

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 18.12.15.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 23.06.17 Bulletin 17/25.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *RHODIA OPERATIONS Société par
actions simplifiée — FR.*

⑦② Inventeur(s) : LABEAU MARIE PIERRE, GELO
PUJIC Mirjana, MEYRANT Philippe, REMAUD
SIMEON MAGALI, MOULIS CLAIRE et GRIMAUD
Florent.

⑦③ Titulaire(s) : RHODIA OPERATIONS Société par
actions simplifiée.

⑦④ Mandataire(s) : CABINET NONY.

⑤④ **PROCEDE DE BIOPRODUCTION DE DEXTRANE EN MILIEU SALIN.**

⑤⑦ La présente invention a pour objet un procédé de bio-
production de dextrane, comprenant au moins une étape
d'incubation d'une dextrane-saccharase dans un milieu
aqueux comprenant du saccharose et au moins 0,1 % en
poids de NaCl par rapport au poids total dudit milieu aqueux.



La présente invention concerne un procédé de bioproduction de dextrans. Elle concerne également une composition comprenant lesdits dextrans et ses utilisations, en particulier comme fluide d'injection pour la récupération assistée du pétrole.

5 Les dextrans et les dérivés de dextrans ont un nombre d'applications industrielles croissant.

Par exemple, les dextrans de masse molaire faible ou moyenne (allant généralement de 1 à 70 kDa) sont notamment utilisés pour des applications analytiques, par exemple comme supports versatiles de chromatographie, dans le domaine médical, par exemple en tant qu'extenseur
10 du plasma sanguin grâce à leur faible caractère antigénique et leur faible viscosité en solution saline, transporteur de fer ou anticoagulant (après fonctionnalisation), dans la prévention des chocs post-opératoires, dans le traitement des brûlures ou dans la réduction de risques de thrombose ou d'embolies.

Pour leur part, les dextrans de masse molaire plus élevée sont particulièrement
15 intéressants pour leur viscosité élevée.

Sauf indication contraire, on entend par « *masse molaire* » ou « *masses molaires moyennes* », dans la présente invention, la masse molaire moyenne en poids.

Un des modes de préparation de ces dextrans est la voie enzymatique utilisant les glucane-saccharases.

20 Les glucane-saccharases d'origine bactérienne sont des transglucosylases appartenant aux familles 13 et 70 des glycoside-hydrolases. A partir de saccharose, ces enzymes catalysent la synthèse d' α -glucanes formés d'unités glucosyle. Les glucane-saccharases présentent des spécificités de produits différentes, tant au niveau des liaisons osidiques synthétisées (α -1,2 ; α -1,3 ; α -1,4 ou α -1,6), que de l'organisation de ces liaisons au sein des produits formés.

25 Parmi les glucane-saccharases, les dextrane-saccharases produisent du dextrane présentant de manière générale au moins 50 % de liaisons osidiques α -1,6 dans la chaîne principale, et des ramifications en α -1,2, α -1,3 et/ou α -1,4. Le taux de ramifications ainsi que leur arrangement spatial varient suivant l'enzyme productrice.

Il existe en particulier des glucane-saccharases permettant d'accéder à des dextrans
30 de masse molaire très élevée, notamment supérieure à 10^5 kDa.

La souche *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F est un des microorganismes les plus utilisés depuis de nombreuses années pour la production industrielle de dextrans de haute masse molaire, allant de 10^3 à plus de 10^5 kDa. L'enzyme responsable de cette synthèse est la dextrane-saccharase appelée DSR-S. Cet homopolymère de glucose présente 95 % de liaisons

glucosidiques α -1,6 et 5 % de liaisons glucosidiques α -1,3 (Monchois et al., Applied Microbiology and Biotechnology, October 1997, vol 48, Issue 4, 465-472).

Le gène codant pour la DSR-S a pu être cloné chez *Escherichia coli* (Monchois et al., Applied Microbiology and Biotechnology, October 1997, vol 48, Issue 4, 465-472 et Moulis et al, FEMS Microbiology Letters, August 2006, vol 261, Issue 2, 203-210), permettant la construction de différents variants de DSR-S. Notamment, des formes tronquées au niveau des domaines N et C-terminal de DSR-S synthétisent, directement à partir du saccharose, des dextrans de masses molaires contrôlées de $4,1.10^5$ kDa, 40 kDa ou 1 kDa. L'un d'entre eux, dénommé DSR-S Δ 4N et produit sous forme recombinante par *Escherichia coli*, catalyse, à partir du saccharose, la synthèse d'un dextrane de masse moléculaire évaluée à $4,1.10^5$ kDa et constitué de 96 % de liaisons α -1,6 et 4 % de liaisons α -1,3. La solution de dextrane obtenue avec DSR-S Δ 4N présente une viscosité supérieure d'un facteur 10 à 100 selon la contrainte de cisaillement appliquée par rapport à celle obtenue avec l'enzyme DSR-S, et présente un comportement rhéofluidifiant. Le dextrane obtenu avec DSR-S Δ 4N s'avère donc particulièrement intéressant pour des applications dans le domaine des agents texturants et viscosifiants.

Toutefois, la mise en œuvre de ces enzymes requiert le plus souvent des conditions d'incubation très particulières, qui sont rarement adaptées à une mise en œuvre directement sur le site et/ou dans le milieu dans lequel l'utilisation des dextrans est envisagée.

Ainsi, les milieux salins, comme l'eau de mer, sont en effet généralement reconnus comme inhibant l'activité de ces enzymes, en raison de leur teneur en NaCl et en particulier en ions chlorure. Il a en effet été observé que les ions chlorure sont des inhibiteurs de l'activité d'enzymes (voir notamment Degli Agosi *et al.* Biochem. Int. 1992, 26(4), 707-713, et Barber *et al.* Plant Physiol. 1989, 90, 70-64).

Or, l'utilisation de solution aqueuse de dextrans de masse molaire élevée est intéressante comme fluide d'injection pour la récupération assistée du pétrole.

En effet, la récupération assistée du pétrole brut présent dans une formation rocheuse s'effectue généralement en plusieurs étapes. La première phase de production résulte de l'énergie naturelle du pétrole en place qui s'écoule librement. Cette récupération primaire représente en général de 5 % à 20 % de la quantité moyenne de pétrole présente dans la formation rocheuse. Lorsque la pression diminue et que l'extraction devient plus difficile, il devient nécessaire de mettre en œuvre d'autres phases de production, appelées méthodes de récupération secondaire et tertiaire. Ces méthodes consistent à injecter sous pression dans la formation souterraine un fluide d'injection via un puits d'injection. Du fait de ses propriétés d'immiscibilité avec le pétrole, le fluide d'injection pousse le pétrole vers les puits de production. Cette technique est appelée récupération assistée de pétrole (EOR pour *Enhanced Oil Recovery* en anglais) et elle permet généralement de récupérer de

25 % à 75 % du pétrole en présence. Dans la récupération secondaire, on injecte un liquide aqueux tel que de la saumure ou de l'eau douce dans un puits, tandis que dans le cadre de la récupération tertiaire, des additifs ont été mélangés avec le fluide d'injection aqueux préalablement aux étapes d'injection.

5 L'utilisation des dextrans de l'invention est envisagée dans le cadre de la récupération tertiaire, en raison de leur capacité viscosifiante élevée.

L'utilisation des dextrans de l'invention est également envisagée pour les fluides de forage pétrolier, notamment mis en œuvre pour construire les puits, et dans les fluides de fracturation, notamment mis en œuvre pour créer et maintenir ouvertes les fissures dans la formation rocheuse. Dans ce dernier cas, la capacité de ces dextrans à former des gels par simple réticulation avec des réticulants connus dans ce secteur (notamment l'acide borique et ses sels) serait mise à profit. Dans les deux cas, c'est avantagement de l'eau de mer qui est utilisée, voire des saumures.

15 Il serait donc particulièrement intéressant de pouvoir produire ces dextrans *in situ* directement dans le fluide d'injection, qui comprend essentiellement de l'eau de mer sur les plates-formes pétrolières offshore.

Il existe donc un besoin pour produire de manière simple des dextrans, notamment de masse molaire élevée, dans un milieu comprenant du NaCl, comme par exemple l'eau de mer.

20 Ainsi, la présente invention concerne un procédé de bioproduction de dextrans dans un milieu habituellement peu favorable à la bioproduction enzymatique de dextrans.

De manière surprenante, il a en effet été découvert qu'il est possible de produire des dextrans, notamment de masse molaire élevée, dans un milieu salin en utilisant une dextrane-saccharase.

25 De manière encore plus surprenante, il a été observé qu'il est possible de produire, avec une dextrane-saccharase et dans un tel milieu, des dextrans présentant des propriétés rhéologiques sensiblement équivalentes à celles de dextrans obtenus avec la même enzyme mais dans des conditions d'incubation classiques, habituellement reconnues comme étant les seules conditions compatibles avec la production enzymatique de dextrans.

30

Procédé de bioproduction

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention concerne un procédé de bioproduction de dextrane, comprenant au moins une étape d'incubation d'une dextrane-saccharase dans un milieu aqueux comprenant du saccharose et au moins 0,1 % en poids de NaCl par rapport au poids total dudit milieu aqueux.

35

L'étape d'incubation s'effectue dans des conditions, notamment de pH et de température, efficaces pour obtenir ledit dextrane.

Les conditions de mises en œuvre du procédé de l'invention sont décrites ci-après.

5 Le poids total du milieu aqueux intègre le poids en eau pondéré du poids de l'ensemble des composés y étant présents, à savoir notamment le saccharose, la dextrane-saccharase et le NaCl, et éventuellement des composés en solution dans l'eau comme par exemple d'autres sels.

10 Le milieu aqueux peut éventuellement comprendre des particules solides, en suspension ou non, comme du sable.

Le milieu aqueux peut éventuellement comprendre une phase huileuse, dispersée ou non dans le milieu aqueux.

15 Le procédé de l'invention peut être mis en œuvre avec toute dextrane-saccharase connue en soi pour la bioproduction de dextranes, en fonction des propriétés recherchées des dextranes que l'on souhaite produire.

La concentration en dextrane-saccharase dans le milieu aqueux est généralement comprise de 0,1 U/ml à 10 U/ml, de préférence comprise de 0,5 U/ml à 5 U/ml.

20 Une unité enzymatique (U) glucane-saccharase représente la quantité d'enzyme qui libère une micromole de fructose par minute, à 30°C, à partir de 100 g/kg de saccharose dans un tampon 50mM d'acétate de sodium, à pH 5,75.

25 L'activité est déterminée par mesure de la vitesse initiale de production des sucres réducteurs à l'aide de la méthode à l'acide dinitro-salicylique (DNS). Au cours d'une cinétique, 100 µL de milieu réactionnel sont prélevés et la réaction est stoppée par ajout d'un volume équivalent de DNS. Les échantillons sont ensuite chauffés 5 min à 95°C, refroidis dans la glace, dilués au demi dans de l'eau, et l'absorbance est lue à 540 nm. Une gamme étalon de 0 à 2 g.L⁻¹ de fructose permet d'établir le lien entre valeur d'absorbance et concentration en sucres réducteurs.

30 D'une manière générale, la dextrane-saccharase doit être incubée dans un milieu aqueux contenant du saccharose.

La concentration en saccharose dans le milieu aqueux au début de l'incubation est généralement de 50 g/kg à 200 g/kg, de préférence de 50 g/kg à 150 g/kg.

Par « au début de l'incubation », on entend le moment où la dextrane-saccharase vient d'être mise en contact avec le saccharose. Dans la mesure où le saccharose est destiné à être

consommé au cours de l'incubation, la concentration en saccharose dans le milieu diminue au cours de l'incubation.

De manière générale, il est connu que la masse molaire moyenne du dextrane synthétisé sera plus susceptible d'être élevée en utilisant une concentration initiale en saccharose faible.

Le saccharose présent dans le milieu peut y être mis en œuvre sous la forme d'un substrat carboné contenant du saccharose, comme par exemple de la mélasse.

De préférence, le milieu aqueux comprend de 1,0 % à 10,0 %, de préférence de 2,0 % à 5,0 %, préférentiellement de 3,0 % à 4,0 %, en poids de NaCl par rapport au poids total dudit milieu aqueux.

De manière surprenante, comme illustré dans l'exemple 3, la présence de NaCl ne perturbe pas l'activité de la dextrane-saccharase et ne modifie pas sensiblement les propriétés structurales et rhéologiques des dextrans produits.

Ainsi, contre toute attente, l'eau de mer s'avère donc être un milieu d'incubation adapté à la bioproduction de dextrane par une dextrane-saccharase dans les conditions du procédé de l'invention.

Selon un mode de réalisation préféré, le milieu aqueux comprend de l'eau de mer, et comprend éventuellement des particules solides, tel que du sable.

Ce mode de réalisation est particulièrement adapté à la préparation de fluide d'injection pour la récupération assistée du pétrole, notamment sur une plate-forme pétrolière offshore.

L'eau de mer, en fonction de la région du globe terrestre, peut présenter une salinité différente.

Par « salinité », on entend ici la teneur massique en sels dissous par litre d'eau de mer, lesdits sels dissous étant essentiellement le NaCl. L'eau de mer comporte également d'autres sels, comprenant notamment des ions chlorure, sodium, sulfate, magnésium, calcium, potassium, hydrogénocarbonate, carbonate, bromure, ou fluorure.

La salinité de l'eau de mer peut varier d'environ 0,6 g/L pour les eaux de surface de la mer Baltique, à environ 3 g/L pour l'Atlantique Nord ou environ 4 g/L pour la mer Rouge, et aller jusqu'à environ 33 g/L pour la mer Morte.

En général, la salinité de l'eau de mer est comprise de 0,5 g/L à 35 g/L, de préférence de 1 g/L à 20 g/L, préférentiellement de 2 g/L à 10 g/L, voire de 3 g/L à 5 g/L.

En matière d'anions, l'eau de mer comporte habituellement :

- de 5 g/L à 50 g/L, de préférence de 10 g/L à 25 g/L, préférentiellement de 15 g/L à 20 g/L d'ions chlorure,
- de 0,5 g/L à 10 g/L, de préférence de 1 g/L à 5 g/L, préférentiellement de 2 g/L à 3 g/L d'ions sulfate,
- de 0,01 g/L à 1 g/L, de préférence de 0,05 g/L à 0,5 g/L, préférentiellement de 0,1 g/L à 0,2 g/L d'ions hydrogénocarbonate,
- de 0,005 g/L à 1 g/L, de préférence de 0,01 g/L à 0,5 g/L, préférentiellement de 0,05 g/L à 0,1 g/L d'ions bromure,
- de 0,001 g/L à 1 g/L, de préférence de 0,005 g/L à 0,5 g/L, préférentiellement de 0,01 g/L à 0,05 g/L d'ions carbonate, et
- de 0,0001 g/L à 0,01 g/L, de préférence de 0,001 g/L à 0,005 g/L d'ions fluorure.

En matière de cations, l'eau de mer comporte habituellement :

- de 1 g/L à 25 g/L, de préférence de 5 g/L à 20 g/L, préférentiellement de 10 g/L à 15 g/L d'ions sodium,
- de 0,1 g/L à 5 g/L, de préférence de 0,5 g/L à 3 g/L, préférentiellement de 1 g/L à 2 g/L d'ions magnésium,
- de 0,01 g/L à 4 g/L, de préférence de 0,05 g/L à 2 g/L, préférentiellement de 0,1 g/L à 1 g/L d'ions calcium, et
- de 0,01 g/L à 4 g/L, de préférence de 0,05 g/L à 2 g/L, préférentiellement de 0,1 g/L à 1 g/L d'ions potassium.

En général, NaCl représente de 80 % à 85 % des sels dissous dans l'eau de mer.

Avantageusement, le milieu aqueux possède un pH compris de 5,0 à 6,5, de préférence de 5,0 à 6,0, préférentiellement de 5,0 à 5,8, au moins au début de l'incubation,

Par « au début de l'incubation », on entend le moment où la dextrane-saccharase vient d'être mise en contact avec le saccharose. Dans la mesure où le milieu aqueux ne comporte pas nécessairement de système tampon de pH, celui-ci peut évoluer au cours de l'étape d'incubation.

Lorsque le milieu aqueux comprend de l'eau de mer, le pH peut être préalablement ajusté par addition d'acide avant la mise en contact avec la dextrane-saccharase.

Selon un mode de réalisation, notamment adapté à l'utilisation d'eau de mer comme milieu d'incubation, le pH du milieu aqueux n'est toutefois pas contrôlé durant l'incubation.

Ainsi, selon une variante, le milieu aqueux est dépourvu de tout système tampon de pH.

De manière surprenante, il n'est pas donc nécessaire de contrôler le pH au cours de l'incubation pour permettre la bioproduction de dextranes selon le procédé de l'invention.

5 Cette variante présente l'avantage de ne pas nécessiter l'addition de sels en quantité importante et rend donc le procédé de bioproduction de l'invention plus économique et facile à mettre en œuvre directement sur le site dans lequel l'utilisation de dextranes est envisagée, comme par exemple une plate-forme pétrolière offshore en utilisant l'eau de mer comme milieu d'incubation.

10

De préférence, l'étape d'incubation est effectuée à une température de 20°C à 40°C, de préférence de 25°C à 35°C, avantageusement de 30°C à 33°C.

Typiquement, la réaction est conduite à une température d'environ 30°C.

15 L'homme du métier saura adapter la durée de l'incubation, en particulier en fonction de la quantité d'enzyme ajoutée dans le milieu aqueux et en fonction de la température. Typiquement, la l'incubation est conduite pendant une durée comprise de 30 minutes à 20 heures, de préférence comprise de 4 heures à 16 heures, de préférence pendant une durée d'environ 12 heures.

20

Le procédé de l'invention est de préférence mis en œuvre en mettant en contact la dextrane-saccharase, le saccharose, et une solution aqueuse comprenant au moins le NaCl, pour former le milieu aqueux considéré plus haut.

Ce mélange est ensuite porté à une température propice à la bioproduction de dextrane.

25

Après l'étape d'incubation, le procédé de l'invention peut en outre comporter une ou plusieurs étapes ultérieures, de manière à obtenir des hydrolysats de dextranes.

30 On entend ici par « *hydrolysats de dextrane* », un dextrane ayant subi une ou plusieurs étapes de traitement supplémentaires aptes à lui conférer une masse molaire contrôlée inférieure à la masse molaire atteinte selon la présente invention. De telles méthodes sont connues de l'homme du métier. Par exemple, une hydrolyse acide suivie d'un fractionnement, notamment au moyen de solvants organiques, peuvent être appliqués.

Après l'étape d'incubation, le procédé de l'invention peut en outre comporter une ou plusieurs étapes ultérieures, de manière à obtenir des dérivés de dextranes.

On entend ici par « *dérivé de dextrane* », un dextrane ayant subi une ou plusieurs étapes de modification chimiques connues, notamment choisies parmi une éthérification, une estérification ou une réticulation. On peut ainsi obtenir un dérivé de dextrane tel qu'un dextrane réticulé, un ester de dextrane, par exemple un ester inorganique de dextrane (phosphate de dextrane, sulfate de dextrane) ou un ester organique de dextrane, un éther de dextrane, par exemple un éther de dextrane non-ionique (dextrane alkylé, éther d'hydroxyalkyle ou éther hydroxyalkyle aryle de dextrane, éther de dextrane poly(éthylène-glycol)-alkyle) ou un éther de dextrane ionique (dextrane sulfopropylé, dextrane carboxyméthylé, dextrane 2-(Diéthylamino)éthyl). De telles techniques de modification chimiques, ainsi que les applications pour lesquelles les dextrans ainsi obtenus sont adaptés, sont bien connues de l'homme du métier. On peut par exemple se référer au document Heinze et al (Adv Polym Sci (2006) 205: 199–291) et à la thèse de Ndegwa Henry Maina (Structure and macromolecular properties of Weissella confusa and Leuconostoc citreum dextrans with a potential application in sourdough, Ndegwa Henry Maina, 1st June 2012, University of Helsinki, Department of Food and Environmental Sciences, Chemistry and Biochemistry Division).

DSR-OK

Selon un mode de réalisation particulier, le procédé de bioproduction de l'invention met en œuvre une nouvelle dextrane-saccharase, appelée DSR-OK, permettant de synthétiser des dextrans aux propriétés structurales et rhéologiques spécifiques, particulièrement adaptées à la récupération assistée du pétrole, et ce même lorsqu'ils sont produits dans un milieu aqueux salin conforme à l'invention.

DSR-OK est une dextrane-saccharase très spécifique de la polymérisation par liaisons osidiques de type α -1,6, et est une excellente polymérase.

La dextrane-saccharase DSR-OK est composée de 1484 acides aminés, possédant la triade catalytique DED et les 4 motifs conservés décrits habituellement chez les enzymes de la famille 70 des glycoside-hydrolases. Les motifs protéiques conservés du cœur catalytique (I à IV) ont ainsi été identifiés de la position 936 à la position 942 pour le motif I, de la position 458 à la position 468 pour le motif II, de la position 495 à la position 505 pour le motif III et de la position 568 à la position 582 pour le motif IV. En comparaison avec la séquence protéique de la glucane-saccharase GTF-180, les cinq domaines structuraux classiquement décrits pour les glucane-saccharases (A, B, C, IV et V) (5) peuvent être identifiés dans la structure primaire de DSR-OK (Figure 1).

En outre, DSR-OK a une température optimale de fonctionnement d'environ 30°C et un pH optimal d'environ 5,75. A 30°C, cette dextrane-saccharase est stable et robuste, son temps

de demi-vie étant d'environ 111 h lors d'une caractérisation en milieu brut, *i.e.* non purifié. Cette propriété est particulièrement intéressante et rare chez les glucane-saccharases. Ainsi, en comparaison, DSR-S Δ 4N, autre glucane-saccharase recombinante, présente un temps de demi-vie de seulement 24h dans les mêmes conditions.

5 Par ailleurs, DSR-OK suit un mécanisme Michaelien, avec une inhibition par excès de substrat, et est un catalyseur très performant en comparaison à d'autres dextrane-saccharases similaires. Par exemple, DSR-OK a une constante d'affinité, K_m , de 8.99 mM et une constante catalytique, K_{cat} , de 550 s^{-1} . L'enzyme a donc une bonne affinité pour le substrat (K_m), du même ordre de grandeur que la plupart des dextrane-saccharases caractérisées, et présente une constante catalytique (k_{cat}) excellente, rarement observée chez les glucane-saccharases.

10 L'enzyme DSR-OK est donc extrêmement efficace pour catalyser des réactions de polymérisation à partir de saccharose.

Les variants conservateurs de fonction peuvent également être mis en œuvre dans le procédé de l'invention.

15 On appelle « *variant conservateur de fonction* », un variant dans lequel un (ou plusieurs) résidu d'acide aminé donné dans une protéine a été modifié sans pour autant altérer la conformation globale et l'activité enzymatique de dextrane-saccharase permettant de synthétiser des dextrans conformes à l'invention. Typiquement, la modification peut concerner des parties non sensibles de l'enzyme, et ne concerne notamment pas la triade catalytique.

20 Typiquement, un tel variant conservateur de fonction est une dextrane-saccharase dont la séquence d'acides aminés a au moins 80 %, de préférence 85 %, de préférence encore 90 %, de préférence encore 95 %, de préférence encore 98 % d'identité sur les positions allant de 359 à 1038 sur la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1, ce qui correspond aux domaines A+B+C de l'enzyme, à condition que l'activité enzymatique de dextrane-saccharase, permettant de synthétiser des dextrans conformes à l'invention, soit maintenue.

25 Une dextrane-saccharase adaptée à la mise en œuvre de l'invention peut donc aussi bien être l'enzyme de séquence SEQ ID NO : 1, telle que précédemment définie, qu'un variant de l'enzyme dextrane-saccharase de séquence SEQ ID NO : 1, à condition que ce variant soit conservateur de fonction de l'enzyme.

30 L'activité enzymatique d'un variant de dextrane-saccharase peut être testée selon des techniques connues de l'homme du métier, par exemple par la méthode à l'acide dinitrosalicylique (DNS) de Sumner et Howell (Sumner & Howell, Journal of biological chemistry, 1935, vol 108, Issue 51) ou par analyse HPLC.

35 Bien entendu, la dextrane-saccharase, de préférence une dextrane-saccharase DSR-OK telle que précédemment décrite ou un variant conservateur de fonction, peut être exprimée à partir

d'un vecteur d'expression approprié contenant la séquence nucléique adéquate et qui sera alors introduit dans une cellule hôte procaryote ou eucaryote adéquat.

Le gène *dsrok* a été identifié au sein du génome d'*Oenococcus kitaharae* DSM 17330 (disponible dans la base de données NCBI sous le numéro de référence NZ_CM001398) par blast
 5 nucléotidique contre une base de données constituée de séquences nucléotidiques de glucane-saccharases répertoriées dans la famille des glycoside-hydrolases 70 selon CAZY (Carbohydrate Active enZYme database, www.cazy.org/GH70_all.html). Il a été traduit en séquence protéique grâce au logiciel disponible en ligne, Transeq d'EMBOSS (www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/). L'absence de peptide signal a été prédite par le logiciel
 10 SignalP server 4.1 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/). Des alignements protéiques multiples (avec le logiciel d'alignement global, ClustalW2, disponible en ligne, www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) avec d'autres glucane-saccharases caractérisées ont permis d'identifier les motifs conservés du cœur catalytique de DSR-OK, et de découper l'enzyme en différents domaines protéiques (A, B, C, IV et V).

15 La séquence protéique de l'enzyme DSR-OK est la séquence 1, dite SEQ ID NO : 1, telle que décrite ci-après :

```
mmatgslnltaqaddlnqegtaaqsvspstaaanqsessaqsteqsatqaatdgeastvstavtti
tphyvqqagkwlymgsgdgvkpgqtidgnlqffdeggikgkgsfetvdgssyyfdsgsgnavtgf
kiinnndlhyfeedgketvnnnyatdkqgnifyfdengqmatgvktiaggqsyyfdqdgkmrkgygsvf
20 dnqvlyfdkttgalantnvssikegltaqnddftahnavystksesftnidgyltaeawyrpadil
engtdwraseradefrpilttwvdpkqtevnynymktqgfitndqdfklssddqlllnhaaqsqvge
iekkisqqgstdwlktllqtfinqqpswngegedpgsdhlgqgaltfvnspltpdsnsnfrllnrt
ptnqtgtpqydtaslggfellandvdsnnpvvaeqlnwlyyllnfgsitaddpnanfdgirid
avdnvdadllqiaaayfkdaflksqsgndqtnqhlsliledwshndpeymkaaggypltdmddymhtql
25 iwsltkpdnirgtmqrfmdyylvnrandstnneavanysfvrahdsevtviaqiisdlypnsgsg
lipttdqlqaafevynadmksdvkkytqynipsayamlltnkdtvprvygdmtdgdymanksp
yfaistllkarvkyaaggqsmavdkndiltsvrfqgnamlasdsqdnqtrqegigvivsnshlk
laendqvvlhmgaaahknqafraallltiesglenfddtlqapvkytdangdliftaaelagylnpev
sgylsawvpvgaadnqdartaadsatstdgnvfhsnaaldsnvifegfsnfqsiptaeqhddftnv
30 kiaenaglfkdwgitsfqlapqyrsstdstfldsiinqgyaftdrydlgfdtpkygdvddlraai
kalhanniqvmadwvdpdqiynlqnpeiitvnrtdsyggpiagsdlqndlylaytngggqyqtkfgg
afleklqqlypdlftktqistgqtdpsqkitewsakyfngsniqgrgayyvldrsgtdqyfkvis
ndeneafpkqltnqpgetgfsqddqgiiffstsgyqaknafvqgddgnyyyfdntghmvtgppqi
ngrhyllffpngveaqnvfvqndrgetyyydqrgrqvanqyvtdtngnsfrfdengimlanqlaqvd
35 ghwqffkssgvqakdafilgsdglryfesngnmavnefkgsengryyyfgadgqavsglqting
rqlyfddhggqmkdafytnqsggrfyfnaltgdlvkgnfiytsasssftpdndssdsyqgdshlwy
yadsqqqivtgftqtinghlqyfddisgqmitnrfmrradgnwiyldegeavrgmrvingltnyfr
ddftqvkdgfaqdpnsgerhyfngtngamvtndyfspdqihwyyaddsgqpvtgftikgqvqyfd
qdgiqlkqgsgtdpvtkqtyyfdkfgngqil.
```

Un vecteur d'expression est typiquement un plasmide, un cosmide, un épisome, un chromosome artificiel, un phage ou un vecteur viral.

Typiquement, l'expression des acides nucléiques de la présente invention peut être réalisée dans des cellules hôtes procaryotes ou eucaryotes. Comme exemple non limitatifs de
5 souches de cellule hôte procaryotes, on peut citer des souches telles que *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* ou des souches du genre *Pseudomonas*, *Streptomyces* et *Staphylococcus*. Comme exemple non limitatifs de souches de cellules hôtes eucaryotes, on peut citer des souches telles que des parasites *Apicomplexan* (*Plasmodia*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidia*) *Leishmania* ou *Trypanosoma*, ou des cellules de levure telles que *Saccharomyces* comme
10 *Saccharomyces cerevisiae* ou *pombe*, *Pichia pastoris* etc.

De manière préférentielle, des cellules hôtes procaryotes sont utilisées. Selon un mode de réalisation avantageux, les cellules utilisées pour l'expression des acides nucléiques de la présente invention sont *Escherichia coli* et de manière encore préférentielle, les souches sont choisies parmi TOP10, BL21AI, BL21 Star DE3, Arctic Express DE3.

De manière avantageuse, la dextrane-saccharase peut comprendre en outre, à l'extrémité N-terminale, une séquence signal. Cette séquence signal peut être une des séquences signal connues de l'homme du métier, notamment afin que, lorsque la protéine est synthétisée dans une cellule hôte, la synthèse de dextrane puisse être effectuée de manière extracellulaire. En effet, la dextrane-saccharase DSR-OK ne possède pas de peptide signal. La présence d'un peptide signal
15 adapté permet ainsi la synthèse de dextrane de manière extracellulaire. De plus, des outils génétiques sont de plus en plus développés pour l'expression hétérologue chez des microorganismes GRAS (Generally Recognized As Safe) du genre *Bacillus* et *Lactococcus*. Ainsi, il existe à l'heure actuelle, plusieurs systèmes connus d'excrétion de protéines recombinantes chez ces bactéries, pouvant être utilisées dans le cas présent par l'homme du métier.

Comme mentionné à l'Exemple 1, la production recombinante de dextrane-saccharase chez *Escherichia coli* utilisant les conditions décrites dans l'Exemple 1 atteint environ 30 000 Unités d'activité enzymatique par litre de culture, ce qui permet son utilisation à faible coût dans des procédés de synthèse de dextrans.

Une dextrane-saccharase compatible à la mise en œuvre de l'invention peut ainsi être
30 préparée par culture de cellules hôtes contenant une séquence d'acides nucléiques codant une dextrane-saccharase, de préférence une dextrane-saccharase DSR-OK telle que précédemment décrite ou un variant conservateur de fonction, dans des conditions permettant l'expression d'une dextrane-saccharase, et par isolement de ladite dextrane-saccharase du milieu de culture selon les techniques connues de l'homme du métier.

De telles dextrane-saccharases peuvent ensuite être purifiées par toute technique de purification connue de l'homme du métier, par exemple par précipitation, chromatographie par échange d'ions, chromatographie d'affinité, chromatographie d'échange hydrophobe, filtration sur gel, chromatographie HPLC en phase inverse, etc. Selon un mode de réalisation préférentiel, la dextrane-saccharase obtenue par culture de cellule hôte est purifiée par chromatographie d'affinité. Elles peuvent également être immobilisées par des techniques connues de l'homme du métier, notamment par exemple par adsorption, formation de liaison covalente entre le support et la protéine, inclusion ou encapsulation.

Selon un autre mode de réalisation, une dextrane-saccharase selon l'invention peut être préparée directement par culture de la souche native *Oenococcus kitaharae*. La souche *Oenococcus kitaharae* ne possède en effet qu'un seul gène de dextrane-saccharase, codant pour DSR-OK.

Ainsi, selon une variante préférée, le procédé de bioproduction de l'invention met en œuvre une dextrane-saccharase ayant pour séquence d'acides aminés la séquence SEQ ID NO : 1, ou au moins 80 %, de préférence 85 %, de préférence encore 90 %, de préférence encore 95 %, de préférence encore 98 % d'identité avec la séquence allant des positions 359 à 1038 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1.

Le procédé de bioproduction selon ce mode de réalisation permet d'accéder à des dextranes de structure avantageuse.

Les dextranes obtenues à partir de cette enzyme DSR-OK sont caractérisés par le fait qu'ils présentent de 95 % à 99 %, de préférence de 97 % à 98 %, de préférence encore de 97,4 % à 97,6 %, de liaisons glucosidiques α -1,6, une masse molaire moyenne en poids M_w au moins égale à $0,7 \cdot 10^6$ kDa, et un indice de dispersité D_i compris de 1,3 à 3.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, ces dextranes présentent une masse molaire moyenne en poids M_w au moins égale à $1 \cdot 10^6$ kDa. Typiquement, la masse molaire moyenne en poids M_w de ces dextranes est inférieure à $5 \cdot 10^7$ kDa, de préférence inférieure à $1 \cdot 10^7$ kDa, de préférence inférieure à $5 \cdot 10^6$ kDa.

Ces dextranes présentent ainsi l'avantage d'avoir une masse molaire extrêmement élevée et contrôlée, de l'ordre de 10 fois supérieure aux dextranes synthétisés jusqu'à présent.

En outre, ces dextranes présentent un indice de dispersité D_i compris de 1,3 à 3, de préférence compris de 1,5 à 2,5. De préférence encore, l'indice de dispersité D_i est de $1,8 \pm 0,3$. Ainsi, bien que leur masse molaire soit très élevée, ces dextranes présentent également l'avantage d'avoir un indice de dispersité faible. En comparaison, un dextrane commercial de $2 \cdot 10^3$ kDa a un indice de dispersité de 3.49 (Rolland-Sabaté et al, Biomacromolecules, 2008, vol 9, 1719-1730).

Ces dextranes présentent de 95 % à 99 %, de préférence de 97 % à 98 %, de préférence encore de 97,4 % à 97,6 %, de liaisons glucosidiques α -1,6. Les dextranes conformes à ce mode présentent en outre de manière avantageuse de 1 % à 5 %, de préférence de 2 % à 3 %, de préférence encore de 2 % à 2,5 %, de liaisons glucosidiques α -1,3. De manière particulièrement
5 avantageuse, les dextranes conformes à ce mode présentent 97,55 % de liaisons glucosidiques α -1,6 et 2,45 % de liaisons glucosidiques α -1,3. Les dextranes conformes à ce mode sont donc quasi-linéaires.

Composition

10 Selon un autre de ses aspects, la présente invention a pour objet une composition aqueuse comprenant du dextrane et au moins 0,1 % en poids de NaCl par rapport au poids total de ladite composition, ledit dextrane étant tel qu'il présente de 95 % à 99 %, de préférence de 97 % à 98 %, de préférence encore de 97,4 % à 97,6 %, de liaisons glucosidiques α -1,6, une masse molaire moyenne en poids M_w au moins égale à $0,7 \cdot 10^6$ kDa, et un indice de dispersité D_i compris de 1,3 à
15 3.

Cette composition peut être obtenue en mettant en œuvre le procédé de l'invention décrit ci-dessus.

Selon une variante, cette composition est directement issue de la mise en œuvre du procédé de l'invention décrit ci-dessus et peut ainsi correspondre au milieu aqueux directement
20 obtenu à l'issue de la mise en œuvre dudit procédé.

Selon une autre variante, cette composition est obtenue à partir du milieu aqueux directement obtenu à l'issue de la mise en œuvre dudit procédé, auquel on peut rajouter d'autres actifs.

En particulier, cette composition peut être obtenue en mettant en œuvre le procédé de
25 l'invention avec la dextrane-saccharase DSR-OK décrite ci-dessus, ayant pour séquence d'acides aminés la séquence SEQ ID NO : 1, ou un variant conservateur de fonction dont la séquence d'acides aminés comprend au moins 80 %, de préférence 85 %, de préférence encore 90 %, de préférence encore 95 %, de préférence encore 98 % d'identité avec la séquence allant des positions 359 à 1038 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1.

30 De préférence, cette composition est obtenue en mettant en œuvre le procédé de l'invention avec un milieu aqueux comprenant de l'eau de mer.

Application

Les caractéristiques structurales particulières des dextranes de la composition de
35 l'invention leur confèrent des propriétés physico-chimiques particulièrement intéressantes,

permettant leur utilisation dans de nombreuses applications, et notamment dans l'industrie pétrolière.

En ce qui concerne les propriétés rhéologiques, ces dextranes ont une viscosité dynamique élevée pour de faibles vitesses de cisaillement et présentent un comportement de type rhéofluidifiant ou pseudo-plastique, leur viscosité dynamique diminuant avec l'augmentation du gradient de vitesse (ou vitesse de cisaillement).

Par ailleurs, la viscosité de ces dextranes est peu affectée par des contraintes de cisaillement constantes de longue durée, leur permettant d'être adaptés à des procédés industriels pour lesquels une agitation permanente est nécessaire.

En outre, ces dextranes présentent un seuil d'écoulement relativement élevé, en particulier compris de 25 à 40 Pa selon la quantité initiale de saccharose présente dans le milieu réactionnel.

Ces dextranes ont un comportement de type gel faible. Ceci est caractérisé par des mesures de rhéologie en conditions dynamiques, avec détection des modules élastique ou module de conservation G' et le module visqueux ou module de perte G'' . Pour un gel, G' est supérieur à G'' sur la gamme de fréquence étudiée.

Enfin, ces dextranes présentent des températures de transition vitreuse de 95°C pour un teneur en eau de 6,6 %, et de 25°C pour une teneur en eau de 12,9 %. En d'autres termes, pour une teneur en eau d'environ 13 %, ces dextranes présentent un état caoutchouteux, souple à des températures supérieures à 25°C environ et sont considérés comme « cassant » en dessous de 25°C environ.

Au regard de ces propriétés, la composition de l'invention est particulièrement adaptée à une utilisation comme fluide de forage, fluide de fracturation ou fluide d'injection pour la récupération assistée du pétrole.

Ainsi, comme illustré dans les exemples, les dextranes de la composition de l'invention présentent en effet un comportement rhéofluidifiant, avec une viscosité stable dans le temps lors de contraintes de cisaillement constantes de longue durée, et un seuil d'écoulement relativement élevé (de l'ordre de 30 Pa).

Figures

Figure 1 : Représentation schématique de la structure primaire de DSR-OK (basée sur l'alignement protéique avec l'enzyme GFT180 de *Lactobacillus reuteri* 180). Cinq domaines sont distincts : domaine V en rouge, domaine IV en jaune, domaine B en vert, domaine A en bleu et
5 domaine C en violet. La triade catalytique est indiquée par les lettres blanches « D », « E » et « D ».

Figure 2 : Spectre obtenu par RMN du proton sur le dextrane synthétisé par DSR-OK recombinante. Les flèches correspondent aux liaisons α -1,3 et α -1,6.

Figure 3 : Profil d'élution obtenu par AF4-MALLS (Asymmetric Flow-Field-Flow-Fractionation - Multi-Angle Laser Light Scattering) (D1 = réponse réfractométrique, D1-DL =
10 diffusion de lumière) et distribution en masse molaire du dextrane produit par préparation de DSR-OK recombinante (D1 Mw).

Figure 4 : Représentation du rayon de giration (en nm) en fonction de la masse molaire pour différents dextranes : gcn1 produit par un mutant de DSR-S Δ 4N, le dextrane produit par DSR-OK
15 et un dextrane commercial T2000 (Pharmacosmos) de $2 \cdot 10^3$ kDa.

Figure 5 : Propriétés rhéologiques des dextranes produits par la dextrane-saccharase DSR-OK : viscosité (5A) et seuil d'écoulement (5B) mesuré en milieu tampon sodium acétate (+) ; dans
de l'eau de mer Méditerranée (Δ) ; dans de l'eau de l'océan Atlantique (O).

EXEMPLES

Exemple 1 – Préparation de la dextrane-saccharase DSR-OK

Le gène *dsrok* a tout d'abord été amplifié par PCR, à partir de l'ADN génomique de la souche *Oenococcus kitaharae* DSM 17330, en utilisant les deux amorces présentées dans le Tableau 1.

Amorce	Séquence (5' à 3')
amorce Forward	CACCATGATGGCGACCGGCTC (SEQ ID NO :2)
amorce Reverse	GAGGATTTGACCGTTTCCAAACTTATCG (SEQ ID NO :3)

Tableau 1

L'addition des 4 bases, CACC, en 5' de l'amorce forward a permis l'insertion correcte du fragment PCR dans le vecteur d'entrée pENTR/D/TOPO (Life Technologies), afin de procéder par la suite à un clonage utilisant la technologie Gateway.

Un clone d'entrée positif (vecteur d'entrée contenant le fragment PCR dans le sens désiré) a été sélectionné et recombiné avec le vecteur de destination pET-53-DEST (Novagen) à l'aide de la LR clonase enzyme mix II (Life technologies). Les clones recombinants positifs ont été sélectionnés et analysés par restriction. L'absence de mutation au sein des plasmides a été confirmée par séquençage (GATC).

Pour la production de l'enzyme recombinante, des cellules d'*Escherichia coli* BL21 star DE3 ont été transformées avec le plasmide pET-53/DSR-OK construit comme indiqué précédemment. 300 µL du mix de transformation ont étéensemencés dans 30 mL de milieu LB (Lysogeny Broth), supplémenté avec 100 µg/mL d'ampicilline, et mis à incuber pendant la nuit à 37°C afin de préparer une préculture.

Des cultures d'1L en milieu ZYM5052 modifié (1 % glycérol, 0 % glucose, 1 % lactose, cf. Studier et al. Prot. Exp. Pur. 2005, 41, 207-234) ont ainsi étéensemencées à une densité optique DO_{600 nm} initiale de 0,05 à partir de la pré-culture de la veille, puis mises à incuber 24 heures à 23°C et 150 rpm. En fin de fermentation, les milieux de culture sont centrifugés (15 min, 6500 rpm, 4°C) et les culots sont concentrés à une DO de 80 nm dans 50 mM de tampon acétate de sodium, pH 5,75.

Afin d'obtenir l'enzyme recombinante (produite par *Escherichia coli* de manière intracellulaire), les cellules sont cassées aux ultrasons selon le protocole suivant : 5 cycles de 20 secondes à 30 % de la puissance maximale de la sonde, à froid, espacés de 4 minutes de repos dans

la glace. Le surnageant de sonication (contenant l'enzyme recombinante soluble) est ensuite récupéré après 30 minutes de centrifugation (10000 rpm, 10°C) et conservé à 4°C.

La production recombinante de dextrane-saccharase chez *Escherichia coli* utilisant les conditions décrites ici atteint environ 30 000 Unités d'activité enzymatique par litre de culture.

5

Exemple 2 – Caractérisation du dextrane produit par la dextrane-saccharase DSR-OK

Les synthèses de dextrane sont réalisées à partir de saccharose (généralement 100 g/kg), à 30°C dans 50 mM de tampon acétate de sodium, pH 5,75 et en utilisant 1 U/mL d'enzyme sur une durée de 15 h. Pour la plupart des analyses, le polymère a été purifié par deux précipitations à l'éthanol 50 %, suivi de deux lavages et d'une re-suspension dans de l'eau ultra-pure avant d'être lyophilisé.

10

Après lyophilisation, 20 mg de dextrane purifié sont dilués dans 0,5 mL d'eau deutérée et analysés par RMN du proton avec le spectromètre Bruker Avance (500 MHz). Les spectres sont ensuite traités et interprétés avec le logiciel TOPSPIN 3.0.

15

Il a ainsi été mis en évidence par les analyses RMN que le produit synthétisé à partir de 100 g/kg de saccharose, à 30°C, pH 5.75, est un polymère d'unités glucosyle liées à 97,6 % ($\pm$ 0.2 %) en α -1,6, et 2,4 % en α -1,3, comme le montre la Figure 2.

20

La masse molaire moyenne en nombre et en poids, et la structure du dextrane synthétisé par DSR-OK, ont été analysées par AFFFF-MALLS (Asymmetric Flow-Field-Flow-Fractionation - Multi-Angle Laser Light Scattering), à partir des milieux de synthèse bruts selon les conditions de production décrites dans l'Exemple 1.

25

Les échantillons ont été dilués 500 fois, dans de l'eau contenant 0,02 % d'azote de sodium et filtrés sur membrane Durapore de 0,45 μ m avant injection (rendement de filtration > 90 %). Le mode opératoire est le même que celui utilisé pour caractériser les dextrans de haute masse molaire synthétisés par des variants de DSR-S Δ 4N (Irague et al, BioMacromolecules, 2012, vol 13, Issue 1, 187-195). Ainsi, les échantillons sont injectés à 0,2 mL/min sur une durée de 300s avec un flux croisé de 1 mL/min. Une fois l'injection terminée, un temps de relaxation de 60 secondes est imposé aux échantillons. L'élution est réalisée sous un flux d'entraînement de 0,84 mL/min, à un flux croisé constant de 0,1 mL/min pendant 3125 secondes, à température ambiante. Les valeurs des masses molaires (M_i) et celles des rayons de giration (R_{Gi}) sont déterminées avec le logiciel ASTRA version 5.3.2.13 (Wyatt Technology).

30

A chaque intervalle de temps (i), la réponse réfractométrique permet de déterminer la concentration C_i . La masse molaire et le rayon de giration sont déterminés par extrapolation de la relation de la diffusion de la lumière à angle nul, à l'aide d'un diagramme de Berry selon :

$$\sqrt{\left(\frac{K_c}{R_\theta}\right)} = \sqrt{\frac{1}{M_i} \left(1 + \frac{16\pi^2 n^2}{3\lambda^2} R_{Gi}^2 \sin^2(\theta/2) \right)}$$

5 où, K est la constante optique, R_θ , le rapport de Rayleigh, λ , la longueur d'onde du faisceau du laser incident, n l'indice de réfraction de la lumière et θ , l'angle d'observation.

Le logiciel ASTRA calcule directement les masses molaires moyennes en poids (M_w) et en nombre (M_n), ainsi que le rayon de giration moyen en z (R_{Gz}) selon les relations suivantes :

$$\begin{aligned} M_n &= \frac{\sum_i c_i}{\sum_i \frac{c_i}{M_i}} \\ M_w &= \frac{\sum_i c_i M_i}{\sum_i c_i} \\ R_{Gz}^2 &= \frac{\sum_i c_i M_i R_{Gi}^2}{\sum_i c_i M_i} \end{aligned}$$

10

Le rapport M_w/M_n représente l'indice de dispersité, D_i .

15 La densité (d_{Gapp}) est calculée à partir de l'équation suivante :

$$d_{Gapp} = \frac{M_w}{\left(\frac{4\pi}{3}\right) \times R_{Gw}^3}$$

où R_{Gw} représente le rayon de giration moyen en poids.

20 Le coefficient hydrodynamique, v_G , est déterminé à partir de la représentation graphique du rayon de giration (R_{Gi}) en fonction de la masse molaire (M_i) et selon l'équation :

$$R_{Gi} = K_G \cdot M_i^{v_G}$$

où K_G est une constante.

La valeur du paramètre de branchement g_M est calculée selon la relation suivante :

$$g_M = \frac{R_{Gw(br)}^2}{R_{Gw(lin)}^2}$$

25

où $R_{Gw(br)}$ et $R_{Gw(lin)}$ représentent les rayons de giration moyen en poids du polymère branché de son équivalent linéaire de même nature chimique et de même masse molaire.

Il a ainsi été mis en évidence par l'analyse des caractéristiques macromoléculaires que le dextrane présente une très haute masse molaire moyenne en poids M_w d'environ $1,01.10^6$ kDa ($\pm 0,3.10^6$ kDa), comme visible à la Figure 3.

La masse molaire moyenne en nombre est également élevée, à savoir $M_n = 5.5.10^5$ kDa ($\pm 1.6.10^5$ kDa).

L'indice de dispersité D_i du dextrane produit par DSR-OK est donc d'environ 1,8, ce qui représente un indice très faible par rapport aux dextranes produits jusqu'à présent.

Par exemple, en comparaison du dextrane produit par la souche historique *L. mesenteroides* NRRL B-512F, et du dextrane produit par l'enzyme recombinante DSR-S $\Delta 4N$, le dextrane produit par la dextrane-saccharase DSR-OK est de taille plus élevée, et est nettement moins polydisperse que le dextrane natif produit par la souche *L. mesenteroides* NRRL B-512F.

Le rayon de giration du polymère est aussi extrêmement élevé, de l'ordre de 370nm (Figure 4). Le coefficient hydrodynamique, soit la pente du graphique représentant le rayon de giration en fonction de la masse molaire (Figure 4) est de 0.48. Cette valeur montre qu'il s'agit d'un polymère quasi-linéaire, très peu branché.

Le Tableau 2 reprend les principales caractéristiques macromoléculaires du dextrane produit par DSR-OK recombinante.

Caractéristique	Valeur
M_w (masse molaire moyenne en poids)	$1.10^6 \text{ kDa} \pm 0.3.10^6 \text{ kDa}$
M_n (masse molaire moyenne en nombre)	$5.5.10^5 \text{ kDa} \pm 1.6.10^5 \text{ kDa}$
$D_i = M_w/M_n$ (indice de dispersité)	1.8 ± 0.3
R_{Gz} (rayon de giration moyen en z)	$370 \text{ nm} \pm 18.5 \text{ nm}$
d_{Gapp} (densité apparente)	$8.2 \text{ g.mol}^{-1}.\text{nm}^3 \pm 2.2 \text{ g.mol}^{-1}.\text{nm}^3$
ν_G (coefficient hydrodynamique)	0.48 ± 0.02
g_M (paramètre de branchement moyen)	0.0158 ± 0.004

Tableau 2

Exemple 3 – Production de dextrane en présence de NaCl

L'activité de la dextrane-saccharase en présence d'eau de mer provenant de mer de Méditerranée ou de l'océan Atlantique (laboratoire SILFIAC) a été mesurée en utilisant la méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNS).

5 Les tests ont été réalisés à 30°C dans des échantillons d'eau de mer, préalablement ajustés à pH 5,2, en utilisant 100 g/kg de saccharose et 0,8 U/ml de DSR-OK.

La concentration en fructose a été déterminée par la méthode DNS en utilisant le fructose comme référence. Une unité (U) de dextrane-saccharase correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la production de 1 μmol de fructose par minute en présence de 100 g/kg de saccharose.

10

Les résultats des tests d'activité de l'enzyme sont rassemblés dans le Tableau 3:

Echantillon	Activité (U/ml)
Mer Méditerranée (ajusté à pH 5,2)	47
Océan Atlantique (ajusté à pH 5,2)	28

Tableau 3

15 Les propriétés rhéologiques des solutions de dextrane obtenues ont été mesurées et comparées à une solution comparative de dextrane, obtenue par production de l'enzyme DSR-OK (0.2 U/ml) dans un tampon sodium acétate 50 mM à pH 5,2.

20 Les propriétés rhéologiques ont été analysées en utilisant un rhéomètre Thermo Scientific™ HAAKE™ MARSTM avec une géométrie cône-plan (diamètre=60 mm ; angle du cône=1° ; cône C60/1° TiL). Les mesures ont été effectuées à 20°C. Une pré-contrainte a été appliquée à l'échantillon pour homogénéisation (500 s⁻¹ pendant 120 secondes). Après 5 minutes de repos, les mesures de viscosité (Pa.s) ont été effectuées à des contraintes allant de 0.1 s⁻¹ à 60 s⁻¹ (Figure 5A). La méthode dite de « *controlled stress ramp* » (CS) a été utilisée pour déterminer le seuil d'écoulement (yield stress) de l'échantillon en traçant la déformation (γ) en fonction de la contrainte appliquée (τ) (Figure 5B).

25

Comme le montre la Figure 5, les courbes de viscosités et les seuils d'écoulement des solutions de dextrans obtenues dans l'eau de mer sont équivalents à ceux de la solution de dextrane comparative, obtenue dans un tampon sodium acétate.

REVENDICATIONS

1. Procédé de bioproduction de dextrane, comprenant au moins une étape d'incubation d'une dextrane-saccharase dans un milieu aqueux comprenant du saccharose et au moins 0,1 % en poids de NaCl par rapport au poids total dudit milieu aqueux.
5
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la dextrane-saccharase a pour séquence d'acides aminés la séquence SEQ ID NO : 1, ou au moins 80 %, de préférence 85 %, de préférence encore 90 %, de préférence encore 95 %, de préférence encore 98 % d'identité avec la séquence allant des positions 359 à 1038 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1.
10
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel le milieu aqueux comprend de 1,0 % à 10,0 %, de préférence de 2,0 % à 5,0 %, préférentiellement de 3,0 % à 4,0 %, en poids de NaCl par rapport au poids total dudit milieu aqueux.
15
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel le milieu aqueux comprend de l'eau de mer, et comprend éventuellement des particules solides, tel que du sable.
20
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel l'incubation est effectuée à une température de 20°C à 40°C, de préférence de 25°C à 35°C, avantageusement de 30°C à 33°C.
25
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel la concentration en saccharose dans le milieu aqueux au début de l'incubation est de 50 g/kg à 200 g/kg, de préférence de 50 g/kg à 150 g/kg.
30
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel le saccharose présent dans le milieu aqueux est sous la forme d'un substrat carboné contenant du saccharose, comme par exemple de la mélasse.
35
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel le pH du milieu aqueux est de 5,0 à 6,5, de préférence de 5,0 à 6,0, préférentiellement de 5,0 à 5,8, au moins au début de l'incubation.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel le pH du milieu aqueux n'est pas contrôlé durant l'incubation.
- 5 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel le milieu aqueux est dépourvu de tout système tampon de pH.
- 10 11. Composition aqueuse comprenant du dextrane et au moins 0,1 % en poids de NaCl par rapport au poids total de ladite composition, ledit dextrane étant tel qu'il présente de 95 % à 99 %, de préférence de 97 % à 98 %, de préférence encore de 97,4 % à 97,6 %, de liaisons glucosidiques α -1,6, une masse molaire moyenne en poids M_w au moins égale à $0,7 \cdot 10^6$ kDa, et un indice de dispersité D_i compris de 1,3 à 3.
12. Composition aqueuse selon la revendication 11, comprenant de l'eau de mer.
- 15 13. Composition aqueuse selon la revendication 11 ou 12, comprenant une dextrane-saccharase, de préférence la dextrane-saccharase telle que définie dans la revendication 2.
- 20 14. Utilisation de la composition aqueuse selon l'une quelconque des revendications 11 à 13 comme fluide de forage, fluide de fracturation ou fluide d'injection pour la récupération assistée du pétrole.

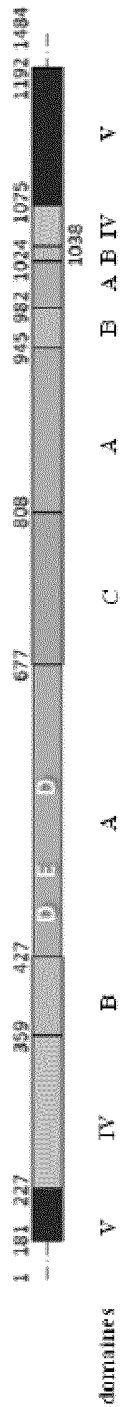
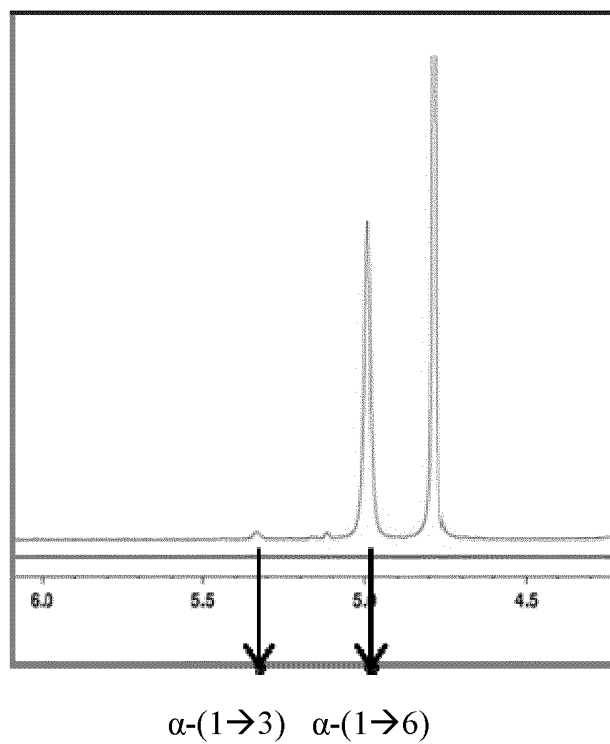


Figure 1

**Figure 2**

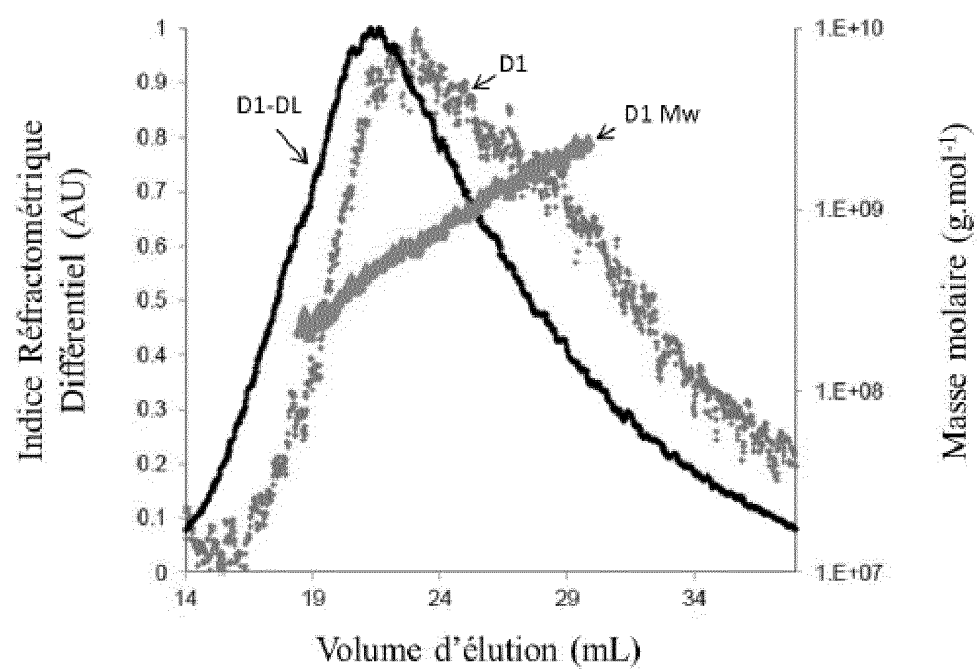
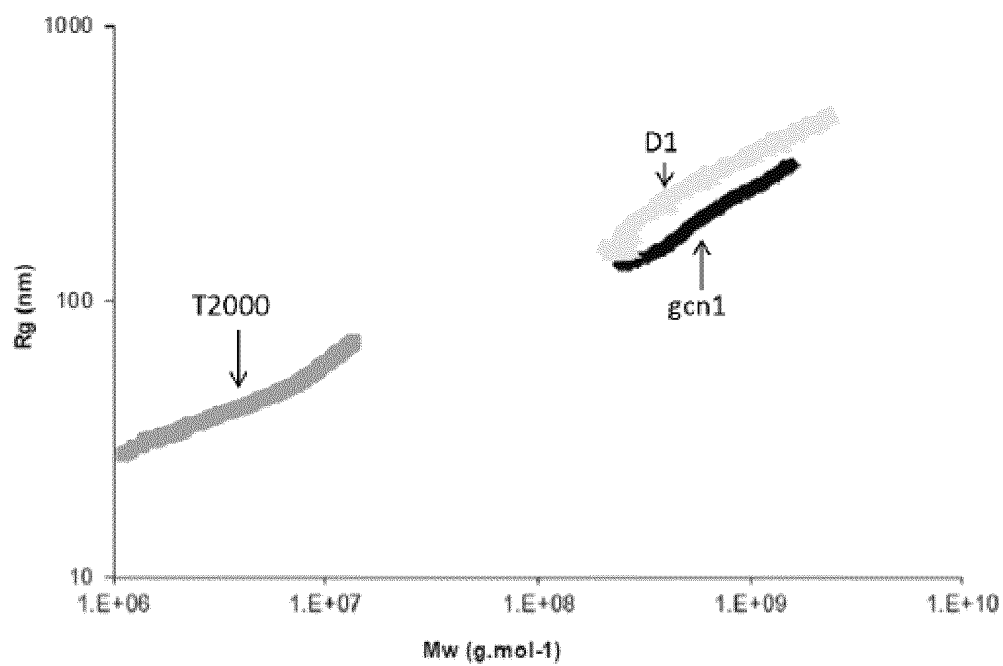


Figure 3

**Figure 4**

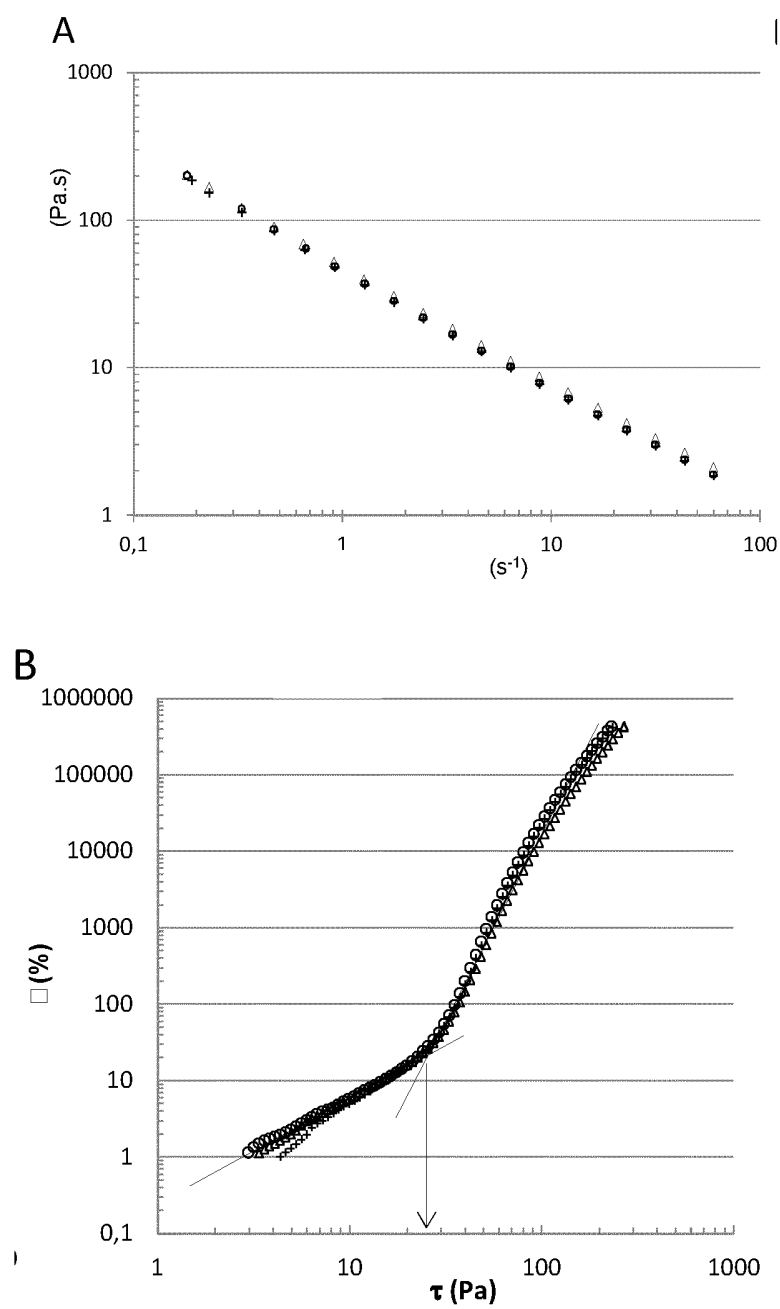


Figure 5

20151216_PR74338_sequence_listing.txt

SEQUENCE LISTING

<110> RHODIA OPERATIONS

<120> Procédé de bioproduction de dextrane en milieu salin

<130> PR74338

<160> 3

<170> BISSAP 1.3

<210> 1

<211> 1484

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> *Oenococcus kitaharae*

<400> 1

```

Met Met Ala Thr Gly Ser Asn Leu Ile Thr Ala Gln Ala Asp Asp Leu
1           5           10           15
Asn Gln Glu Gly Thr Ala Ala Gln Ser Val Ser Pro Ser Thr Ala Ala
          20          25          30
Ala Asn Gln Ser Glu Ser Ser Ala Gln Ser Thr Glu Gln Ser Ala Thr
          35          40          45
Gln Ala Ala Thr Asp Gly Glu Ala Ser Thr Val Ser Thr Ala Val Thr
          50          55          60
Thr Ile Thr Pro His Tyr Val Gln Gln Ala Gly Lys Trp Leu Tyr Met
65          70          75          80
Gly Ser Asp Gly Glu Phe Val Lys Gly Pro Gln Thr Ile Asp Gly Asn
          85          90          95
Leu Gln Phe Phe Asp Glu Gln Gly Ile Gln Ile Lys Gly Ser Phe Glu
          100         105         110
Thr Val Asp Gly Ser Ser Tyr Tyr Phe Asp Ser Gln Ser Gly Asn Ala
          115         120         125
Val Thr Gly Phe Lys Ile Ile Asn Asn Asp Leu His Tyr Phe Glu Glu
          130         135         140
Asp Gly Lys Glu Thr Val Asn Asn Tyr Ala Thr Asp Lys Gln Gly Asn
145         150         155         160
Ile Phe Tyr Phe Asp Glu Asn Gly Gln Met Ala Thr Gly Val Lys Thr
          165         170         175
Ile Gln Gly Gln Ser Tyr Tyr Phe Asp Gln Asp Gly His Met Arg Lys
          180         185         190
Gly Tyr Ser Gly Val Phe Asp Asn Gln Val Leu Tyr Phe Asp Lys Thr
          195         200         205
Thr Gly Ala Leu Ala Asn Thr Asn Val Ser Ser Ile Lys Glu Gly Leu
210         215         220

```

```

Thr Ala Gln Asn Asp Asp Phe Thr Ala His Asn Ala Val Tyr Ser Thr
225                230                235                240
Lys Ser Glu Ser Phe Thr Asn Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala Glu Ala
                245                250                255
Trp Tyr Arg Pro Ala Asp Ile Leu Glu Asn Gly Thr Asp Trp Arg Ala
                260                265                270
Ser Arg Ala Asp Glu Phe Arg Pro Ile Leu Thr Thr Trp Trp Pro Asp
                275                280                285
Lys Gln Thr Glu Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Lys Thr Gln Gly Phe
                290                295                300
Ile Thr Asn Asp Gln Asp Phe Lys Leu Ser Asp Asp Gln Leu Leu Leu
305                310                315                320
Asn His Ala Ala Gln Ser Val Gln Gly Glu Ile Glu Lys Lys Ile Ser
                325                330                335
Gln Gln Gly Ser Thr Asp Trp Leu Lys Thr Leu Leu Gln Thr Phe Ile
                340                345                350
Asn Gln Gln Pro Ser Trp Asn Gly Glu Ser Glu Asp Pro Gly Ser Asp
                355                360                365
His Leu Gln Gly Gly Ala Leu Thr Phe Val Asn Ser Pro Leu Thr Pro
                370                375                380
Asp Ser Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr Asn Gln
385                390                395                400
Thr Gly Thr Pro Gln Tyr Asp Thr Asp Ala Ser Leu Gly Gly Phe Glu
                405                410                415
Leu Leu Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala
                420                425                430
Glu Gln Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Leu Asn Phe Gly Ser Ile Thr
                435                440                445
Ala Asp Asp Pro Asn Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Ile Asp Ala Val
                450                455                460
Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Ala Tyr Phe Lys
465                470                475                480
Asp Ala Phe Lys Ser Gly Ser Asn Asp Gln Thr Thr Asn Gln His Leu
                485                490                495
Ser Ile Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Glu Tyr Met Lys Ala
                500                505                510
Gln Gly Tyr Pro Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Met His Thr Gln Leu
                515                520                525
Ile Trp Ser Leu Thr Lys Pro Asp Asn Ile Arg Gly Thr Met Gln Arg
                530                535                540
Phe Met Asp Tyr Tyr Leu Val Asn Arg Ala Asn Asp Ser Thr Asn Asn
545                550                555                560
Glu Ala Val Ala Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Ser Glu Val
                565                570                575
Gln Thr Val Ile Ala Gln Ile Ile Ser Asp Leu Tyr Pro Asn Ser Gly
                580                585                590
Ser Gly Leu Ile Pro Thr Thr Asp Gln Leu Gln Ala Ala Phe Glu Val
                595                600                605
Tyr Asn Ala Asp Met Lys Ser Asp Val Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn
                610                615                620

```

```

Ile Pro Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro
625                      630                      635                      640
Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Met Tyr Thr Asp Asp Gly Asp Tyr Met Ala
                      645                      650                      655
Asn Lys Ser Pro Tyr Phe Asp Ala Ile Ser Thr Leu Leu Lys Ala Arg
                      660                      665                      670
Val Lys Tyr Ala Ala Gly Gly Gln Ser Met Ala Val Asp Lys Asn Asp
                      675                      680                      685
Ile Leu Thr Ser Val Arg Phe Gly Gln Asn Ala Met Leu Ala Ser Asp
                      690                      695                      700
Ser Gly Asp Asn Gln Thr Arg Gln Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser
705                      710                      715                      720
Asn Asn Ser His Leu Lys Leu Ala Glu Asn Asp Gln Val Val Leu His
                      725                      730                      735
Met Gly Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Phe Arg Ala Leu Leu Leu Thr
                      740                      745                      750
Ile Glu Ser Gly Leu Glu Asn Phe Asp Thr Asp Leu Gln Ala Pro Val
                      755                      760                      765
Lys Tyr Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Ala Ala Glu Leu
                      770                      775                      780
Ala Gly Tyr Leu Asn Pro Glu Val Ser Gly Tyr Leu Ser Ala Trp Val
785                      790                      795                      800
Pro Val Gly Ala Ala Asp Asn Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ala Asp Ser
                      805                      810                      815
Ala Thr Ser Thr Asp Gly Asn Val Phe His Ser Asn Ala Ala Leu Asp
                      820                      825                      830
Ser Asn Val Ile Phe Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ser Ile Pro Thr
                      835                      840                      845
Ala Glu Gln His Asp Asp Phe Thr Asn Val Lys Ile Ala Glu Asn Ala
                      850                      855                      860
Gly Leu Phe Lys Asp Trp Gly Ile Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln
865                      870                      875                      880
Tyr Arg Ser Ser Thr Asp Ser Thr Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn
                      885                      890                      895
Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Phe Asp Thr Pro Thr
                      900                      905                      910
Lys Tyr Gly Asp Val Asp Asp Leu Arg Ala Ala Ile Lys Ala Leu His
                      915                      920                      925
Ala Asn Asn Ile Gln Val Met Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr
                      930                      935                      940
Asn Leu Gln Asn Pro Glu Ile Ile Thr Val Asn Arg Thr Asp Ser Tyr
945                      950                      955                      960
Gly Gln Pro Ile Ala Gly Ser Asp Leu Gln Asn Asp Leu Tyr Leu Ala
                      965                      970                      975
Tyr Thr Asn Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Thr Lys Phe Gly Gly Ala Phe
                      980                      985                      990
Leu Glu Lys Leu Gln Gln Leu Tyr Pro Asp Leu Phe Thr Lys Thr Gln
                      995                      1000                      1005
Ile Ser Thr Gly Gln Thr Ile Asp Pro Ser Gln Lys Ile Thr Glu Trp
1010                      1015                      1020

```

```

Ser Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Arg Gly Ala Tyr
1025                      1030                      1035                      1040
Tyr Val Leu Arg Asp Ser Gly Thr Asp Gln Tyr Phe Lys Val Ile Ser
                      1045                      1050                      1055
Asn Asp Glu Asn Glu Ala Phe Leu Pro Lys Gln Leu Thr Asn Gln Pro
                      1060                      1065                      1070
Gly Glu Thr Gly Phe Ser Gln Asp Asp Gln Gly Ile Ile Phe Phe Ser
                      1075                      1080                      1085
Thr Ser Gly Tyr Gln Ala Lys Asn Ala Phe Val Gln Gly Asp Asp Gly
                      1090                      1095                      1100
Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Asn Thr Gly His Met Val Thr Gly Pro Gln
1105                      1110                      1115                      1120
Thr Ile Asn Gly Arg His Tyr Leu Phe Phe Pro Asn Gly Val Glu Ala
                      1125                      1130                      1135
Gln Asn Val Phe Val Gln Asn Asp Arg Gly Glu Thr Tyr Tyr Tyr Asp
                      1140                      1145                      1150
Gln Arg Gly Arg Gln Val Ala Asn Gln Tyr Val Thr Asp Thr Asn Gly
                      1155                      1160                      1165
Asn Ser Phe Arg Phe Asp Glu Asn Gly Ile Met Leu Ala Asn Gln Leu
                      1170                      1175                      1180
Ala Gln Val Asp Gly His Trp Gln Phe Phe Lys Ser Ser Gly Val Gln
1185                      1190                      1195                      1200
Ala Lys Asp Ala Phe Ile Leu Gly Ser Asp Gly Lys Leu Arg Tyr Phe
                      1205                      1210                      1215
Glu Ser Gly Asn Gly Asn Met Ala Val Asn Glu Phe Lys Gly Ser Glu
                      1220                      1225                      1230
Asn Gly Arg Tyr Tyr Tyr Phe Gly Ala Asp Gly Gln Ala Val Ser Gly
                      1235                      1240                      1245
Leu Gln Thr Ile Asn Gly Arg Gln Leu Tyr Phe Asp Asp His Gly Gln
                      1250                      1255                      1260
Gln Met Lys Asp Ala Phe Tyr Thr Asn Gln Ser Gly Gln Arg Phe Tyr
1265                      1270                      1275                      1280
Phe Asn Ala Leu Thr Gly Asp Leu Val Lys Gly Asn Phe Ile Tyr Thr
                      1285                      1290                      1295
Ser Ala Ser Ser Ser Phe Thr Pro Asp Asn Asp Ser Ser Asp Ser Tyr
                      1300                      1305                      1310
Gln Gly Asp Ser His Leu Trp Tyr Tyr Ala Asp Ser Gln Gly Gln Ile
                      1315                      1320                      1325
Val Thr Gly Phe Gln Thr Ile Asn Gly His Leu Gln Tyr Phe Asp Asp
                      1330                      1335                      1340
Ile Ser Gly Gln Met Ile Thr Asn Arg Phe Met Arg Arg Ala Asp Gly
1345                      1350                      1355                      1360
Asn Trp Ile Tyr Leu Asp Glu Asn Gly Glu Ala Val Arg Gly Met Arg
                      1365                      1370                      1375
Val Ile Asn Gly Leu Thr Asn Tyr Phe Arg Asp Asp Phe Thr Gln Val
                      1380                      1385                      1390
Lys Asp Gly Phe Ala Gln Asp Pro Asn Ser Gly Glu Arg His Tyr Phe
                      1395                      1400                      1405
Asn Gly Thr Asn Gly Ala Met Val Thr Asn Asp Tyr Phe Ser Pro Asp
1410                      1415                      1420

```

Gln	Ile	His	Trp	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Ser	Gly	Gln	Pro	Val	Thr	Gly
1425						1430				1435					1440
Phe	Gln	Thr	Ile	Lys	Gly	Gln	Val	Gln	Tyr	Phe	Asp	Gln	Asp	Gly	Ile
				1445					1450					1455	
Gln	Leu	Lys	Gly	Gly	Ser	Gln	Thr	Asp	Pro	Val	Thr	Lys	Gln	Thr	Tyr
			1460					1465					1470		
Tyr	Phe	Asp	Asp	Lys	Phe	Gly	Asn	Gly	Gln	Ile	Leu				
		1475					1480								

 $\langle 210 \rangle \quad 2$

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> primer

 $\langle 400 \rangle$ 2

caccatgatg gcgaccggct c 21

 $\langle 210 \rangle \quad 3$

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

 $\langle 400 \rangle$ 3

gaggatttga ccgtttccaa acttatcg 28



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 818118
FR 1562788

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	YOICHI TSUMURAYA ET AL: "Dextranucrase, and the Role of Metallic Ions in the Formation of Branch Links in Dextran Synthesis", AGR. BIOL. CHEM., vol. 40, no. 8, 1 janvier 1976 (1976-01-01), pages 1471-1477, XP001319648,	1	C12P19/08 C12N9/46 C08L5/02 C09K8/20 C09K8/588 C09K8/90
Y	* abrégé * * page 1474, colonne de droite, alinéa 1 - page 1476, colonne de droite, dernier alinéa; figures 2,3 *	1,3-12, 14	
Y	ELVIRA KHALIKOVA ET AL: "Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications", MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, vol. 69, 1 juin 2005 (2005-06-01), pages 306-325306, XP55218315, DOI: 10.1128/JMBR.69.2.306-325.2005 * page 311, colonne de gauche, alinéa 3 *	1,3-12, 14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Y	BARUAH RWIVOO ET AL: "Hyper glucansucrase, glucan and oligosaccharide producing novel Weissella cibaria RBA12 isolated from Pummelo (Citrus maxima)", ANNALS OF MICROBIOLOGY, DISTAM, MILAN, IT, vol. 65, no. 4, 21 mars 2015 (2015-03-21), pages 2301-2310, XP035966060, ISSN: 1590-4261, DOI: 10.1007/S13213-015-1072-7 [extrait le 2015-03-21] * abrégé * * page 2304, colonne de gauche, alinéa 4 - page 2307, colonne de droite, alinéa 1; tableau 1 *	1,3-12, 14	C12P C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
13 juillet 2016		Mateo Rosell, A	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 818118
FR 1562788

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	WO 03/008618 A2 (TNO [NL]; VAN GEEL-SCHUTTEN GERRITDINA H [NL]) 30 janvier 2003 (2003-01-30) * page 2, alinéa [0006] - page 3, alinéa [0009] * * page 4, alinéa [0014] - page 8, alinéa [0025]; exemples 6,7; séquences 20,22 *	1,3-12	
Y	"SubName: Full=Glucosyltransferase {ECO:0000313 EMBL:EHN59583.1}", UNIPROT, 22 février 2012 (2012-02-22), XP002735573, [extrait le 2012-02-22] * abrégé *	1,3-12, 14	
Y	A. ENDO: "Oenococcus kitaharae sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue", INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol. 56, no. 10, 1 octobre 2006 (2006-10-01), pages 2345-2348, XP0055167579, ISSN: 1466-5026, DOI: 10.1099/ijs.0.64288-0 * abrégé * * page 2346, colonne de droite, dernier alinéa - page 2348, colonne de gauche, alinéa 2 *	1,3-12, 14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
13 juillet 2016		Mateo Rosell, A	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 818118
FR 1562788

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	US 2015/232785 A1 (PAULLIN JAYME L [US] ET AL) 20 août 2015 (2015-08-20) * abrégé * * page 1, alinéa [0006] - page 2, alinéa [0018]; tableau 1 * * page 16, alinéa [0213] - page 17, alinéa [0213] *	1,3-12, 14	
Y	US 4 561 500 A (THOMPSON BRADLEY G [CA] ET AL) 31 décembre 1985 (1985-12-31) * colonne 2, ligne 51 - colonne 4, ligne 2 * * colonne 4, lignes 30-59 *	1,3-12, 14	
Y	US 4 119 546 A (WERNAU WILLIAM C) 10 octobre 1978 (1978-10-10) * colonne 3, lignes 40-63 * * colonne 6, lignes 32-36 * * colonne 7, ligne 7 - colonne 8, ligne 45 *	1,3-12, 14	
E	WO 2015/193492 A1 (INST NAT DES SCIENCES APPLIQUÉES DE TOULOUSE [FR]; AGRONOMIQUE INST NA) 23 décembre 2015 (2015-12-23) * le document en entier *	1-14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
13 juillet 2016		Mateo Rosell, A	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1562788 FA 818118**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **13-07-2016**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 03008618	A2	30-01-2003	AT	466950 T	15-05-2010
			CA	2454563 A1	30-01-2003
			DK	1409708 T3	16-08-2010
			EP	1409708 A2	21-04-2004
			ES	2345877 T3	05-10-2010
			JP	2005500839 A	13-01-2005
			NZ	530638 A	27-01-2006
			US	2005059633 A1	17-03-2005
			WO	03008618 A2	30-01-2003

US 2015232785	A1	20-08-2015	US	2015232785 A1	20-08-2015
			WO	2015123323 A1	20-08-2015

US 4561500	A	31-12-1985	CA	1196303 A	05-11-1985
			US	4460043 A	17-07-1984
			US	4561500 A	31-12-1985

US 4119546	A	10-10-1978	GR	69782 B	07-07-1982
			US	4119546 A	10-10-1978

WO 2015193492	A1	23-12-2015	FR	3022556 A1	25-12-2015
			WO	2015193492 A1	23-12-2015
