet, la demanderesse a confirmé que contrairement à la voie dite fongique associant XR et XDH, la voie dite bactérienne d'isomérisation (dont un exemple est celle de *C. phytofermentans*), quand elle est mise en

œuvre, n'implique pas de co-substrats. De plus, cette voie permet d'éviter l'accumulation de xylitol qui est un intermédiaire métabolique présent dans la voie fongique et qui peut réduire de manière significative le rendement de production d'éthanol.

Très récemment, sur certaines souches de *S. cerevisiae,* notamment celles utilisés pour la vinification, un gène *XDH1* a été identifié comme étant essentiel pour le métabolisme du xylose desdites souches (PLoS genetics 2010, 6, 1-17). Aussi, la demanderesse a constaté que même en supprimant le gène *GRE3* des souches modifiées, il existe d'autres activités parasites qui peuvent transformer le xylose en xylitol (activité aldose réductase). Ce qui est néfaste pour l'activité XI réduisant ainsi le rendement en éthanol recherché.

Les travaux réalisés par la demanderesse montrent que le renforcement de l'activité Xylitol DésHydrogénase se traduit par l'absence d'inhibition de la XI et donc par la stimulation de cette voie. Ce qui permet la production d'éthanol, à partir d'un milieu comportant au moins du xylose, avec un bon rendement cinétique.

En d'autres termes, dans l'état de la technique, deux voies différentes ont été explorées pour permettre la fermentation du xylose par la levure : la voie dite fongique utilisant les enzymes XR et XDH ; et la voie dite bactérienne utilisant l'enzyme XI. L'invention combine d'une manière originale des enzymes issues de ces deux voies, afin d'obtenir un résultat amélioré.

L'invention est définie dans les revendications en annexe.

L'invention concerne en particulier une souche de levure comportant au moins une copie d'un gène exogène codant pour une xylose isomérase, et une copie d'un gène exogène codant pour une xylitol déshydrogénase.

Par gène « *exogène* » (par opposition à « *endogène* »), on entend un gène qui n'est pas présent naturellement dans l'espèce de levure considérée. Le gène codant pour une xylitol déshydrogénase peut être le gène *XYL2*, mais dans ce cas il s'agit du gène *XYL2* d'une autre espèce que celle de la souche considérée.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une souche de levure comportant au moins une copie d'un gène exogène codant pour une xylose isomérase, et une copie d'un gène exogène codant pour une xylitol déshydrogénase.

L'invention concerne également un procédé de production d'éthanol utilisant les souches de levure selon l'invention.

BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

- La Figure 1 illustre un vecteur de surexpression de la XDH de *Pichia stipitis*.
- La Figure 2 illustre un vecteur de surexpression de la XI de *Clostridium phytofermentans.*
- La Figure 3 est un graphe illustrant la production d'éthanol en fonction du temps de fermentation à 32°C de deux souches de levure conformes à l'invention après évolution dirigée et de la souche éthanol red ™. Les clones testés ont été inoculés à raison de 5g de masse sèche/L dans un milieu YF + xylose à 70 g/L.
- La Figure 4 est un graphe illustrant la production d'éthanol en fonction du temps de fermentation à 32°C de deux souches de levure, l'une conforme à l'invention après évolution dirigée, l'autre souche découlant de la première mais après substitution de la copie du gène XDH par un marqueur de résistance à la kanamycine (KanMX4). Les clones testés ont été inoculés à raison de 5g de masse sèche/L dans un milieu YF + xylose à 70g/L.
- La figure 5 est un graphe illustrant la production d'éthanol (en ordonnée, en g pour 1 kg de milieu) en fonction du temps de fermentation à 32°C (en abscisse, en heures) de deux souches le levure conformes à l'invention EG8 et EG10. Les clones testés ont été inoculés à raison de 0,25 g de matière sèche levure par kg de milieu YF contenant du xylose à 70g/l comme seule source de carbone.

DESCRIPTION DETAILLEE DE MODES DE REALISATION

Ainsi, la présente invention a pour premier objet un procédé de préparation d'une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* apte à produire de l'éthanol à partir d'un milieu comportant au moins un pentose (notamment le xylose) et qui comprend les étapes suivantes consistant à

(i) sélectionner (ou fournir) une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae*

(ii) intégrer les cassettes d'expression suivantes dans le génome de la levure de l'étape (i),

a. l'association du type cadre ouvert de lecture (ORF) d'un gène codant pour une enzyme apte à transformer tout hydrate de carbone, notamment le xylose, en xylulose sous la dépendance d'un promoteur et d'un terminateur de *Saccharomyces cerevisiae*, la dite cassette étant flanquée en amont et en aval de régions recombinogéniques permettant son intégration ciblée dans le génome,

b. l'association du type cadre ouvert de lecture (ORF) d'un gène codant pour une enzyme apte à transformer en une seule étape tout pentol, notamment le xylitol, en xylulose sous la dépendance d'un promoteur et d'un terminateur de *Saccharomyces cerevisiae*, la dite cassette étant flanquée en amont et en aval de régions recombinogéniques permettant son intégration ciblée dans le génome,

(iii) induire l'expression d'au moins un gène de chaque étape de la partie non oxydative de la voie des pentoses phosphate ainsi qu'au moins un gène codant la xylulokinase (XKS1) en les plaçant sous la dépendance d'un promoteur d'un gène, notamment de la glycolyse, non réprimé ni par l'anaérobiose ni par la répression catabolique et fortement exprimé lors d'une fermentation alcoolique, et

(iv) déléter au moins au moins une copie ou de préférence au moins deux copies du cadre ouvert de lecture (ORF) du gène de *Saccharomyces cerevisiae GRE3* codant pour une aldose réductase. De préférence la totalité des copies du cadre ouvert de lecture (ORF) du gène de *Saccharomyces cerevisiae GRE3* sont délétées.

Le gène *XKS1* est de préférence le gène figurant dans GenBank sous le numéro 853108.

Le gène *GRE3* est de préférence le gène figurant dans GenBank sous le numéro 856504.

De manière préférentielle, le gène de l'étape (ii)a est un gène XI codant pour l'enzyme xylose isomérase choisi parmi ceux présents dans les génomes des genres *Clostridium, Pyromyces, Bactéroïdes, Streptomyces, Haemophilus, Burkholderia, Enterococcus, Thermotoga, Fusobacterium, Geobacillus, Arthrobacter, Ciona, Physcomitrella, Cellvibrio, Chitinophaga, Saccharopolyspora, Salinibacter*.

Le gène XI est de préférence choisi parmi un gène de *Clostridium phytofermentans*, *Saccharopolyspora erythraea*, *Salinibacter ruber* ou de *Piromyces sp. E2*.

Selon un mode de réalisation préféré, le gène XI a pour séquence la séquence de nucléotides SEQ ID NO:1 (qui représente la séquence du gène XI de *Clostridium phytofermentans*, décrite dans le document DE 102008031350). Alternativement, le gène XI a une séquence présentant au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 75 % d'identité, ou au moins 80 % d'identité, ou au moins 85 % d'identité, ou au moins 90 % d'identité, ou au moins 95 % d'identité, ou au moins 98 % d'identité, ou au moins 99 % d'identité, avec la séquence SEQ ID NO:1, et il code une enzyme xylose isomérase fonctionnelle.

Selon un autre mode de réalisation, le gène XI présente une séquence codant pour un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés SEQ ID NO:2 (qui représente la séquence de la protéine XI de *Clostridium phytofermentans*, décrite dans le document DE 102008031350). Alternativement, ledit polypeptide a une séquence présentant au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 75 % d'identité, ou au moins 80 % d'identité, ou au moins 85 % d'identité, ou au moins 90 % d'identité, ou au moins 95 % d'identité, ou au moins 98 % d'identité, ou au moins 99 % d'identité, avec la séquence SEQ ID NO:2, et il a une activité xylose isomérase.

Selon la présente invention par « transformer le xylitol en xylulose en une seule étape » on entend une oxydation directe du xylitol en xylulose et cela par une seule et même enzyme (xylitol déshydrogénase).

Préférentiellement le gène de l'étape (ii)b, est un gène de *Pichia stipitis* codant pour l'enzyme xylitol déshydrogénase XDH.

De préférence, il s'agit du gène *XYL2*, dont la séquence figure dans GenBank sous le numéro 4852013, ou une séquence présentant au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 75 % d'identité, ou au moins 80 % d'identité, ou au moins 85 % d'identité, ou au moins 90 % d'identité, ou au moins 95 % d'identité, ou au moins 98 % d'identité, ou au moins 99 % d'identité, par rapport à ladite séquence figurant dans GenBank sous le numéro 4852013, la séquence codant pour une enzyme xylitol déshydrogénase fonctionnelle.

De manière préférentielle, la souche de levure de l'étape (i) présente une activité xylitol déshydrogénase XDH endogène inférieure à 150 mKat / g de protéines. L'activité xylitol déshydrogénase peut être mesurée dans les conditions indiquées dans l'article de Xu et al., intitulé *Characterization of Ethanol Production from Xylose and Xylitol by a Cell-Free Pachysolen tannophilus System*, dans Appl. Environ. Microbiol. 59:231-235 (1993).

Il est connu que, lors du traitement de la biomasse destinée à la fermentation alcoolique, certains inhibiteurs de fermentation apparaissent. Parmi eux on peut citer les produits phénoliques, le furfural ou encore l'acide acétique. Il est connu aussi que ces inhibiteurs sont néfastes pour les performances voire la survie de la levure.

Pour résoudre ce problème additionnel, la demanderesse propose de sélectionner la souche de l'étape i parmi les souches industrielles présentant une résistance aux dérivés phénoliques.

Un autre avantage de la voie XI 'est la possibilité de « greffer en parallèle la voie arabinose bactérienne » comme décrit par exemple dans EP 1 499 708 ou encore dans WO 2008/041840, cette combinaison permettant

alors d'augmenter le degré d'alcool final en cas de présence d'arabinose dans les milieux à fermenter.

Le procédé de préparation de la levure de la présente invention tient compte à la fois des contraintes du levurier et dans le même temps de celles d'un utilisateur final dans ses applications notamment en termes de production industrielle d'éthanol à faible coût et haut rendement.

Le procédé selon l'invention présente, en particulier, les avantages suivants :

Pour le levurier, il permet :

- la construction d'une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* aneu/polyploïde, prototrophe afin de permettre la production de biomasse sur des sources simples de carbone, azote, phosphore dans des milieux peu chers tels que les sous-produits de l'industrie sucrière comme la mélasse par exemple,
- de disposer d'une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* présentant un taux de croissance maximum (μ max) compris entre 0,37 h^{-1} et 0,5 h^{-1},
- de disposer d'une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* qui, lorsqu'elle est produite selon un procédé tel que décrit dans le livre de référence « Yeast Technology » (2ème édition, 1991, G. Reed et T.W. Nagodawithana, publié par Van Nostrand Reinhold , ISBN 0-442-31892-8), permet d'obtenir un rendement de production de biomasse d'au moins 45g de matières sèches levure pour 100g d'équivalent saccharose mis en œuvre,
- de disposer d'une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* résistante au procédé de séchage tel que décrit dans les documents brevets EP 511108 et US 5 741 695, la perte d'activité fermentative après séchage ne devant pas excéder 30%.
- la production en conditions industrielles (en particulier milieu peu cher, bon rendement de biomasse, levure sèche prête à l'emploi) d'une levure fraîche ou sèche à partir d'une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* génétiquement stable, robuste car

notamment tolérante aux concentrations élevées d'éthanol et apte à produire, à partir par exemple de biomasses hémi-cellulosiques, de l'éthanol à au moins 40g/L et ce à une température élevée de l'ordre de 30 à 40°C.

Une souche de levure prototrophe est une souche capable de croître sur un milieu minimum. En particulier, une souche de levure prototrophe selon l'invention est capable de synthétiser tous les acides aminés et bases nécessaires à sa croissance.

Un milieu minimum est un milieu comprenant une source de carbone, une source d'azote, une source de potassium, une source de phosphore, une source de soufre, une source de magnésium, une source de calcium, une source de fer, une source d'oligo-éléments et de l'eau.

Un exemple de milieu minimum est le milieu YNB (Yeast Nitrogen Base). Le milieu YNB comprend par litre : biotine 2 µg, pantothénate de calcium 400 µg, acide folique 2 µg, inositol 2000 µg, niacine 400 µg, acide p-aminobenzoïque 200 µg, hydrochlorure de pyridoxine 400 µg, riboflavine 200 µg, hydrochlorure de thiamine 400 µg, acid borique 500 µg, sulfate de cuivre 40 µg, iodure de potassium 100 µg, chlorure ferrique 200 µg, sulfate de manganèse 400 µg, molybdate de sodium 200 µg, sulfate de zinc 400 µg, phosphate de potassium monobasique 1 g, sulfate de magnésium 500 mg, chlorure de sodium 100 mg, chlorure de calcium 100 mg, sulfate d'ammonium 5g/l, pH final 5,4.

Selon une autre variante préférée du procédé selon l'invention, lorsqu'à l'étape (ii) la cassette d'expression consiste en l'association du type cadre ouvert de lecture (ORF) du gène XI codant pour l'enzyme xylose isomérase *de Clostridium phytofermentans* / promoteur et terminateur de *Saccharomyces cerevisiae*, la dite cassette étant flanquée en amont et en aval de régions recombinogéniques permettant son intégration ciblée dans le génome, ledit procédé comporte alors en outre une étape de Saccharification et de Fermentation Simultanée (SSF) en présence de polymères d'hexoses, majoritairement constitués de glucose, et d'au moins une enzyme apte à les hydrolyser.

Par ailleurs, pour le producteur d'éthanol, l'avantage du procédé selon l'invention est encore de disposer d'une levure active (fraîche – liquide ou comprimée, compressée ou sèche), obtenue selon un procédé de production tel que décrit dans l'ouvrage « Yeast Technology », à partir d'une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* telle que définie au paragraphe précédent qui est :

- capable, dans les conditions de SSF décrites dans le document brevet WO 2004/046333, de fermenter à 32°C un hydrolysat de céréales jusqu'à une concentration en éthanol de 16% (p/p) minimum ;
- capable, dans les conditions de SSF décrites dans le document brevet WO 2004/046333, de fermenter à 35°C un hydrolysat de céréales jusqu'à une concentration en éthanol de 14,5% (p/p) minimum.

Les résultats du procédé selon l'invention sont d'autant plus remarquables lorsqu'ils sont obtenus à partir d'une souche dite industrielle, aneu/polyploïde prototrophe et de fait ayant un matériel génétique nettement plus complexe que celui d'une souche dite de laboratoire, rendant pour le moins imprévisibles les conséquences de modifications de ladite souche industrielle. Ce fond génétique complexe, spécifique aux souches industrielles, rend d'autant plus difficile l'obtention de souches génétiquement modifiées exemptes au final de marqueurs de résistance à des antibiotiques, en particulier lorsque de nombreuses cibles génétiques doivent être modifiées. Des souches exemptes de marqueurs de résistance aux antibiotiques sont de toute évidence préférables pour des raisons de santé et d'environnement.

Les souches prototrophes selon l'invention présentent l'avantage de croître sur des sources simples de carbone, d'azote et de phosphore.

Mais cette caractéristique fait que les vecteurs de transformation disponibles dans la communauté scientifique (vecteurs utilisant des marqueurs d'auxotrophie) sont inopérants.

Il est donc nécessaire d'avoir à disposition des outils/vecteurs utilisant des marqueurs de résistance à des antibiotiques, ces dits

outils/marqueurs étant avantageusement construits pour permettre *in fine* l'excision de ces marqueurs. A titre d'exemple, on peut utiliser la technologie Cre-lox. En résumé, on prévoit des séquences loxP encadrant chaque marqueur de sélection. L'excision des marqueurs de sélection est effectuée par transformation de la souche de levure par la méthode de l'acétate de lithium (Schiestl et Gietz, 1989, Current Genetics, vol 16, p339-346), avec un plasmide comprenant le gène de la recombinase Cre et un marqueur de sélection différent du ou des marqueurs de sélection à exciser. L'expression de la recombinase Cre dans la souche de levure permet d'exciser le marqueur de sélection, en ne laissant qu'une séquence loxP, éventuellement avec ses régions flanquantes. Il est possible d'induire ensuite la perte du plasmide comprenant le gène Cre par culture en condition non sélective, c'est-à-dire sur milieu enrichi et en l'absence d'antibiotique. La construction des levures conformes à l'invention a nécessité par exemple l'emploi de 4 marqueurs positifs différents conférant des résistances à 5 antibiotiques différents (généticine, phléomycine, hygromycine, blasticidine et nourseothricine).

Les souches conformes à l'invention sont de préférence aneuploïdes ou polyploïdes : c'est une caractéristique généralement rencontrée dans les levures industrielles qui sont issues du milieu naturel. Le passé phylogénétique de ces souches est à l'origine de cette particularité.

Mais c'est une difficulté supplémentaire rencontrée lorsque l'on souhaite disrupter/inactiver toutes les copies d'un gène donné. Toutefois, ce caractère d'aneu/polyploïdie est en général à l'origine de beaucoup de propriétés d'intérêt des levures industrielles (taux de croissance, résistance à différents stress, stabilité phénotypique).

En outre, la demanderesse après de longues recherches a constaté avec surprise qu'avec le procédé selon l'invention, mis en œuvre à partir de la souche sélectionnée :

- l'introduction de cassettes d'expression et de délétion ne fragilisait aucunement la levure modifiée qui voit son patrimoine génétique amélioré.

En particulier, les inventeurs ont montré qu'avec ladite souche il est possible de réaliser :

- la délétion d'au moins deux copies du gène *GRE3* de *S. cerevisiae* (l'enzyme Gre3p étant une aldose réductase qui consomme du NADPH,H+ qui est produit en grande partie via la partie oxydative de la voie des pentoses) dans ladite souche industrielle selon l'invention a permis de réduire d'autant la consommation de NADPH,H+ par la dite enzyme,

En variante préférée, ledit au moins un gène de chaque étape de la partie non oxydative de la voie des pentoses phosphate de l'étape (iii) est choisi dans le groupe constitué par les gènes codant pour les enzymes D-ribulose-5-phosphate 3-épimerase, ribose-5-phosphate kétol-isomérase, transkétolase et transaldolase, et notamment dans le groupe constitué par les gènes *RPE1, RKI1, TKL1* et *TAL1*. De préférence, ledit promoteur d'un gène de la glycolyse fortement exprimé lors d'une fermentation alcoolique est le promoteur *TDH3* pour *RPE1*, *RKI1* et *TKL1*, et *PGK1* pour *TAL1*.

Le gène *TAL1* est de préférence le gène figurant dans GenBank sous le numéro 851068.

Le gène *TKL1* est de préférence le gène figurant dans GenBank sous le numéro 856188.

Le gène *RKI1* est de préférence le gène figurant dans GenBank sous le numéro 854262.

Le gène *RPE1* est de préférence le gène figurant dans GenBank sous le numéro 853322.

Selon des caractéristiques complémentaires ou alternatives, dans le procédé de préparation d'une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* conforme à l'invention :

- le promoteur de *Saccharomyces cerevisiae* des étapes (ii)(a) et (ii)(b) est choisi dans le groupe comprenant les promoteurs des gènes codant les enzymes de la glycolyse et ceux codant pour les enzymes alcool déshydrogénase et de préférence choisi dans le groupe constitué par *ADH1*, *ADH2*, *PGK1*, *TDH3*, *PDC2* et GAL1/10, de préférence *ADH1*. Le terminateur de

Saccharomyces cerevisiae est constitué par *CYC1* ou par le terminateur propre du gène de la voie non oxydative des pentoses phosphates.

Il est prévu de préférence une étape ultérieure d'évolution dirigée comportant les étapes successives suivantes consistant à soumettre la levure obtenue à

(i) une mutagenèse,

(ii) une croissance en cultures cycliques sous O_2 limité dans un milieu comportant ledit au moins un pentose, et

(iii) une sélection par croissance aérobie sur milieu solide contenant comme seule source de carbone du glycérol,

de sorte à procurer des mutants non-déficients respiratoires de ladite levure qui présentent une croissance en anaérobiose en présence d'un milieu comportant ledit au moins un pentose (notamment xylose).

De manière préférée dans cette variante, la mutagenèse de l'étape (i) est réalisée en conditions « douces », à savoir mutagenèse modérée avec 100 à 500J/cm² et, de préférence encore, 300J/cm² de rayonnement UV à 254nm. Ces conditions n'entrainent qu'une mortalité de 7% à 16% de la population soumise au rayonnement UV.

Les inventeurs ont ainsi montré de manière surprenante, qu'avec une si faible mortalité contrôlée, il est permis de réduire d'un facteur 10 la durée de l'étape d'évolution dirigée par cultures cycliques nécessaire à l'obtention de mutants capables de fermenter ledit au moins un pentose (notamment xylose). Le taux de survie est déterminé en étalant sur des boîtes de milieu dont la source de carbone est du glucose, un volume identique de la suspension cellulaire avant et après mutagenèse. Le nombre de colonies est déterminé après 48h de croissance.

De manière préférée, la limitation en O_2 de l'étape (ii) de cette variante est réalisée grâce à une surpression partielle dans l'équipement utilisé (par exemple, fioles ou fermenteurs) due à une surpression consécutive à la production de CO_2 produit.

Les cultures cycliques selon cette variante, dans les conditions de fermentation, permettent d'enrichir la population en mutants capables de

fermenter ledit pentose (notamment xylose) et cela en un temps de 2 à 6 semaines et de préférence de 3 à 4 semaines ce qui est relativement court et très intéressant comparé à ce qui serait obtenu par chémostat comme décrit par Kuyper *et al.* (2004), FEMS Yeast Res., 4, 655-664.

Bien que le phénotype déficient respiratoire « petite » puisse concorder avec les critères de fermentation dudit au moins un pentose, dans cette variante les présents inventeurs ont réalisé une étape d'élimination des levures « petites » car ce phénotype est incompatible avec les procédés de production de levures industrielles au sens de l'invention.

Les chercheurs ont constaté que l'étape d'évolution dirigée telle qu'expliquée précédemment a permis d'augmenter de manière non négligeable l'activité de la xylose isomérase qui s'est traduit par une augmentation de la vitesse de consommation du xylose.

Sans vouloir être lié par une théorie, cet effet inattendu semble dû à l'augmentation du nombre de copies XI dans la souche modifiée.

La présente invention a encore pour objet la souche de levure industrielle *Saccharomyces cerevisiae* EG6 directement obtenue par le procédé selon l'invention après l'étape d'évolution dirigée et qui consiste en la souche de levure déposée le 23 novembre 2010 à la C.N.C.M (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, France) sous le N°I-4399 dans les conditions du traité de Budapest.

La présente invention a également pour objet la souche de levure industrielle *Saccharomyces cerevisiae* EG7 directement obtenue par le procédé selon l'invention après l'étape d'évolution dirigée déposée le 23 novembre 2010 à la C.N.C.M (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur) sous le N°I-4400 dans les conditions du traité de Budapest.

La présente invention a également pour objet la souche de levure industrielle *Saccharomyces cerevisiae* EG8 directement obtenue par le procédé selon l'invention après l'étape d'évolution dirigée déposée le 14 décembre 2010 à la C.N.C.M (Collection Nationale de Cultures de

Microorganismes de l'Institut Pasteur) sous le N°I-4417 dans les conditions du traité de Budapest.

La présente invention a également pour objet la souche de levure industrielle *Saccharomyces cerevisiae* EG10 directement obtenue par le procédé selon l'invention après l'étape d'évolution dirigée déposée le 5 octobre 2011 à la C.N.C.M (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur) sous le N°I-4538 dans les conditions du traité de Budapest.

D'autres souches selon l'invention sont des souches dérivées à partir d'une ou plusieurs souches selon l'invention, par exemple à partir d'une souche ou plusieurs souches obtenues selon le procédé ci-dessus, et notamment à partir d'une ou plusieurs des souches déposées à la CNCM sous le numéro I-4399 le 23 novembre 2010, sous le numéro I-4400 le 23 novembre 2010, sous le numéro I-4417 le 14 décembre 2010 et sous le numéro I-4538 le 5 octobre 2011.

Par l'expression « *souche dérivée* », on désigne en particulier les souches dérivées par un ou plusieurs croisements et/ou par mutation et/ou par transformation génétique.

Les souches dérivées par croisement peuvent être obtenues par croisement d'une souche selon l'invention avec la même souche, ou une autre souche selon l'invention, ou une autre souche quelconque.

Les souches dérivées par mutation peuvent être des souches ayant subi au moins une mutation spontanée dans leur génome ou au moins une mutation induite par mutagenèse. La ou les mutations des souches dérivées peuvent être silencieuses ou non.

Par l'expression « *mutagenèse* », on désigne à la fois la mutagenèse aléatoire obtenue par l'application d'un rayonnement (par exemple UV), ou par des agents chimiques mutagènes, et la mutagenèse insertionnelle ou dirigée, par transposition ou par intégration d'un fragment d'ADN exogène.

Les souches dérivées entrant dans le cadre de l'invention sont celles comportant au moins un gène XI exogène et un gène XDH exogène, et qui sont susceptibles de fermenter le xylose pour produire de l'éthanol, et notamment avec un rendement moyen d'éthanol produit sur xylose

consommé supérieur ou égal à 0,2 g, de préférence 0,3 g, 0,35 g voire 0,38 g d'éthanol par g de xylose consommé.

Ces souches dérivées présentent en outre de préférence une délétion du gène *GRE3*, et / ou un contrôle des gènes *XKS1* et/ou *RPE1* et/ou *RKI1* et/ou *TKL1* et/ou *TAL1* sous le contrôle d'un promoteur d'un gène non réprimé par l'anaérobiose ou par la répression catabolique induite par une quelconque source de carbone, et fortement exprimé lors de la fermentation alcoolique, tel qu'un promoteur d'un gène codant une enzyme de la glycolyse ou codant une enzyme alcool déshydrogénase, de préférence le promoteur de *ADH1*, *PGK1*, *TDH3*, *PDC2* ou *GAL1/10*.

De préférence encore :

– la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* obtenue est pratiquement ou totalement exempte de marqueurs notamment de résistance à des antibiotiques.

De préférence, les souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* préparées conformément à la présente invention, selon les critères ci-dessus définis, conservent, après introduction des modifications génétiques et autres mutations générées lors de l'étape d'évolution dirigée, leurs caractéristiques génotypiques et phénotypiques après un process industriel complet de production. En particulier, les levures produites présentent une cinétique de production d'alcool, une cinétique de consommation de xylose et/ou d'arabinose et une quantité maximale d'alcool produite rigoureusement identiques à la souche de levure avant l'application d'un process industriel complet.

Par ailleurs, les caractéristiques industrielles de la souche choisie avant manipulation telles que décrites précédemment (taux de croissance, rendement de production, aptitude au séchage) demeurent inchangées.

La présente invention a encore pour objet un procédé de production d'éthanol, à partir d'un milieu comportant au moins un pentose, par fermentation à l'aide d'une levure selon l'invention, mentionnée ci-dessus, ou telle qu'obtenue par un procédé conforme à l'invention comme il vient d'être décrit.

De manière préférée, le procédé de production d'éthanol présente les caractéristiques alternatives et/ou complémentaires suivantes :

- Ledit au moins un pentose est le xylose ou un mélange de xylose et d'arabinose.
- Ledit milieu est choisi dans le groupe constitué par, les hydrolysats de lignine, de cellulose, d'hémicellulose, de dextrines ou d'amidon.
- Dans le cas d'une SSF les vitesses moyennes de libération des hexoses, majoritairement du glucose, sont de l'ordre de 2,8 à 5,6g/L/h avec une concentration extracellulaire en hexose, majoritairement en glucose, nulle.
- Le rendement moyen d'éthanol produit sur xylose consommé est supérieur ou égal à 0,38 g d'éthanol par g de xylose consommé, par exemple il peut être approximativement de 0,40 g d'éthanol par g de xylose consommé.

Les concentrations en sucres pouvant être mises en œuvre (par exemple 70g/kg de Xylose ou 150g/kg de Xylose) sont à la connaissance de la Demanderesse, les concentrations maximum que l'on peut rencontrer en pratique. Tous les essais publiés faisant référence à la fermentation du xylose ont été réalisés avec des concentrations nettement inférieures en sucres totaux.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront encore mieux à la lecture des exemples de réalisation qui suivent qui sont donnés à titre purement illustratif et non limitatif, et pour la compréhension desquels on se reportera aux dessins annexés.

EXEMPLES

Exemple 1

La sélection de la souche est telle que décrite dans la description ci-dessus.

Toutes les séquences d'ADN qui ont été utilisées pour les différentes transformations visant la surexpression d'un gène ont été obtenues à partir d'un vecteur-type connu (type pUC) dans lequel ont été déclinés :

- les cibles d'intégration ;
- les promoteurs/terminateurs choisis par gène d'intérêt et
- les marqueurs de résistance qui seront éliminés par la suite (voir ci-dessous).

Un exemple de vecteur utilisé pour la surexpression de la XDH de *Pichia stipitis* est illustré à la Figure 1.

Un exemple de vecteur utilisé pour la surexpression de la XI de *Clostridium phytofermentans* est illustré à la Figure 2.

Pour la disruption des copies du gène *GRE3* de la souche industrielle sélectionnée, les inventeurs ont utilisé des amplifiats PCR à partir d'un plasmide de type pUG6 (Güldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH. Nucleic Acids Res. 1996 Jul 1;24(13):2519-24).

L'étape de transformation de la levure a été mise en œuvre d'après Gietz, R.D. and R.A. Woods. (2002) TRANSFORMATION OF YEAST BY THE Liac/SS CARRIER DNA/PEG METHOD. Methods in Enzymology 350: 87-96.

Les souches de levure selon l'invention, respectivement EG6, EG7, EG8 et EG10 ont été déposées à la CNCM et il leur a été attribué les numéros I-4399, I-4400, I-4417 et I-4538, respectivement.

Les souches conformes à l'invention :

- possèdent le génotype suivant :
  Ethanol Red™, Delta GRE3, BUD5::pADH1-XKS1-tCYC1, TAL1::pPGK1-TAL1-tCYC1, TKL1::pTDH3-TKL1-tCYC1,RPE1::pTDH3-RPE1-tCYC1, RKI1::pTDH3-RKI1-tCYC1, HO::PsXYL2-HYGRO, BUD5::CpXI-BLAST
- sont dépourvues de tout marqueur résiduel (par action de la cre recombinase).

Exemple 2

La mutagenèse des souches obtenues à l'Exemple précédent a été réalisée de manière modérée à savoir de 100 à 500J/cm² et de préférence à 300J/cm² d'Ultra-violets à 254nm.

Après une semaine de culture à 32°C dans un milieu type YE (Yeast Extract 0,5%) contenant 7% de Xylose sous agitation, sans aération - la limitation en O_2 étant réalisée grâce à une surpression partielle dans les fioles due au CO_2 produit lors de la fermentation - un ml de la culture est utilisé pour ré-ensemencer le même milieu. Cette opération est répétée 6 fois. Les cellules sont finalement étalées sur milieu gélosé YE Glucose à 20g/L. Des colonies isolées sont prélevées puis cultivées successivement sur :

- YE Glycérol à 20g/L et en aérobiose pour éliminer les mutants « petite » i.e. déficients respiratoires ;
- YE Glucose pour vérifier leur vitesse de croissance ;
- YE Xylose pour identifier les clones les plus intéressants.

Exemple 3

Après obtention de la souche EG6, la copie du gène XDH qui a été ajoutée à l'exemple 1 a été substituée par le gène de résistance à la kanamycine. La nouvelle souche obtenue est nommée EG6 – XDH. La capacité de la souche en question à fermenter le xylose a été comparée à celle de la souche EG6. Le résultat de cette comparaison est présenté sur la figure 4.

REVENDICATIONS

1. Souche de levure comportant au moins une copie d'un gène exogène codant pour une xylose isomérase, et une copie d'un gène exogène codant pour une xylitol déshydrogénase.

2. Souche de levure selon la revendication 1, dans laquelle le gène exogène codant pour une xylose isomérase est un gène issu de *Clostridium, Piromyces, Bactéroïdes, Streptomyces, Haemophilus, Burkholderia, Enterococcus, Thermotoga, Fusobacterium, Geobacillus, Arthrobacter, Ciona, Physcomitrella, Cellvibrio, Chitinophaga, Saccharopolyspora* ou *Salinibacter*, et de préférence est un gène issu de *Clostridium phytofermentans* ou de *Piromyces sp. E2*.

3. Souche de levure selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle le gène exogène codant pour une xylitol déshydrogénase est issu de *Pichia stipitis*.

4. Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 3, choisie parmi *Saccharomyces spp., Schizosaccharomyces spp., Pichia spp., Paffia spp., Kluyveromyces spp., Candida spp., Talaromyces spp., Brettanomyces spp., Pachysolen spp.* et *Debaryomyces spp.*, et de préférence est une souche de *Saccharomyces cerevisiae*.

5. Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 4, dans laquelle au moins une copie, de préférence au moins deux copies, d'un gène codant pour une aldose réductase est délété.

6. Souche de levure selon la revendication 5, dans laquelle le gène délété est *GRE3*.

7. Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 6, dans laquelle un gène endogène codant pour une xylulokinase, de préférence le

gène *XKS1*, est placé sous le contrôle d'un promoteur d'un gène non réprimé par l'anaérobiose ou par la répression catabolique induite par une quelconque source de carbone, et fortement exprimé lors de la fermentation alcoolique.

8. Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle au moins un gène endogène de la partie non oxydative de la voie des pentoses phosphates, de préférence choisi parmi les gènes *RPE1, RKI1, TKL1* et *TAL1*, et de manière particulièrement préférée la totalité de ces gènes, sont placés sous le contrôle d'un promoteur d'un gène non réprimé par l'anaérobiose ou par la répression catabolique induite par une quelconque source de carbone, et fortement exprimé lors de la fermentation alcoolique.

9. Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 8, dans laquelle le promoteur est le promoteur d'un gène codant une enzyme de la glycolyse ou codant une enzyme alcool déshydrogénase, de préférence le promoteur de *ADH1*, *PGK1*, *TDH3*, *PDC2* ou *GAL1/10*.

10. Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 9, qui est une souche aneuploïde ou polyploïde et / ou qui est une souche prototrophe.

11. Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 10, qui comprend au moins deux copies du gène exogène codant pour une xylose isomérase, de préférence au moins trois copies ou au moins quatre copies du gène exogène codant pour une xylose isomérase.

12. Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 11, qui est une souche industrielle présentant une résistance aux inhibiteurs de fermentation issus de l'hydrolyse de la biomasse tels que les produits phénoliques, le furfural ou l'acide acétique.

13. Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 12, apte à produire une concentration d'éthanol d'au moins 16 %, de préférence d'au moins 17% v/v, sur un hydrolysat de céréales, en conditions de saccharification et fermentation simultanée à 32°C.

14. Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 13, qui est la souche de *Saccharomyces cerevisiae* déposée à la CNCM le 23 novembre 2010, sous le N° I-4399.

15. Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 13, qui est la souche de *Saccharomyces cerevisiae* déposée à la CNCM le 23 novembre 2010, sous le N°I-4400.

16. Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 13, qui est la souche de *Saccharomyces cerevisiae* déposée à la CNCM le 14 décembre 2010, sous le N° I-4417.

17. Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 13, qui est la souche de *Saccharomyces cerevisiae* déposée à la CNCM le 5 octobre 2011, sous le N° I-4538.

18. Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 13, qui est une souche dérivée d'une ou plusieurs des souches des revendications 14 à 17.

19. Procédé de préparation d'une souche de levure, comprenant l'introduction dans une souche de levure de départ d'au moins une copie d'un gène exogène codant pour une xylose isomérase, et d'au moins une copie d'un gène exogène codant pour une xylitol déshydrogénase.

20. Procédé selon la revendication 19, comprenant en outre la délétion d'au moins une copie, de préférence au moins deux copies, d'un

gène codant pour une aldose réductase, de préférence le gène *GRE3*, dans la souche de départ.

21. Procédé selon la revendication 19 ou 20, de préparation d'une souche de levure selon l'une des revendications 1 à 18.

22. Procédé selon l'une des revendications 19 à 21, qui est un procédé de préparation d'une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* apte à produire de l'éthanol à partir d'un milieu comportant au moins un pentose et qui comprend les étapes suivantes consistant à

(i) sélectionner une souche de levure Saccharomyces cerevisiae

(ii) intégrer les cassettes d'expression suivantes dans le génome de la levure de l'étape (i),

a. l'association du type cadre ouvert de lecture (ORF) d'un gène codant pour une enzyme apte à transformer le xylose en xylulose sous la dépendance d'un promoteur et d'un terminateur de *Saccharomyces cerevisiae*, la dite cassette étant flanquée en amont et en aval de régions recombinogéniques permettant son intégration ciblée dans le génome,

b. l'association du type cadre ouvert de lecture (ORF) d'un gène codant une enzyme apte à oxyder en une seule étape le xylitol en xylulose sous la dépendance d'un promoteur et d'un terminateur de *Saccharomyces cerevisiae*, la dite cassette étant flanquée en amont et en aval de régions recombinogéniques permettant son intégration ciblée dans le génome,

(iii) induire l'expression d'au moins un gène de chaque étape de la partie non oxydative de la voie des pentoses phosphate ainsi qu'au moins un gène codant la xylulokinase (XKS1) en les plaçant sous la dépendance d'un promoteur d'un gène non réprimé ni par l'anaérobiose ni par la répression catabolique induite par une quelconque source de carbone, et fortement exprimé lors de la fermentation alcoolique, et

(iv) déléter au moins deux copies du cadre ouvert de lecture (ORF) du gène de *Saccharomyces cerevisiae GRE3* codant pour une aldose réductase.

23. Procédé selon la revendication 22, dans lequel ledit au moins un pentose comprend du xylose.

24. Procédé selon la revendication 22 ou 23, caractérisé en ce que le gène codant une enzyme apte à transformer le xylose en xylulose est un gène XI codant pour l'enzyme Xylose Isomérase choisi parmi ceux présents dans les génomes de *Clostridium, Piromyces, Bactéroïdes, Streptomyces, Haemophilus, Burkholderia, Enterococcus, Thermotoga, Fusobacterium, Geobacillus, Arthrobacter, Ciona, Physcomitrella, Cellvibrio, Chitinophaga, Saccharopolyspora, Salinibacter*.

25. Procédé selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que ledit gène XI est choisi parmi un gène de *Clostridium phytofermentans* ou de *Piromyces sp. E2*.

26. Procédé selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que le gène apte à transformer le xylitol en xylulose est un gène de *Pichia stipitis* codant pour l'enzyme xylitol déshydrogénase.

27. Procédé selon l'une des revendications 22 à 25, caractérisé en ce que la souche de levure de l'étape (i) présente une activité xylitol déshydrogénase XDH endogène inférieure à 150mKat/g de protéines.

28. Procédé selon l'une des revendications 22 à 27, caractérisé en ce que la souche de levure de l'étape (i) est sélectionnée parmi les souches industrielles présentant une résistance aux inhibiteurs de fermentation issus de l'hydrolyse de la biomasse tels que les produits phénoliques, le furfural ou l'acide acétique.

29. Procédé selon l'une des revendications 22 à 28, caractérisé en ce que le promoteur de *Saccharomyces cerevisiae de l'étape (iii)* est choisi dans le groupe comprenant les promoteurs des gènes codant les enzymes de la glycolyse et ceux codant pour les enzymes alcool déshydrogénase.

30. Procédé selon l'une des revendications 22 à 29, caractérisé en ce que ledit groupe est constitué par *ADH1*, *PGK1*, *TDH3*, *PDC2* et GAL1/10, de préférence *ADH1*, et en ce que le terminateur de *Saccharomyces cerevisiae* est constitué par *CYC1* ou par le terminateur propre du gène de la voie non oxydative des pentoses phosphates.

31. Procédé selon l'une des revendications 22 à 30, caractérisé en ce que la souche de l'étape (i) est une souche industrielle choisie parmi les souches aptes à produire de fortes concentrations d'éthanol, d'au moins 17% v/v, sur un hydrolysat de céréales, en conditions de Saccharification et fermentation Simultanée (SSF) et à 32°C.

32. Procédé selon l'une des revendications 22 à 31, caractérisé en ce qu'il comprend une étape ultérieure d'évolution dirigée comportant les étapes successives suivantes consistant à soumettre la levure obtenue à

(i) une mutagenèse,

(ii) une croissance en cultures cycliques sous O_2 limité dans un milieu comportant ledit au moins un pentose, et

(iii) une sélection par croissance aérobie sur milieu solide contenant comme seule source de carbone du glycérol,

de sorte à procurer des mutants non-déficients respiratoires de ladite levure qui présentent une croissance en anaérobiose en présence d'un milieu comportant ledit au moins un pentose.

33. Procédé selon l'une des revendications 22 à 32, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une ou plusieurs étapes d'insertion de marqueurs de résistance aux antibiotiques, une ou plusieurs étapes de sélection de

souches selon le critère de leur résistance aux antibiotiques, et une ou plusieurs étapes d'excision des marqueurs de résistance aux antibiotiques.

34. Souche de levure susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une des revendications 19 à 33.

35. Procédé de production d'éthanol, à partir d'un milieu comportant au moins un pentose, par fermentation d'une levure selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 ou 34.

36. Procédé selon la revendication précédente caractérisé en ce que ledit au moins un pentose est le xylose ou un mélange de xylose et arabinose.

37. Procédé selon l'une des revendications 35 à 36, caractérisé en ce que ledit milieu est choisi dans le groupe constitué par, les hydrolysats de lignine, de cellulose, d'hémicellulose, de l'amidon.

38. Procédé selon l'une des revendications 35 à 37, caractérisé en ce que le rendement moyen d'éthanol produit sur xylose consommé est supérieur ou égal à 0,38 g d'éthanol par g de xylose consommé.

Figure 1

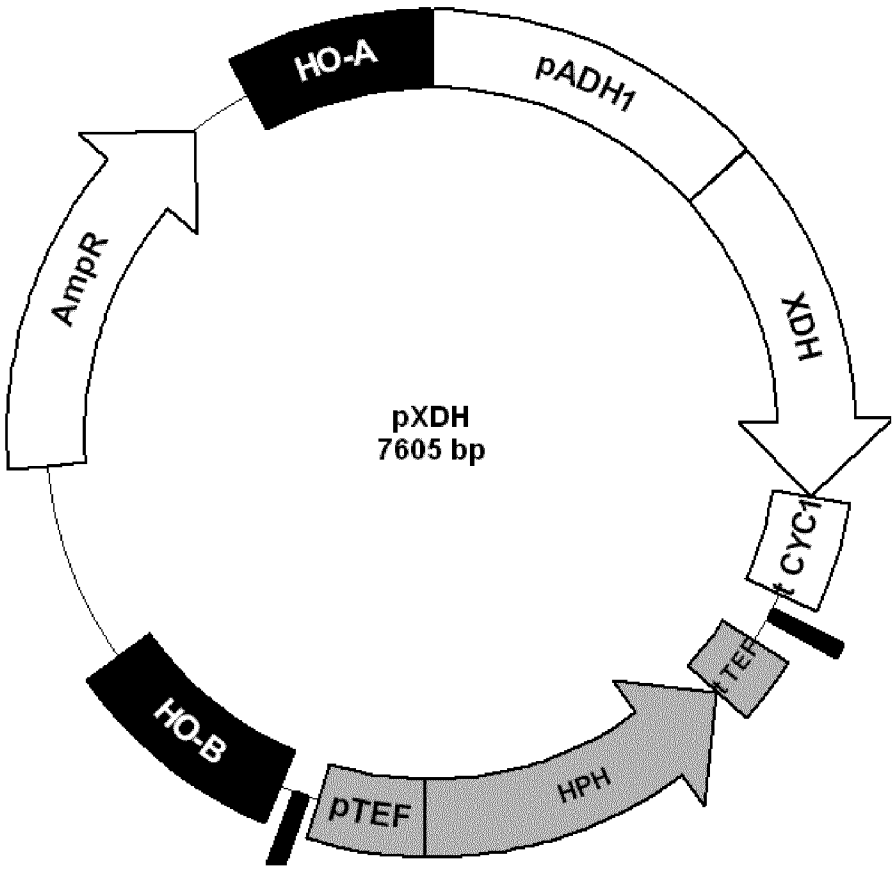


Figure 2

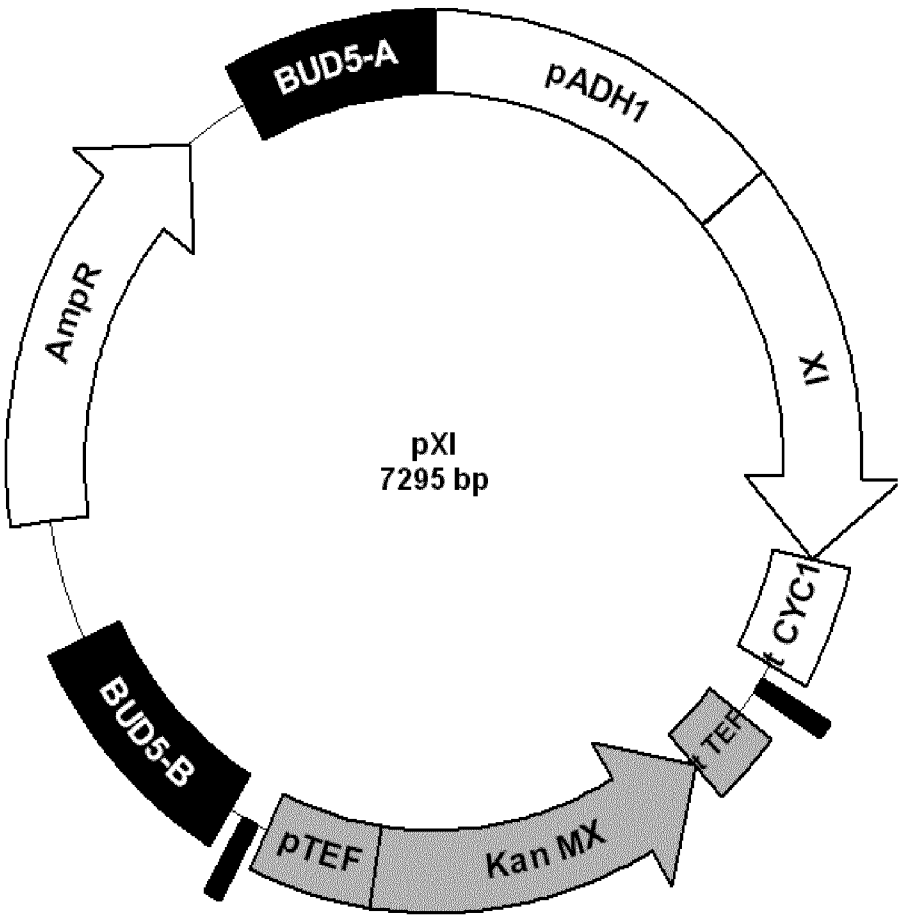


Figure 3

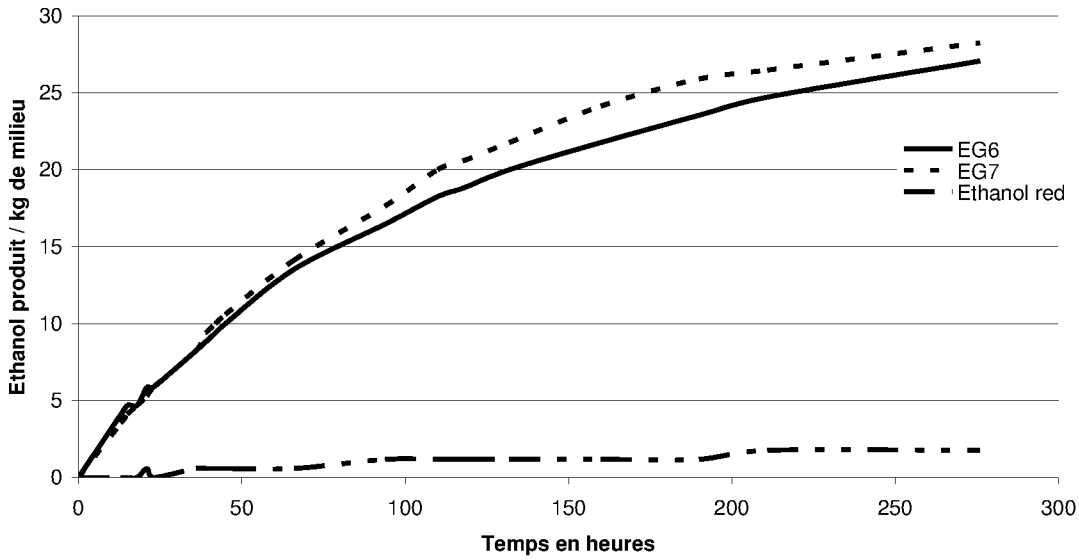

Ethanol produit / kg de milieu
30
25
20
15
10
5
0
0
50
100
150
200
250
300
Temps en heures
EG6
EG7
Ethanol red

Figure 4

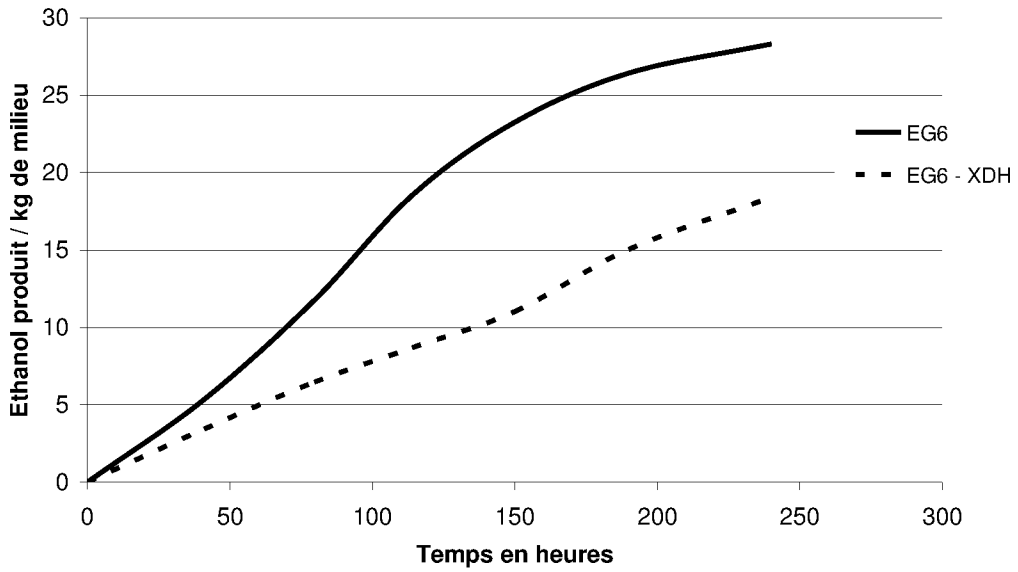
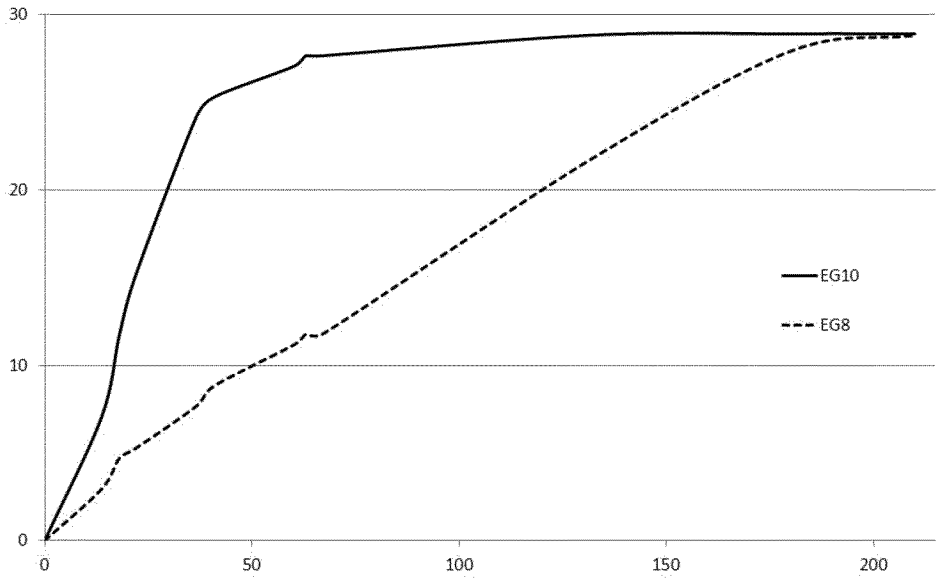

30
25
20
15
10
5
0
Ethanol produit / kg de milieu
0
50
100
150
200
250
300
Temps en heures
EG6
EG6 - XDH

Figure 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/071616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N9/04 C12N9/92
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 practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, 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	US 2010/291648 A1 (ALPER HAL S [US] ET AL) 18 November 2010 (2010-11-18)	1,4,5, 10,12, 18-21, 34-36
Y	claims 1-16	2,3,6-9, 11,37

Y	VAN MARIS A J A ET AL: "Development of Efficient Xylose Fermentation in Saccharomyces cerevisiae: Xylose Isomerase as a Key Component", ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING, BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 108, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 179-204, XP008086128, ISSN: 0724-6145 page 190 pages 192-194	1-12, 18-21, 34-37

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 February 2012	22/02/2012

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/071616

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/109634 A1 (DSM IP ASSETS BV [NL]; KLAASSEN PAUL [NL]; LAAN VAN DER JAN METSKE [NL) 11 September 2009 (2009-09-11) claims 1-34	1-12, 18-21, 34-37
Y	KARHUMAA KAISA ET AL: "Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant Saccharomyces cerevisiae using metabolic engineering", 15 April 2005 (2005-04-15), YEAST, JOHN WILEY & SONS LTD, GB, PAGE(S) 359 - 368, XP002494168, ISSN: 0749-503X abstract	1-12, 18-21, 34-37
Y	US 2009/246844 A1 (KHRAMTSOV NIKOLAI [US] ET AL) 1 October 2009 (2009-10-01) paragraphs [0051], [0054]; claims 31-37; examples 6-10	2-4
A	BETTIGA MAURIZIO ET AL: "Comparing the xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting Saccharomyces cerevisiae strains", BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON UK, vol. 1, no. 1, 23 October 2008 (2008-10-23), page 16, XP021045780, ISSN: 1754-6834, DOI: DOI:10.1186/1754-6834-1-16 figure 1	1-38
A	AKINORI MATSUSHIKA ET AL: "Ethanol production from xylose in engineered Saccharomyces cerevisiae strains: current state and perspectives", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 84, no. 1, 2 July 2009 (2009-07-02), pages 37-53, XP019737770, ISSN: 1432-0614, DOI: DOI:10.1007/S00253-009-2101-X the whole document	1-38

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/071616

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BENGTSSON O ET AL: "Xylose reductase from Pichia stipitis with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant Saccharomyces cerevisiae", BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON UK, vol. 2, 5 May 2009 (2009-05-05), pages 1-10, XP002612933, ISSN: 1754-6834, DOI: DOI:10.1186/1754-6834-2-9 abstract ----- BÄRBEL HAHN-HÄGERDAL ET AL: "Towards industrial pentose-fermenting yeast strains", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 74, no. 5, 9 February 2007 (2007-02-09), pages 937-953, XP019489564, ISSN: 1432-0614, DOI: DOI:10.1007/S00253-006-0827-2 the whole document -----	1-38 1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2011/071616

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010291648 A1	18-11-2010	AU 2007352393 A1	06-11-2008
		CN 101743310 A	16-06-2010
		EP 2099910 A2	16-09-2009
		EP 2407541 A1	18-01-2012
		JP 2010512147 A	22-04-2010
		KR 20090127868 A	14-12-2009
		US 2010291648 A1	18-11-2010
		WO 2008133665 A2	06-11-2008
WO 2009109634 A1	11-09-2009	AU 2009221105 A1	11-09-2009
		CA 2715147 A1	11-09-2009
		CN 101965400 A	02-02-2011
		EA 201001436 A1	28-02-2011
		EP 2250263 A1	17-11-2010
		JP 2011512833 A	28-04-2011
		US 2011189728 A1	04-08-2011
		WO 2009109634 A1	11-09-2009
US 2009246844 A1	01-10-2009	US 2009246844 A1	01-10-2009
		WO 2010062332 A1	03-06-2010

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2011/071616

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12N9/04 C12N9/92
ADD.

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

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

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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 2010/291648 A1 (ALPER HAL S [US] ET AL) 18 novembre 2010 (2010-11-18)	1,4,5, 10,12, 18-21, 34-36
Y	revendications 1-16	2,3,6-9, 11,37

Y	VAN MARIS A J A ET AL: "Development of Efficient Xylose Fermentation in Saccharomyces cerevisiae: Xylose Isomerase as a Key Component", ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING, BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 108, 1 janvier 2007 (2007-01-01), pages 179-204, XP008086128, ISSN: 0724-6145 page 190 pages 192-194	1-12, 18-21, 34-37

	-/--	

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

[X] 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	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
8 février 2012	22/02/2012

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Seroz, Thierry

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	WO 2009/109634 A1 (DSM IP ASSETS BV [NL]; KLAASSEN PAUL [NL]; LAAN VAN DER JAN METSKE [NL]) 11 septembre 2009 (2009-09-11) revendications 1-34	1-12, 18-21, 34-37
Y	KARHUMAA KAISA ET AL: "Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant Saccharomyces cerevisiae using metabolic engineering", 15 avril 2005 (2005-04-15), YEAST, JOHN WILEY & SONS LTD, GB, PAGE(S) 359 - 368, XP002494168, ISSN: 0749-503X abrégé	1-12, 18-21, 34-37
Y	US 2009/246844 A1 (KHRAMTSOV NIKOLAI [US] ET AL) 1 octobre 2009 (2009-10-01) alinéas [0051], [0054]; revendications 31-37; exemples 6-10	2-4
A	BETTIGA MAURIZIO ET AL: "Comparing the xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting Saccharomyces cerevisiae strains", BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON UK, vol. 1, no. 1, 23 octobre 2008 (2008-10-23), page 16, XP021045780, ISSN: 1754-6834, DOI: DOI:10.1186/1754-6834-1-16 figure 1	1-38
A	AKINORI MATSUSHIKA ET AL: "Ethanol production from xylose in engineered Saccharomyces cerevisiae strains: current state and perspectives", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 84, no. 1, 2 juillet 2009 (2009-07-02), pages 37-53, XP019737770, ISSN: 1432-0614, DOI: DOI:10.1007/S00253-009-2101-X le document en entier	1-38

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2011/071616

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BENGTSSON O ET AL: "Xylose reductase from Pichia stipitis with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant Saccharomyces cerevisiae", BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON UK, vol. 2, 5 mai 2009 (2009-05-05), pages 1-10, XP002612933, ISSN: 1754-6834, DOI: DOI:10.1186/1754-6834-2-9 abrégé ----- BÄRBEL HAHN-HÄGERDAL ET AL: "Towards industrial pentose-fermenting yeast strains", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 74, no. 5, 9 février 2007 (2007-02-09), pages 937-953, XP019489564, ISSN: 1432-0614, DOI: DOI:10.1007/S00253-006-0827-2 le document en entier -----	1-38 1-38

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/EP2011/071616

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2010291648 A1	18-11-2010	AU 2007352393 A1	06-11-2008
		CN 101743310 A	16-06-2010
		EP 2099910 A2	16-09-2009
		EP 2407541 A1	18-01-2012
		JP 2010512147 A	22-04-2010
		KR 20090127868 A	14-12-2009
		US 2010291648 A1	18-11-2010
		WO 2008133665 A2	06-11-2008
WO 2009109634 A1	11-09-2009	AU 2009221105 A1	11-09-2009
		CA 2715147 A1	11-09-2009
		CN 101965400 A	02-02-2011
		EA 201001436 A1	28-02-2011
		EP 2250263 A1	17-11-2010
		JP 2011512833 A	28-04-2011
		US 2011189728 A1	04-08-2011
		WO 2009109634 A1	11-09-2009
US 2009246844 A1	01-10-2009	US 2009246844 A1	01-10-2009
		WO 2010062332 A1	03-06-2010