

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫② Date de dépôt : 04.12.19.

⑫③ Priorité :

⑫④ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 11.06.21 Bulletin 21/23.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : IFP Energies nouvelles Etablissement
public à caractère industriel et commercial — FR.

⑦② Inventeur(s) : BIDARD-MICHELOT Frédérique,
JOURDIER Etienne, BEN CHAABANE Fadhel, AOUAM
Thiziri et PRIGENT Sabine.

⑦③ Titulaire(s) : IFP Energies nouvelles Etablissement
public à caractère industriel et commercial.

⑦④ Mandataire(s) : Plasseraud IP.

⑤④ SOUCHE DE CHAMPIGNON AYANT UNE VISCOSITE DIMINUEE.

⑤⑦ L'invention concerne une souche de champignon
ayant une viscosité diminuée, dans laquelle le gène ID
78713 (GEL3) a été invalidé. L'invention concerne égale-
ment les différentes utilisations de cette souche, ainsi que le
procédé de modification génétique.
(pas de figure)



Description

Titre de l'invention : SOUCHE DE CHAMPIGNON AYANT UNE VISCOSITE DIMINUEE

[0001] La présente invention concerne une souche de champignon, notamment filamenteux, ayant une viscosité diminuée, dans laquelle le gène ID78713 (*GEL3*) a été invalidé. L'invention concerne également les différentes utilisations de cette souche, ainsi que le procédé de modification génétique permettant d'obtenir une souche selon l'invention.

Contexte de l'invention

- [0002] Les souches de champignon, notamment filamenteux, tel que le champignon *Trichoderma reesei*, sont aujourd'hui majoritairement utilisées pour la production d'enzymes. Ces enzymes, par exemple les cellulases, sont en effet utilisées pour hydrolyser la biomasse cellulosique ou lignocellulosique en sucres simples. Les enzymes produites par les champignons filamenteux sont donc utiles dans les filières de production de biocarburants de seconde génération ou encore des produits biosourcés issus de sucres provenant de biomasse (ligno)cellulosique.
- [0003] Afin d'améliorer la production de biocarburants de seconde génération ou encore des produits biosourcés, il a ainsi été envisagé d'améliorer la production de cellulases.
- [0004] Par exemple, le brevet EP 448 430 B1 décrit une production industrielle optimisée de cellulases par *Trichoderma reesei*. Cette production est réalisée en protocole fed-batch (alimentation sans soutirage) en utilisant une solution d'alimentation contenant du lactose comme sucre inducteur de la production de cellulases. Ce procédé de fermentation comprend deux étapes : une première étape de croissance du champignon en présence d'un excès de source carbonée et une deuxième étape de production d'enzymes grâce à l'ajout d'un inducteur dans le milieu avec un débit optimisé. Ces étapes sont réalisées en milieu liquide dans des bioréacteurs sous une agitation et en présence d'oxygène car le champignon est aérobic stricte. Un autre exemple de procédé optimisé de production de cellulases est décrit dans le brevet EP 2 744 899 B1.
- [0005] En plus de l'optimisation des procédés de production de cellulases, il a également été envisagé de modifier génétiquement les souches de champignons afin de modifier leur capacité de production. Ainsi, la demande de brevet EP 18 197 010.4 décrit une souche de *Trichoderma reesei* hyperproductrice d'enzymes cellulolytiques.
- [0006] Des procédés de fermentation et souches utiles pour améliorer la production d'enzymes cellulolytiques par des champignons filamenteux, et ce faisant de produits biosourcés mais également des biocarburants de seconde génération, sont donc déjà décrits dans l'art antérieur.
- [0007] Néanmoins, la morphologie des champignons filamenteux industriels a des

conséquences non négligeables sur la conception et la conduite des procédés de fermentation car elle augmente la viscosité du milieu de culture. La viscosité a ainsi un effet négatif sur le transfert en oxygène et limite la concentration maximale en champignon qui peut être visée à la fin de l'étape de croissance (et donc par conséquence, ceci limite la quantité d'enzymes cellulolytiques pouvant être produites).

[0008] Afin de pallier ce problème, il a dans un premier temps été envisagé d'agiter les fermenteurs à des vitesses plus importantes. Cependant, l'augmentation de l'agitation n'est pas une solution idéale car cela engendre une dépense énergétique accrue et une augmentation du cisaillement sur le mycélium, ce qui a également un impact négatif sur la production d'enzymes cellulolytiques.

[0009] Il a également été envisagé d'altérer la viscosité de champignons filamenteux en modifiant leur génome. Ces modifications consistent principalement à invalider des gènes, l'absence des protéines ou enzymes produites par ces gènes entraînant un changement dans le fonctionnement des cellules (Bodie et Pratt 2012; Dodge, Virag et Ward 2012).

[0010] Ainsi, Bodie et Pratt ont envisagé dans la demande PCT/US2012/034379 d'invalider le gène *mpgl* afin d'altérer la viscosité d'une souche de champignon. Des invalidations supplémentaires ont également été envisagées (parmi les gènes *sfb3*, *sebl*, *gas1*, *crz1* ou encore *tps2*).

[0011] De leur côté, Dodge, Virag et Ward ont envisagé dans la demande PCT/US2011/049164 d'invalider le gène *sfb3*.

[0012] Des souches de champignons modifiées génétiquement dans le but d'altérer leur viscosité par rapport à des souches non mutées (*i.e.* les souches parentes) sont donc déjà décrites dans l'art antérieur. Il est cependant à noter que l'art antérieur est muet quant à des valeurs spécifiques d'amélioration de la viscosité par rapport aux souches parentes.

[0013] Par ailleurs, il existe toujours un besoin pour de nouvelles souches moins visqueuses. De plus, il existe toujours un besoin pour de nouvelles souches plus performantes, permettant une meilleure croissance du champignon par rapport aux souches parentes.

Bref exposé de l'invention

[0014] La présente invention repose ainsi sur les résultats inattendus des inventeurs qui ont mis en évidence que l'invalidation du gène ID78713 (*GEL3*), dans une souche de champignon (appartenant notamment à la classe des sordariomycètes), permettait d'obtenir une souche ayant une viscosité drastiquement diminuée par rapport à une souche parente dans laquelle ledit gène ID78713 (*GEL3*) n'a pas été invalidé. Les inventeurs ont en effet mis en évidence que l'invalidation du gène ID78713 (*GEL3*) altérerait la viscosité desdits champignons, notamment les champignons filamenteux. L'utilisation d'une telle souche permet ainsi de réduire la viscosité d'un moût de fer-

mentation à iso concentration de champignons (c'est-à-dire pour une même concentration de champignons dans le moût), ce qui permet ainsi de réduire les coûts des procédés de fermentation des champignons filamenteux. Cela permet en outre d'augmenter la productivité du procédé en obtenant des concentrations en champignon plus élevées. En effet la productivité volumique en enzymes est proportionnelle à la concentration en champignon et à la vitesse spécifique de production d'enzymes. Ainsi, le fait d'avoir une souche moins visqueuse permet de monter à des concentrations en champignon plus élevées et d'augmenter la productivité du procédé en enzymes.

- [0015] Les inventeurs de la présente invention sont ainsi les premiers à avoir mis en évidence que le gène ID78713 (*GEL3*) pouvait influencer le phénotype viscosité des souches de champignons. En effet, le gène ID78713 (*GEL3*) code pour une protéine de la famille 72 des glycosides hydrolases, notamment une 1,3- β -glucanosyltransferase. Le document Mouyna *et al.*, Microbiology (1998), 144,3171-3180, décrit l'obtention d'un mutant d'*Aspergillus fumigatus* (un champignon appartenant à la classe des *Eurotiomycetes*), dans lequel le gène codant pour une 1,3- β -glucanosyltransferase BGT1 est invalidé, néanmoins les auteurs en concluent que la souche variante ne présentent pas de phénotype différent pas rapport à la souche parente.
- [0016] La présente invention concerne donc une souche de champignon dans laquelle le gène ID78713 (*GEL3*) a été invalidé.
- [0017] La présente invention concerne aussi un procédé de modification génétique d'une souche de champignon selon l'invention, comprenant une étape d'invalidation du gène ID78713 (*GEL3*).
- [0018] La présente invention concerne aussi un procédé de production de biomasse de champignon, comprenant une étape de culture d'une souche de champignon selon l'invention, dans un milieu de culture comprenant un substrat approprié.
- [0019] La présente invention concerne également un procédé de production de protéines d'intérêt, notamment des enzymes, comprenant une étape de culture d'une souche de champignon selon l'invention, dans un milieu de culture comprenant un substrat approprié.
- [0020] La présente invention concerne en outre un procédé de production de produits biosourcés à partir de substrats cellulotiques ou lignocellulosiques, comprenant une étape d'utilisation de la souche de champignon selon l'invention, pour produire des enzymes cellulolytiques.
- [0021] La présente invention concerne aussi un procédé de production d'un biocarburant à partir de substrats cellulotiques ou lignocellulosiques, comprenant une étape d'utilisation de la souche de *champignon* selon l'invention, pour produire des enzymes cellulolytiques.

[0022] La présente invention concerne également différentes utilisations de la souche selon l'invention, pour la production de protéines d'intérêt, pour l'hydrolyse de la cellulose ou de la lignocellulose en glucose, pour la production de produits biosourcés à partir de substrats cellulosiques ou lignocellulosiques, ou encore pour la production de bio-carburant.

[0023] Enfin, la présente invention concerne l'utilisation d'une souche de champignon selon l'invention, pour améliorer les propriétés d'une souche compatible, notamment industrielle.

Exposé de l'invention

[0024] Dans un premier aspect, la présente invention concerne ainsi une souche de champignon dans laquelle le gène ID78713 (*GEL3*) a été invalidé. Ainsi, dans la souche selon l'invention, le gène ID78713 (*GEL3*) n'est plus fonctionnel. Cela signifie également que dans la souche selon l'invention le gène ID78713 (*GEL3*) est invalidé. La présente invention concerne ainsi une souche variante de champignon, dans laquelle le gène ID78713 (*GEL3*) a été invalidé.

[0025] Selon l'invention, le terme « souche variante » s'entend d'une souche modifiée génétiquement par rapport à une souche parente. Selon l'invention, le terme « souche parente » s'entend ainsi d'une souche dont est issue ou dérivée la souche variante, et dans laquelle le gène ID78713 (*GEL3*) n'a pas été invalidé. La souche selon l'invention correspond ainsi à une souche variante dérivée d'une souche parente, ladite souche variante possédant une viscosité diminuée par rapport à la souche parente et ladite souche variante comprenant au moins une modification génétique correspondant à l'invalidation du gène ID78713 (*GEL3*).

[0026] L'expression « une viscosité diminuée par rapport à la souche parente » signifie que la souche variante a une viscosité inférieure à celle de la souche parente. L'homme du métier sait que la viscosité de la souche variante selon l'invention et celle de la souche parente doivent être comparées pour une même concentration en champignon dans le moût de fermentation.

[0027] Selon l'invention la viscosité est préférentiellement mesurée par la méthode décrite dans l'Exemple 2, également décrite dans la publication Hardy *et al.*, *Rhéologie*, Vol. 27, 43-48 (2015), ou encore à l'aide des paramètres suivants :

- le mobile (rotor) utilisé est une hélice d'un diamètre de 38 mm, d'une hauteur de 32 mm, d'un pas de 29 mm et avec un ruban de 8 mm de largeur ;
- un godet (stator) de 45 mm de diamètre intérieur ;
- un espace vertical entre le rotor et le stator de 500 µm ; et du protocole suivant :
- remplissage du godet avec 70 mL d'un milieu dont on souhaite mesurer la viscosité ;

- mesures de viscosité par un balayage logarithmique de taux de cisaillements compris entre 4 s^{-1} et 100 s^{-1} , puis de 100 s^{-1} à 4 s^{-1} , à une température de 27°C ;
- optionnellement, réalisation des mesures en duplicate.

[0028] Préférentiellement, la viscosité selon l'invention est mesurée à l'aide d'un rhéomètre AR2000 de TA Instruments, notamment par un balayage logarithmique de taux de cisaillements compris entre 4 et 100 s^{-1} à une température de 27°C , encore plus préférentiellement à l'aide d'un balayage réalisé en un aller-retour (de 4 s^{-1} à 100 s^{-1} puis de 100 s^{-1} à 4 s^{-1}). Selon un mode de réalisation, la souche selon l'invention a une viscosité d'environ 1.5 Pa.s, telle que mesurée à 27°C , à l'aide d'un rhéomètre AR2000 de TA Instruments par balayage logarithmique à un taux de cisaillements de 5 s^{-1} , lorsque la concentration en champignon est d'environ 35 g/L. La « concentration en champignon » s'entend de la concentration dans le milieu dans lequel la viscosité est mesurée. Typiquement le milieu correspond à un moût de fermentation. Selon l'invention le terme « environ » signifie que les valeurs ne doivent pas être comprises comme des valeurs strictes. Ainsi, « environ 1.5 Pa.s » s'entend des valeurs comprises entre 1.45 Pa.s à 1.55 Pa.s, et « environ 35 g/L » s'entend des valeurs comprises entre 34.5 g/L à 35.5 g/L.

[0029] Selon l'invention, et dans un autre mode de réalisation particulier, la souche selon l'invention a une viscosité diminuée d'au moins 50% par rapport à une souche parente. Selon l'invention le terme « au moins 50% » signifie toutes les valeurs comprises entre 50% et 100%, notamment les valeurs de 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% et 100%. Préférentiellement, la souche selon l'invention a une viscosité diminuée d'au moins 65% par rapport à une souche parente. L'homme du métier sait calculer un pourcentage de diminution. Un tel taux de diminution peut par exemple se calculer selon la formule suivante : $((\text{valeur finale} - \text{valeur initiale})/\text{valeur initiale}) \times 100$.

[0030] Le gène *GEL3* (également nommé ID 78713 dans le génome de référence de *Trichoderma reesei*, voir <https://www.uniprot.org/uniprot/G0RL27>) code pour une protéine qui appartient à la famille 72 des glycosides hydrolases. Ces enzymes sont par exemple des β -1,3-glucanosyltransglycosylases qui interviennent dans la biogénèse de la paroi cellulaire chez les champignons. Selon l'invention le terme ID 78713 est préféré au terme *GEL3*.

[0031] Selon l'invention, le gène ID78713 (*GEL3*) est représenté par la SEQ ID NO : 2, mais peut également correspondre à un variant de ce gène ou à un gène orthologue. Préférentiellement, le gène ID78713 (*GEL3*) est uniquement représenté par la SEQ ID NO : 2.

- [0032] Selon l'invention, « un variant de gène ou un gène orthologue » s'entend d'un gène qui code également pour une protéine qui appartient à la famille 72 des glycosides hydrolases. Le variant du gène ID78713 (*GEL3*) ou un gène orthologue du gène ID78713 (*GEL3*) est typiquement représenté par une séquence ayant au moins 80% d'identité avec le gène de SEQ ID NO : 2. Le variant du gène ID78713 (*GEL3*) ou un gène orthologue du gène ID78713 (*GEL3*) correspond ainsi à un gène dérivé de la séquence représentée par SEQ ID NO : 2. Plus particulièrement, le variant du gène ID78713 (*GEL3*) ou un gène orthologue du gène ID78713 (*GEL3*) est représenté par une séquence ayant au moins 90% d'identité avec le gène de SEQ ID NO : 2, notamment au moins 95%, de préférence au moins 98% ou 99%.
- [0033] Le gène ID78713 (*GEL3*) est représenté par la SEQ ID NO : 2, et la protéine codée par le gène ID78713 (*GEL3*) est représentée par la SEQ ID NO : 3. Ainsi, le variant du gène ID78713 (*GEL3*) ou un gène orthologue du gène ID78713 (*GEL3*) code soit pour la protéine de SEQ ID NO : 3, soit pour une séquence ayant au moins 80% d'identité avec ladite SEQ ID NO : 3, notamment au moins 90%, plus particulièrement au moins 95%, 98% ou 99%.
- [0034] Selon l'invention le terme « au moins 80% » signifie toutes les valeurs comprises entre 80% et 100%, notamment les valeurs de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% et 100%. L'homme du métier sait calculer un pourcentage d'identité entre deux séquences. Par exemple, selon l'invention, le pourcentage d'identité d'une séquence donnée par rapport à SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3 s'entend du pourcentage d'identité sur la longueur totale des séquences. Le pourcentage correspond ainsi au nombre de nucléotides/résidus identiques entre cette séquence donnée et SEQ ID NO : 2 ou 3 divisé par le nombre de nucléotides ou résidus dans la plus longue des deux séquences.
- [0035] Ainsi, dans un mode de réalisation, dans ladite souche selon l'invention, le gène ID78713 (*GEL3*) invalidé correspond à un gène représenté par la SEQ ID NO : 2 ou à un gène ayant au moins 80% d'identité avec le gène de SEQ ID NO : 2, notamment au moins 90% et plus particulièrement au moins 95%. Dans un mode de réalisation encore plus préféré, dans ladite souche selon l'invention, le gène ID78713 (*GEL3*) invalidé correspond à un gène représenté par la SEQ ID NO : 2. Selon ce dernier mode de réalisation, la souche selon l'invention comprend ainsi une délétion du gène codant pour la protéine représentée par la SEQ ID NO : 3.
- [0036] Dans un aspect préféré, dans la souche selon l'invention, le gène ID78713 (*GEL3*) a été invalidé par mutagenèse ou par recombinaison homologue. Selon l'invention, l'invalidation consiste en une délétion de tout ou partie du gène ID78713 (*GEL3*). Préférentiellement, dans la souche selon l'invention, le gène ID78713 (*GEL3*) a été invalidé à l'aide d'une cassette d'invalidation. Encore plus préférentiellement, ladite

cassette d'inactivation est représentée par la SEQ ID NO : 1, et est notamment utilisée chez un champignon appartenant à l'espèce *Trichoderma reesei*.

- [0037] La mutagenèse est une technique communément utilisée en génie génétique. Elle vise à introduire volontairement des mutations dans l'ADN afin de créer des gènes génétiquement modifiés. Selon l'invention, la mutagenèse s'entend plus particulièrement de la mutagenèse dirigée. La mutagenèse dirigée permet en effet d'introduire des mutations identifiées dans un gène précis. Pour ce faire, l'ADN d'intérêt (ici le gène ID78713 (*GEL3*)) contenant les mutations est synthétisé puis introduit dans la cellule à muter, typiquement à l'aide d'un vecteur, où le mécanisme de réparation de l'ADN s'occupe de l'intégrer dans le génome.
- [0038] La recombinaison homologue est une technique communément utilisée en génie génétique qui consiste à un échange entre molécules d'ADN, typiquement à l'aide d'un vecteur.
- [0039] Le terme « vecteur » s'entend de toute séquence d'ADN dans laquelle il est possible d'insérer des fragments d'acide nucléique étranger, les vecteurs permettant d'introduire de l'ADN étranger dans une cellule hôte. Des exemples de vecteurs sont les plasmides, les cosmides, les chromosomes artificiels de levures (YAC), les chromosomes artificiels de bactéries (BAC) et les chromosomes artificiels dérivés du bactériophage P1 (PAC), les vecteurs dérivés de virus. Le vecteur selon l'invention permet l'introduction d'une mutation ou d'une délétion.
- [0040] Dans un mode de réalisation préféré, ladite cassette d'inactivation comprend trois fragments d'ADN :
- (1) une région en amont du gène cible,
 - (2) un marqueur de sélection, et
 - (3) une région en aval du gène cible.
- [0041] Dans le cas de la présente invention, le « gène cible » s'entend du gène ID78713 (*GEL3*). Les régions en amont et en aval du gène cible sont deux éléments de recombinaison, un à chaque extrémité du gène, et sont nécessaires pour cibler de façon précise la séquence à invalider.
- [0042] Selon l'invention, la région en amont du gène cible (c'est-à-dire la séquence 5' en amont du gène ID78713 (*GEL3*)) est notamment représentée par la séquence de SEQ ID NO : 10.
- [0043] Selon l'invention, la région en aval du gène cible (c'est-à-dire la séquence 3' en aval du gène ID78713 (*GEL3*)) est notamment représentée par la séquence de SEQ ID NO : 12.
- [0044] L'expression « marqueur de sélection » s'entend d'un gène dont l'expression confère aux cellules qui le contiennent une caractéristique permettant de les sélectionner. L'utilisation d'un marqueur de sélection permet en effet d'identifier les cellules ayant

intégré une modification génétique par rapport à celles qui ne l'ont pas intégrée. Il s'agit par exemple d'un gène de résistance aux antibiotiques, notamment le gène de résistance à l'antibiotique hygromycine *hph*, tel que représenté par la SEQ ID NO : 11.

[0045] Plus précisément, selon l'invention, la cassette d'inactivation est préférentiellement constituée d'un gène de résistance placé sous le contrôle d'un promoteur et d'un terminateur, avec en amont et en aval les régions flanquantes 5' et 3' du gène ID78713 (*GEL3*). Encore plus préférentiellement, selon l'invention, la cassette d'inactivation est constituée d'un gène de résistance à l'antibiotique hygromycine *hph* placé sous le contrôle du promoteur GPDa et du terminateur TRPc (Punt et van den Hondel, 1992) avec en amont et en aval les régions flanquantes 5' et 3' du gène ID78713 (*GEL3*). Selon l'invention, ladite cassette d'inactivation pourra être liée opérationnellement à un promoteur, un terminateur ou toute autre séquence nécessaire à son expression dans une cellule hôte.

[0046] La cassette d'inactivation peut être amplifiée selon les techniques classiques bien connues de l'homme du métier, typiquement par une méthode choisie parmi le clonage classique, la fusion PCR, ou encore le clonage *in vivo* par PCR. Préférentiellement, cette cassette d'inactivation est amplifiée par PCR, notamment à l'aide des séquences représentée par les SEQ ID NO : 4 et SEQ ID NO : 5. La cassette d'inactivation est ensuite introduite par recombinaison dans une souche, notamment de *Trichoderma reesei*, qui n'exprime pas un gène du marqueur de sélection. L'homme du métier peut aisément identifier les gènes de marqueur de sélection pertinents pour la mise en œuvre de l'invention. Après culture, les souches variantes/mutantes ayant incorporé la cassette d'inactivation sont sélectionnées en fonction de l'expression ou non du marqueur de sélection; les clones ayant été transformés exprimant ledit marqueur de sélection. Il s'agit des souches selon l'invention. Préférentiellement, les souches mutantes sont identifiées à l'aide des amorces de SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8 et SEQ ID NO : 9. Ces techniques de recombinaison génétiques sont bien connues de l'homme du métier. Dans un aspect préféré, selon l'invention, le champignon est un champignon filamenteux. Encore plus préférentiellement, le champignon filamenteux est choisi parmi les classes des orbiliomycètes, des pézizomycètes, des dothi-deomycètes, des eurotiomycètes, des lecanoromycètes, des léotiomycètes, des sordariomycètes et des saccharomycètes. De façon avantageuse, le champignon filamenteux selon l'invention appartient à la classe des sordariomycètes, notamment au genre *Trichoderma*, et plus particulièrement à l'espèce *Trichoderma reesei*.

[0047] Lorsque le champignon appartient à l'espèce *Trichoderma reesei*, selon l'invention, la souche parente de *Trichoderma reesei* peut être la souche QM6a (déposée sous le numéro ATCC 13631), ou encore une souche issue de l'isolat naturel QM6a (notamment obtenue par mutagénèse aléatoire ou dirigée), telle que la souche Rut-

C30 (déposée sous le numéro ATCC 56765), la souche déposée sous le numéro CNCM I-5221 (déposée le 03 août 2017 auprès de la CNCM, Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur, située 25 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris cedex 15), la souche NG14 (déposée sous le numéro ATCC 56767) ou encore la souche QM9414 (déposée sous le numéro ATCC 26921). Typiquement, les souches selon l'invention présentent un phénotype de faible viscosité tout en conservant leur capacité à produire des protéines d'intérêt.

- [0048] Dans un deuxième aspect, l'invention concerne également un procédé de modification génétique d'une souche de champignon selon l'invention, telle que mentionné ci-dessus, comprenant une étape d'inactivation du gène ID78713 (*GEL3*). Le procédé de modification génétique d'une souche selon l'invention permet ainsi d'obtenir des souches de champignon moins visqueuses par rapport à la souche de champignon parent. C'est pourquoi la souche selon l'invention peut être considérée comme un variant de la souche de champignon parent. Ainsi, durant sa croissance, la souche de champignon selon l'invention génère une viscosité moins élevée par rapport à la souche parente pour un taux de cisaillement donné, à même concentration en biomasse, et à même température.
- [0049] Préférentiellement, dans ledit procédé de modification génétique selon l'invention, l'étape d'inactivation du gène ID78713 (*GEL3*) est réalisée à l'aide d'une étape de mutagenèse ou de recombinaison homologue. Encore plus préférentiellement, dans ledit procédé de modification génétique selon l'invention, l'étape d'inactivation du gène ID78713 (*GEL3*) est réalisée à l'aide d'une cassette d'inactivation telle que mentionnée ci-dessus, notamment représentée par la SEQ ID NO : 1, chez un champignon appartenant à l'espèce *Trichoderma reesei*.
- [0050] Dans un troisième aspect, la présente invention concerne aussi un procédé de production de biomasse de champignon, comprenant une étape de culture d'une souche de champignon selon l'invention, dans un milieu de culture comprenant un substrat approprié. Cette étape permet ainsi la croissance de la souche de champignon selon l'invention. L'homme du métier connaît les substrats appropriés à la croissance des souches de champignon.
- [0051] Dans un quatrième aspect, la présente invention concerne également un procédé de production de protéines d'intérêt, notamment des enzymes, comprenant une étape de culture d'une souche de champignon selon l'invention, dans un milieu de culture comprenant un substrat approprié. L'invention concerne ainsi l'utilisation d'une souche de champignon selon l'invention, pour la production de protéines d'intérêt.
- [0052] De façon avantageuse, ledit procédé comprend ainsi une phase de croissance d'une souche de champignon selon l'invention, puis une phase de croissance et de production de protéines d'intérêt par ladite souche. Encore plus préférentiellement, ladite phase de

croissance est réalisée en présence d'un substrat de croissance et ladite phase de croissance et de production de protéines d'intérêt est réalisée en présence d'un substrat inducteur. Le substrat de croissance et le substrat inducteur sont de préférence des substrats carbonés.

- [0053] Ainsi, le substrat carboné de croissance est choisi de préférence parmi le lactose, le glucose, le xylose, les résidus obtenus après fermentation éthanolique des sucres monomères des hydrolysats enzymatiques de biomasse cellulosique, et/ou un extrait brut de pentoses hydrosolubles provenant du prétraitement d'une biomasse cellulosique.
- [0054] Le substrat carboné inducteur est ainsi choisi de préférence parmi le lactose, le cellobiose, le sophorose, les résidus obtenus après fermentation éthanolique des sucres monomères des hydrolysats enzymatiques de biomasse cellulosique, et/ou un extrait brut de pentoses hydrosolubles provenant du prétraitement d'une biomasse cellulosique.
- [0055] Selon l'invention, les protéines d'intérêt sont toutes les protéines pouvant être produites par un champignon, de façon naturelle ou bien par modification génétique (par exemple après transformation à l'aide d'un vecteur approprié).
- [0056] De façon avantageuse, les protéines d'intérêt selon l'invention sont des enzymes, notamment des enzymes cellulolytiques telles que des cellulases ou des hémicellulases. De façon préférée, les enzymes sont des cellulases. Selon l'invention, le terme « cellulases » s'entend plus particulièrement des enzymes choisies parmi les endoglucanases, les exoglucanases et les glucosidases, et plus particulièrement la β -glucosidase. Le terme « cellulase » fait plus particulièrement référence à une enzyme adaptée à l'hydrolyse de la cellulose et permettant aux microorganismes (tels que *Trichoderma reesei*) qui les produisent d'utiliser la cellulose comme source de carbone, en hydrolysant ce polymère en sucres simples (glucose). La production de cellulases par une souche selon l'invention, notamment *Trichoderma reesei*, peut être déterminée par toutes techniques usuelles pour l'homme du métier, ou encore par les techniques décrites dans les brevets EP 448 430 B1 ou EP 2 744 899 B1.
- [0057] Une corrélation entre protéines totales sécrétées et cellulases peut être faite car chez *T. reesei*, les exoglucanases (CBHI, CBHII) et les endoglucanases (EGI, EGII) principales peuvent représenter jusqu'à 90% de la quantité totale de protéines sécrétées (voir par exemple Markov, A.V., Gusakov, A.V., Kondratyeva, E.G., Okunev, O.N., Bekkarevich, A.O., and Sinitsyn, A.P. (2005). New Effective Method for Analysis of the Component Composition of Enzyme Complexes from *Trichoderma reesei*. Biochemistry (Moscow) 70, 657-663).
- [0058] Dans un cinquième aspect, la présente invention concerne également un procédé de production de produits biosourcés à partir de substrats cellulosiques ou lignocellu-

losiques, comprenant une étape d'utilisation de la souche de champignon selon l'invention, pour produire des enzymes cellulolytiques. L'invention concerne donc également l'utilisation d'une souche de champignon selon l'invention, pour la production de produits biosourcés à partir de substrats celluloseux ou lignocelluloseux.

[0059] Dans un sixième aspect, la présente invention concerne un procédé de production d'un biocarburant à partir de substrats celluloseux ou lignocelluloseux, comprenant une étape d'utilisation de la souche de champignon selon l'invention pour produire des enzymes cellulolytiques. L'invention concerne ainsi l'utilisation d'une souche de champignon selon l'invention, pour la production de biocarburant à partir de substrats celluloseux ou lignocelluloseux.

[0060] Selon l'invention, le terme « biocarburant » s'entend plus particulièrement d'un biocarburant de seconde génération, c'est-à-dire issu de ressources non alimentaires. Selon l'invention, le terme « biocarburant » peut également être défini comme étant tout produit issu de la transformation de la biomasse et pouvant être utilisé à des fins énergétiques. D'une part et sans vouloir se limiter, on peut citer à titre d'exemple des biogaz, des produits pouvant être incorporés (éventuellement après transformation ultérieure) à un carburant ou être un carburant à part entière, tels que des alcools (l'éthanol, le butanol et/ou l'isopropanol selon le type d'organisme fermentaire utilisé), des solvants (acétone), des acides (butyrique), des lipides et leurs dérivés (acides gras à courtes ou longues chaînes, esters d'acides gras), ainsi que l'hydrogène. De manière préférée, le biocarburant selon l'invention est un alcool, par exemple l'éthanol, le butanol et/ou l'isopropanol. Plus préférentiellement, le biocarburant selon l'invention est l'éthanol. Dans un autre mode de réalisation, le biocarburant est du biogaz. Dans un autre mode de réalisation, le produit est une molécule intéressant l'industrie chimique, comme par exemple, un autre alcool tel que le 1,2-propane diol, le 1,3-propane diol, le 1,4-butane diol, le 2,3-butane diol, des acides organiques comme l'acide acétique, propionique, acrylique, butyrique, succinique, malique, fumarique, citrique, itaconique, ou des hydroxyacides comme l'acide glycolique, hydroxypropionique, ou lactique.

[0061] Dans un aspect préféré, le procédé de production d'un biocarburant à partir de substrats celluloseux ou lignocelluloseux selon l'invention, comprend :

i) une étape de prétraitement d'un substrat celluloseux ou lignocelluloseux afin d'obtenir un substrat prétraité,

ii) une étape d'utilisation de la souche selon l'invention pour produire des enzymes cellulolytiques,

iii) une étape d'hydrolyse enzymatique du substrat prétraité obtenu à l'étape i), en présence des enzymes cellulolytiques obtenues à l'étape ii), afin d'obtenir un hydrolysate,

- iv) une étape de fermentation alcoolique de l'hydrolysats obtenu,
- v) une étape de séparation, notamment par distillation.

[0062] Dans un aspect encore plus préféré, le procédé de production d'un biocarburant à partir de substrats cellulotiques ou lignocellulosiques selon l'invention, comprend :

- i) une étape de prétraitement d'un substrat cellulotique ou lignocellulosique afin d'obtenir un substrat prétraité,
- ii) une étape d'utilisation de la souche selon l'invention pour produire des enzymes cellulolytiques,
- iii) une étape d'hydrolyse enzymatique du substrat prétraité obtenu à l'étape i), en présence des enzymes cellulolytiques obtenues à l'étape ii), afin d'obtenir un hydrolysats,

- iv) une étape de fermentation alcoolique de l'hydrolysats obtenu,
 - v) une étape de séparation, notamment par distillation,
- lesdites étapes iii) et iv) étant réalisées simultanément. Cela est typiquement le cas dans les procédés de production dits « SSF » (Simultaneous Saccharification and Fermentation).

[0063] Selon un mode de réalisation particulier, l'étape de prétraitement d'un substrat cellulotique ou lignocellulosique est une étape de mise en suspension en phase aqueuse dudit substrat cellulotique ou lignocellulosique.

[0064] Selon un mode de réalisation particulier, l'hydrolysats obtenu à l'étape iii) est un hydrolysats contenant du glucose.

[0065] Selon un mode de réalisation particulier, l'étape de fermentation alcoolique de l'hydrolysats obtenu est une étape de fermentation, en présence d'un organisme fermentaire, du glucose issu de l'hydrolysats de manière à produire un moût de fermentation. Un organisme fermentaire est par exemple une levure.

[0066] Selon un mode de réalisation particulier, l'étape de séparation est une séparation du biocarburant et du moût de fermentation, notamment par distillation.

[0067] Selon un mode de réalisation encore plus préféré, le substrat cellulotique ou lignocellulosique à hydrolyser est mis en suspension en phase aqueuse à raison de 6 à 40% de matière sèche, de préférence 20 à 30%. Le pH est ajusté entre 4 et 5,5, de préférence entre 4,8 et 5,2 et la température entre 40°C et 60°C, de préférence entre 45°C et 50°C. La réaction d'hydrolyse est démarrée par l'ajout des enzymes agissant sur le substrat prétraité. La quantité d'enzymes habituellement utilisée est de 10 à 30 mg de protéines excrétées par gramme de substrat prétraité ou moins. La réaction dure généralement de 15 à 48 heures. La réaction est suivie par dosage des sucres libérés, notamment le glucose. La solution de sucres est séparée de la fraction solide non hydrolysée, essentiellement constituée de lignine, par filtration ou centrifugation et ensuite traitée dans une unité de fermentation.

- [0068] Selon un autre mode de réalisation encore plus préféré, lorsque l'étape d'hydrolyse et de fermentation sont réalisées conjointement, les enzymes et l'organisme fermentaire sont ajoutés simultanément puis incubés à une température comprise entre 30°C et 35°C pour produire un moût de fermentation. Selon ce mode de réalisation, la cellulose présente dans le substrat pré-traité est convertie en glucose, et en même temps, dans le même réacteur, l'organisme fermentaire (par exemple une levure) convertit le glucose en produit final selon un procédé de SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) connu de l'homme du métier. Selon les capacités métaboliques et hydrolytiques de l'organisme fermentaire, le bon déroulement de l'opération peut nécessiter l'addition d'une quantité plus ou moins importante de mélange cellulolytique exogène.
- [0069] Dans un septième aspect, l'invention concerne également l'utilisation d'une souche de champignon selon l'invention, pour l'hydrolyse de la cellulose ou de la ligno-cellulose en glucose.
- [0070] Dans un huitième aspect, l'invention concerne également l'utilisation d'une souche de champignon selon l'invention, pour améliorer les propriétés d'une souche compatible, notamment industrielle.
- [0071] Dans la présente description, les définitions et préférences indiquées dans un aspect s'appliquent *mutatis mutandis* aux autres aspects. Par exemples, toutes les définitions et préférences indiquées dans le premier aspect de l'invention ci-dessus s'appliquent également aux deuxième, troisième, quatrième, cinquième, sixième, septième et huitième aspect.

Brève description des Figures

- [0072] D'autres caractéristiques, détails et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture des Figures annexées.

Fig. 1

- [0073] [fig.1] représente les viscosités apparentes mesurées à un cisaillement de 5 s⁻¹ pour différentes souches cultivées en fioles agitées

Fig. 2

- [0074] [fig.2] représente les viscosités apparentes mesurées à un cisaillement de 5s⁻¹ pour différentes souches cultivées en bioréacteur

Séquences de la présente invention

- [0075]

[Tableaux1]

Nom de la séquence	Séquence
SEQ ID NO : 1	gactaagaga gagagagagg gagcattggc ctctatcgtg atgcctcggg gaatagagag agtgagtgtg tgtgtggtat ttccactgc tgcgagcttc aattgagagc aatggccatg atattacaca aggttcctac ctaggtaagg taatgcaagg tactacagcg aggtacagta atactagcac gcaaacaac atgggccgca acacgagagt cgtaaataccc atcgtctacc tactgcctac gagtacatgt agcctcgtga ccaactcccc tccccccctt gtcctacgag gctctttgtg cctggacagc acaggtttcc aaccgtcgca cctcgagcca agaaatccga gccgtttagt agccaattga tgcggatcc tcttcatcct cgtctggggc actttccacc caccctgtt ttttttctc tttttttt tgcgagctac tgctagtcgc attctggcag ctaacggcaa agatggggaa attgaaaggc tagacaggac gataccttg atttccctg ttctatcgt atctggcttg aaaagatggg gggggctga agcggaaacta gtaggacagg gcaggacggg acaggacagg acagggtcaa ggccaaggcc gaggctcgtg tgcatcgtg tglacaagta cgatgccata acaatctcat catcgcgctt ctcttgcgtg tggacgggat ctgcaggttt cctctcttt tctctacca ttctttgac tctctcggg cctctgcagc cgctctttct tgcattcgcc ggttcaatc gcggttctg gggttattca ctgttgatc caatcactg ctcttttagat aaaacccact ggcttgccag ctgtcgaggc cgtccgtcc accgctctcg ctctctcg tctctctcaa cctcgtctg ctctctctg ctctctctg gtcacgttgc gtcacttcc ttggtttcc cccccttccg cctctggggg acaatctgtg gccaaacaat tcttgggttg ggacgagaaa aaaatccgc ttgtctcgg ttccctttt cttttacct tctctcagtt tgggtttga acccattgac gagcttctct tcttgggttg ttggatctg ctgcaccaca tgcgagccc ttcatctc ccatcttct tttttttt ctctgttcg ccaagagttt tggaacagt aacagaatc gatttaccgc cgttccctt tg- gaaccaac agcttacctg cattcgact gtgtgacaca cgcaagtgt cctgtgcatt ctgggtaaac gactcatagg agagtgttaaaaagtctg gccggcgat tgggtgttac ggagcattca ctaggcaacc atgcactctt actattgtat accatcttag taggaatgat ttcgaggtt atacctacga tgaatgtgtg tctgttaggc ttgagagttc aagggaagaaa catgcaatta tctttgcgaa cc- cagggtcgt gtgacggaat ttcatagtc aagctatcag agtaagaag aggagcatgt caaagtacaa ttagagacaa atatatagtc gcgtggagcc aagagcggat tctcagttc ctaggtctc tt- gacgaccg ttgatctgct tgatctctc tccgaaaaat gaaaatagct ctgctaagct attcttct tcgccggagc ctgaaggcgt tactagggtg cagtcaatgc attaatgcat tgcagatgag ctgtatctgg aagaggtaaa cccgaaaacg cgttttattc ttgttgacat ggagctatta aatcactaga aggcactctt tgctgcttg acaaatgaac gtatcttacc gagatctga acaccattg tctcaactcc ggctagcgaa ttctcgactc attctttgc cctcggacga gtgctggggc gtcggtttcc ac- tateggcg agtacttcta cacagccatc ggtccagacg gccgcgttc tgcggcgat ttgtgtacgc ccgacagtcc cggctccgga tcggacgatt gcgtcgcatc gaccctgcgc ccaagctgca

tcatcgaaat tgccgtcaac caagctctga tagagttggt caagaccaat gcggagcata
 tacgcccga gtcgtggcga tccgtcaagc tccggatgcc tccgtcgaa gtagecgcgc
 tgctgtcca tacaagcaa ccacggcctc cagaagaaga tgttggcgac ctgctattgg
 gaatccccga acatcgctc gctccagtca atgaccgctg ttatgcggcc attgtccgc ag-
 gacattgt tggagccgaa atccgcgtgc acgaggtgcc ggacttcggg gcagtcctgc
 gccc aaagca tcagctcatc gagagcctgc gcgacggacg cactgacggt gtcgtccatc
 acagtttgc agtgatacac atggggatca gcaatcgcg atagaaac acgcatatga
 gtgtattgac cgattcctg cggtcgaat gggccgaacc cgctcgtctg gctaagatcg
 gccgcagcga tcgcatccat agcctccgcg accggttga gaacagcggg cagttcgggt
 tcaggcaggt ctgcaacgt gacacctgt gcacggcggg agatgaata ggtcaggctc
 tcgctaaact ccccaatgc aagcactcc ggaatcggga gcgcggccga tgcaaagtgc
 cgataaacat aacgatctt gtgaaacca tcggcgacg tatttaccg caggacatat
 ccacgccctc ctacatcgaa gctgaaagca cgagattct cgcctccga gagtcgcatc
 aggtcggaga cgctgtcgaa ctttcgac agaaactct cgacagacgt cgcggtgagt
 tcaggcttt tcatgatgga cctcctaccg gtgatctag ctgtaggaaa gagaagaagg
 ttagtagtcg acatggtggc cctcctatag tgagtcgtat tatactatgc cgatatacta tgccgatgat
 taattgtcaa cactagggcg cggtcacaac tagtagatat cacttacgtg ttgagaggcg
 gcatgcgata agaggtgtaa ttacctgaga acatctgtt gcctgctt ccgtgcgaaa tactaccggt
 acttttggga aacaaggga caggaggcg ctgctgtgcg cggttctgag tttcaggat
 tgaagctgaa gaaggtgctg aggaagcgta gaactgttc ggacgcgagt tctgagaaga
 gctgtaccga ttggtgaaag ccgaagaagt gagttggtgc cctgttcct ggataatgt tg-
 caactgc tggttctgca gagacggaga caaatgctgg ctacgatgt gctgattcag gttgatacct
 cggtcgagac actgttttg ttgataggg tggatttgg tgcagagaag agaaaggaag gt-
 caaagagg gaaaactggg cggagggaag gattttgtat caggcagcaa actgccactg
 cagtggccct ggcagtgcg ggcgaggcac ccacgcacgg ccgcgcaacc ggttggctct
 tgcccaccac gaaaccctc tgaaaggta gatggaagtg tgcgacagt gcgctccca
 agccaatgca ggcgcatgc actccccacc cgcaagattc actgtgcgtt cttattggtt
 gccgcaaggc cagccaaagg ggggaagtat agtcacagca ccgatacaag aaaattgcag
 aactaacata tggatgcgcg cgctattctg tagagctctg ggcaaagcac caatctgcg
 ggtcggta caactagca ctgccattct ggccgtcaag accgaaactg tcagcgtggc
 caccgagacc ggtaccagca cggcggagag caccgcagac agcactctg gcgacagcac
 ggggtctgcc acgacttcta cccgaaac atcatcttc accactcta gcgcgaaag
 caggagacg tccaacggca gcccttga caagecgcgc actgcgttg gtccggcct
 ggttggcgc gtttgggtg ctgcggctt gttgtaagat ggattcaagt tggttcgtg gattgtatc
 gtcaaactag tatcagatac ccatctact ctgccatgc tttctgctc tttgttct tttttgatg
 ttaccaagg gcttgagctt gttggcctaa attccccct aatgctctt gtatgatggc tgaacgttg
 gagaggggat ggtttgttc tatgacatt gccgcgtaac gaggcagac ttattatat taatgcatga
 ggatatgtg tacatgaggt gtgaagagcc ctgcttatt tatggtgtg tttggtctga cgccgacaa

	ccctgtcatc gtgttcttgt tattatgcca cgcgctatcc tagctgaaat acgggaaccg ataattgccc tcgcgttgtg aaccctcgcg ttgtgaacct ttgcgttgtg aaccctcgaa aaccgtgttt ccccttttc atatatgctt ttcatcttc ttctatcca atatctcgcg ttgtgtttc atctagtga actgtaatcg taggtgagag tagtgtttt aggccagtaa tggttatagt tgtgattgtt tctgaagtat tctgattcag cctggtggca ctgatatcg tcgtcgacaa aggtatctcg gtcgacaaag gtatgctggt cgaggcgggt gtatcgtcgt cgtcagagga ggaagaggac gagtaggtcc tgacggccga gttgccgacg aagacgaggc tgacggtgaa gatggcgagg acggaggcac agaggaggcc catggccagg tagcggatgc gcgggtcgta gcggtggggg gaagagcccc agggggtgcg ggtgtgggtt tggcattgga ggtgtcgat catttatacg gtttttttc tcttgtttg atttttagg ttgtttgagc ttgattgatg ttgctgaagt atgtggtga gaatt
SEQ ID NO : 2	ATGCGTTGGTCTTCGGTTGCCGTTGCGCTGGCGAGCGCCAAATCC TTTGCCGTGGCGCTGGATCCCGTCTCCGTCGTGGGAAACAAGTTC TTCAACAAGGACGGCTCGCAGTTCTTTATCAAGGGCATTGCGTA CCAGCTTGTTCCGCAGGACCCCCTCGTGGACACTGACCAGTGCA AACGCGATGCTAAGCTCATGGCCGAGCTCGGAACAAACACCATC CGCGTCTATCACGTCGACCCGGACGCCGACCATGACGGCTGCAT GAGTGCGTTTGACGACGCCGGCATCTACGTCCTTGCTGATCTGG ATACCTTTGATACCTACATTATTCCCCAAAATAACTACTGGAATA AGACAAAGTTCGACAGGTATGCCGAGGTCCTGGACACGTTCCAA AAGTACGACAACCTCCTGGGCGTCTTCGTCGGAACGAGAACAT CGCTACTAAAGATGACTCGCCACGGCGCCCTACCTCAAGGCTG CTGCCC GCGACATGAAGGCGTACCGCGACGCCAGGGCTACCGC GAGATCCCCGTCGGCTACTCGGCCGCCGATATCTTGACGCTTCGC CCCATGCTCCAGGACTACCTGACCTGCGGCGGCAACTCGTCCGA GACAGTCGACTTCTTCGCCCTCAACTCGTACTCGTGGTGCGACCC CAGCACGTACAAGGAGTCCACCTACGACCAGCTTGAGGCCTACG CCAAGAAATTCCCCGTGCCATCTTCCTCTCCGAGACAGGCTGC ATCGTTCCCGGCCCTCGCCAGTTCGACGACCAGGACGCCATCTTT GGCCCTGAGATGGTCAATGACTGGAGCGGCGCCATCATCTACGA GTGGATT CAGGAGGAAAACGGCTACGGAATTATAACATATGCCC CAGCCGGCCAAGCTGCTGGACCCAACGTCGAGGGTGGCTTCCTT CGCAAGGGCACTCCCACGCCAAAGCTGCCCCGACTTCACCGCGCT CAAGTCCAAGTGGGCGACCAACACCCCTACCGGCGTCAGCCGAG ACGACTACGACGCAAAGGACGTGTCGACCCGTGCGTGTCTTCG TCCACTGCCGGCGGCTGGTGGCAGGTGGATGGCGATGCCAAATT GCCACCCCTGGGCCAG
SEQ ID	MRWSSVAVALASAKSFAVALDPVSVVGNKFFNKDGSQFFIKGIAY

NO : 3	QLVPQDPLVDTDQCKRDAKLMAELGTNTIRVYHVDPDADHDGCM SAFDDAGIYVLADLDTFDITYIIPQNNYWNKTKFDRYAEVLDTFQKY DNLLGVFVGNENIATKDDSPAPYLKAAARDMKAYRDAQGYREIP VGYSAADILQLRPMLQDYLTCCGNSSETVDFFALNSYSWCDPSTYK ESTYDQLEAYAKKFPVPIFLSETGCIVPGPRQFDDQDAIFGPEMVND WSGAIIEWQIENG YGIITYAPAGQAAGPNVEGGFLRKGTPTPKLP DFTALKSKWATNTPTGVSRRDDYDAKDVSTRACPSSTAGGWWQVD GDAKLPTLGQ
SEQ ID NO : 4	GACTAAGAGAGAGAGAGAGGGGAGC
SEQ ID NO : 5	AATTCTCAACCACATACTTCAGCA
SEQ ID NO : 6	AACACCCAATACGCCGGC
SEQ ID NO : 7	GCTCTGGGCAAAGCACCAA
SEQ ID NO : 8	GTGCGGGATGCATGAAGACG
SEQ ID NO : 9	CCACCCTACGATTCTGCAACC
SEQ ID NO : 10	gactaagaga gagagagagg gagcattggc ctctatcgtg atgcctcggg gaataagagag agtgagtgtg tgtgtggtat tcccactgc tgcgagcttc aattgagage aatggccatg atattacaca aggttcctac ctaggtaagg taatgcaagg tactacagcg aggtacagta atactagcac gcaaacaac atgggcccga acacgagagt cgtaaatecc atcgtctacc tactgcctac gagtacatgt agcctcgtga ccaactcccc tccccccctt gtctacagag gctctttgtg cctggacage acaggtttcc aacegtcgca cctcgagcca agaaatccga gccgtttagt agccaattga tgccggatcc tcttcactct cgtctggggc actttccacc caccctgtt ttttttctc ttttttttt tgcgagctac tgctagtcgc attctggcag ctaacggcaa agatggggaa attgaaaggc tagacaggac gataccttg atttccctg ttctatcgt atctggcttg aaaagatggg gggggctga agcggaacta gtaggacagg gcaggacggg acaggacagg acagggtcaa ggccaaggcc gaggctgtgg tgcatgctgg tgtacaagta cgatgccata acaatctcat catcgcgctt ctcttctgg tggacgggat ctgcaggttt cctctctttt ttctttacca ttcttttgac tctctcgggtg cctctgcage cgctctttct tgcattcgcc ggttcaate gcggttctg gggttattca ctgttggate caatcactcg ctcttttagat aaaaccact ggcttgccag ctctcgagge ccgtccgtcc accgtctcg ctctctctg tctctctcaa cctctgctcg ctctctctct ctctctctgg gtcacgttgc gtcactttc ttggtttcc ccctttccg cctctggggg acaatctgtg gccaaacaat tcttgggttg ggacagaaaa

	aaaatccgcc ttgtgctcgg ttccctcttt cttttacctt tctctcagtt tcggttttga acccattgac gagcttctct tcttggttgg ttggatctg ctcgaccaca tcgcgagccc ttcaatcacc ccatcttctt tttttttt ccttgttcg ccaagagttt tggaacagt aacagaattc gatttaccgc cgttccctt tg- gaaccaac agcttacctg catttcgact gtgtgacaca cg
SEQ ID NO : 11	caagtgtc cctgtgcatt ctgggtaaac gactcatagg agagttgtaa aaaagtttcg gccggcgat tgggtgttac ggagcattca ctaggcaacc atgcatcctt actattgtat accatcttag taggaatgat ttgcagggtt atacctacga tgaatgtgtg tctgttaggc ttgagagttc aaggaagaaa catgcaatta tctttgcgaa cccagggctg gtgacggaat ttcatagtc aagctatcag agtaaagaag ag- gagcatgt caaagtacaa ttgagacaaa atatatagtc gcgtggagcc aagagcggat tctcagctc cgtaggctc ttgacgaccg ttgactgct tgatctctc tccgaaaaat gaaaatagct ctgctaagct attcttctct tcgccggagc ctgaaggcgt tactagggtg cagtcaatgc attaatgcat tgcagatgag ctgtatctgg aagaggtaaa cccgaaaacg cgttttattc ttgttgacat ggagctatta aatcactaga aggcactctt tgctgcttgg acaaatgaac gtatcttacc gagatcctga acaccattg tctcaactcc ggctagegaa ttctcgactc attcctttgc cctcggacga gtgctggggc gtcggtttcc ac- tatcggcg agtacttcta cacagccacc ggtccagacg gccgcgcttc tcggggcgat ttgtgtacgc ccgacagtcc cggctccgga tcggacgatt gcgtcgacc gacctgcgc ccaagctgca tcatcgaaat tgccgtcaac caagctctga tagagtgggt caagaccaat gccgagcata tacgcccgga gtctgtggca tctgtcaagc tccggatgcc tccgtcgaa gtagecgctc tgctgtcca tacaagccaa ccacggcctc cagaagaaga tgttggcgac ctcgtattgg gaatccccga acatcgctc gctccagtc atgaccgctg ttatgcggcc attgtccgctc ag- gacattgt tggagccgaa atccgcgtgc acgaggtgcc ggacttcggg gcagtcctcg gccccaaaga tcagctcacc gagagcctgc gcgacggacg cactgacggt gtcgtccacc acagtttgc agtgatacac atggggatca gcaatcgctc atatgaaac acgccatga gtgtattgac cgattccttgc cgttcgaat gggccgaacc cgtcgtctg gctaagatcg gccgcagcga tcgcatccat agcctccgct accggttga gaacagcggg cagttcggtt tcaggcagggt ctgcaacgt gacacctgt gcacggcggg agatgcaata ggtcaggtc tcgctaaact ccccaatgct aagcacttcc ggaatcggga gcgcggccga tgcaaagtgc cgataaacat aacgatcttt gtagaaacca tcggcgcagc tatttaccgc caggacatat ccacgccctc ctacatcgaa gctgaaagca cgagattctt cgcctccga gagctgcacc aggtcggaga cgctgtcgaa ctttcgacc agaaactct cgacagacgt cgcggtgagt tcaggctttt tcatgatggc cctctaccg gtgactcag ctgtaggaaa gagaagaagg ttagtagtcg acatggtggc cctctatag tgagtcgtat tatactatgc cgatatacta tgccgatgat taattgtcaa cactagcgcc cggtcacaac tagtagatat cacttacctg ttgagaggcg gcacgcgata agaggtgtaa ttacctgaga acatctgtt gccctgctt ccgtgcgaaa tactaccggt acttttggga aacaagggaa caggagggcg ctgctgtgcg cggttctgag tgtcaggat tgaagctgaa gaaggtgctg aggaagcgta gaactgttc ggacgcgagt tctgagaaga gctgtaccga ttggtgaaag ccgaagaagt gagttggtgc cctgttcct ggataatgt tg-

	caactcgc tggttctgca gagacggaga caaatgctgg ctacgatgtt gctgattcag gttgatacct cggtcgagac actgttttgg ttgataggg tggatttggg tgcagagaag agaaaggaag gt- caaagagg gaaaactggg cggagggaag gattttgtat caggcagcaa actgccactg cagtggccct ggacagtccg ggcgaggcac ccacgcacgg ccgcgcaacc ggttggctct tccccaccac gaaaccttc tgaaggtca gatggaagtg tgcgacagtg cgcgtcccca agccaatgca ggcgcatgc actccccacc cgcaagattc actgtgcgtt cttattgggt gccgcaaggc cagccaaagg ggggaagtat agtcacagca ccgatacaag aaaattgcag aactaacata tggatgcgcg cgctattctg tagagctctg ggcaaagcac caatcctcgcg ggtcgggtaca cacactagca ctgcc
SEQ ID NO : 12	attct ggccgtcaag accgaaactg tcagegtggc caccgagacc ggtaccagca cggcggagag caccgcagac agcacctctg gcgacagcac ggggtgctgcc acgacttcta ccccgaatc at- catcttc accacctcta gcgcgaaag caggagacg tccaacggca gccccttga caagcgcgc actgcgtttg gtccggcct ggttggcgtc gttttgggtg ctgcggtctt gttgtaagat ggattcaagt tggttcgtt gatattgtat gtaaatcag tatcagatac ccatctactt ctgcctatgc tttctgctc ttgtttctt tttttgatg ttaccaaggg gcttgagctt gttggcctaa attccccct aatgctcttt gtatgatggc tgaacgttt gagaggggat ggtttgttc tatgacattt gccgcgtaac gaggcagac ttattatat taatgcata ggatatgtt tacatgaggt gtgaagagcc ctgcttatt tatggtgtgg tgtggtctga cgcgaccaa cctgtctatc gtgttcttgt tattatgcca cgcgtatcc tagctgaaat acgggaaccg ataattgcc tcgcgttctg aacctcgcg ttgtgaaccc ttgcgttctg aacctcgaa aacctgttt ccccttttc atatgtctt ttcatcttc tttctatcca atatctcgg ttttggttc atctagtga actgtaatc taggtgagag tagtgtttt aggccagtaa tggttatagt tgtgattgt tctgaagtat tctgattcag cctggtggca ctgatattcg tcgtcgacaa aggtatctcg gtcgacaaag gtatgctggc cgaggcgggt gtatcgtcgt cgtcagagga ggaagaggac gagtaggtcc tgacggccga gttccgacg aagacgagge tgacgggtgaa gatggcgagg acggaggcac agaggaggcc catggccagg tagcggtatc gcgggtcgta gcgggtgggg gaagagcccc aggggtgctg ggtgtgggtt tggcattgga ggttgcgat cattatacg gttttttt tctgtttt atttgtagg ttgttgagc ttgattgat ttgctgaagt atgtggtga gaatt

Liste des références citées dans la présente demande de brevet

- [0076] Guangtao Z, Hartl L, Schuster A, Polak S, Schmoll M, Wang T, Seidl V, Seiboth B., (2009). Gene targeting in a nonhomologous end joining deficient *Hypocrea jecorina*. J Biotechnol. 139(2):146-51.
- [0077] Montenecourt, B. S.; Eveleigh, D. E. (1977) Semiquantitative Plate Assay for Determination of Cellulase Production by *Trichoderma viride*. In : Applied and environmental microbiology, vol. 33, n° 1, p. 178–183
- [0078] Penttilä M, Nevalainen H, Rättö M, Salminen E, Knowles J., (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*.

Gene. 61(2):155-64.

- [0079] Punt, P. J.; van den Hondel, C. A., (1992) Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers. In : Methods in enzymology, vol. 216, p. 447–457.
- [0080] Te'o VS, Bergquist PL, Nevalainen KM.,(2002). Biolistic transformation of *Trichoderma reesei* using the Bio-Rad seven barrels Hepta Adaptor system. J Microbiol Methods. 51(3):393-9.

Exemples

- [0081] **Exemple 1 : Invalidation du gène ID78713 (*GEL3*) dans une souche hyperproductrice**

- [0082] La cassette d'invalidation pour ID78713 (*GEL3*) est constituée du gène de résistance à l'antibiotique hygromycine *hph* placé sous le contrôle du promoteur *GPDa* et du terminateur *TRPc* (Punt et van den Hondel, 1992) avec en amont et en aval les régions flanquantes 5' et 3' du gène ID78713 (*GEL3*). Cette séquence est représentée en SEQ ID NO : 1. La cassette d'ADN a été synthétisée et la cassette est insérée dans un plasmide pEX-A (disponible par exemple auprès d'Addgene). Après amplification et extraction du plasmide, la cassette d'invalidation a été amplifiée par PCR (Polymerase Chain Reaction) à l'aide des amorces p61 et p62 (voir le Tableau 2 ci-après).

- [0083] [Tableaux2]

Nom des amorces	Séquences correspond à l'amorce
P61	SEQ ID NO : 4
P62	SEQ ID NO : 5
P78	SEQ ID NO : 6
P79	SEQ ID NO : 7
P91	SEQ ID NO : 8
P92	SEQ ID NO : 9

- [0084] Séquences des amorces de la présente invention

- [0085] La souche utilisée pour la transformation est la souche hyperproductrice RutC30 (Montenecourt et Eveleigh, 1977) dont le gène *KU70* (ID 63200) a été invalidé en remplaçant la séquence codante par le gène codant pour le marqueur de sélection AmdS (Pentillä *et al.*, 1987). L'invalidation de ce gène favorise la recombinaison homologue (Guangtao *et al.*, 2009). Cette souche est appelée TR3126.

- [0086] Les transformations de la souche TR3126 avec la cassette représentée par la SEQ ID NO : 1 ont été effectuées par Biolistique (Te'o *et al.*, 2002) en utilisant 5 µg de cassette purifiée. L'intégration au locus de la cassette d'invalidation a été vérifiée par PCR avec

une amorce (p91) en amont de la cassette et une amorce (p78) dans le gène *hph* (vérification 5') et une amorce (p92) en aval de la cassette et une amorce (p79) dans le gène *hph* (vérification 3'). Les souches invalidées pour le gène ID78713 (*GEL3*) ainsi obtenues sont nommées TR3126- Δ *GEL3*.

[0087] **Exemple 2 : Méthode de mesure de la viscosité**

[0088] Pour la mesure de rhéologie, le mobile (rotor) utilisé est une hélice large en acier inoxydable d'un diamètre de 38 mm, d'une hauteur de 32 mm, d'un pas de 29 mm et avec un ruban de 8 mm de largeur. Cette hélice est utilisée avec un godet (stator) de 45 mm de diamètre intérieur et un espace vertical entre le rotor et le stator de 500 μ m.

Après calibration, l'hélice est assimilée à un cylindre de Couette d'un rayon de 14 mm.

[0089] Le godet est rempli avec 70mL d'un moût de fermentation prélevé dans un réacteur (fiole agitée, par exemple comme indiqué dans l'Exemple 3, ou bioréacteur). Les mesures de viscosité sont réalisées par un balayage logarithmique de taux de cisaillements compris entre 4 s⁻¹ et 100 s⁻¹, à une température de 27°C. Cette gamme correspond au taux de cisaillement moyen attendu à l'échelle industrielle. Le balayage est réalisé en un aller-retour (de 4 s⁻¹ à 100 s⁻¹ puis de 100 s⁻¹ à 4 s⁻¹). Les mesures de rhéologie ont été effectuées en duplicate.

[0090] Toutes les mesures ont été effectuées sur le rhéomètre AR2000 de TA Instruments.

[0091] **Exemple 3 : Protocole de culture en fioles agitées**

[0092] Les cultures en fioles agitées sont réalisées dans des fioles de Fernbach de 19 cm de diamètre, contenant 400mL de milieu de culture,ensemencées avec des spores de différentes souches à partir de cryotubes, et mises en incubation à 150 rpm et 30°C dans un incubateur Infors Multitron.

[0093] Le milieu de culture possède la composition finale suivante :

- 5,6 g/L de (NH₄)₂SO₄
- 4,4 g/L de K₂HPO₄
- 0,3 g/L de MgSO₄.7H₂O
- 0,15 g/L de CaCl₂.2H₂O
- 1 mL/L de solution d'oligo éléments (FeSO₄ : 5 g/L, MnSO₄ : 1,4 g/L, ZnSO₄ : 1,4 g/L, CoCl₂ : 3,7 g/l)
- 5,85 g/L de BTCA (butane tetracarboxylic acid)
- 3,0 g/L de KOH en cristaux
- 1,5 g/L de cornsteep (par exemple Roquette Solulys®)
- 30 g/L de glucose

[0094] Le pH du milieu de culture est ajusté à 6.0 avec de la soude 30%.

[0095] Les composants sont stérilisés durant 20 minutes à 121°C (le glucose est stérilisé séparément des autres composés).

[0096] Des prélèvements réguliers de 2 mL sont effectués pour suivre le glucose résiduel.

Puis quand le glucose résiduel est inférieur à 5 g/L (ce qui correspond à une concentration en champignon de l'ordre de 10g/L), un prélèvement de 100mL est effectué pour mesurer précisément la concentration en champignon (par filtration puis séchage sur filtres de 1,2µm) et la viscosité du moût (selon la méthode décrite dans l'exemple 2).

[0097] **Exemple 4 : comparaison des viscosités dans des cultures en fiole agitées**

[0098] Deux souches ont été cultivées en duplicate selon la méthode décrite dans l'Exemple 3, puis la viscosité du moût de fermentation a été caractérisée selon la méthode décrite dans l'Exemple 2 :

[0099] Les deux souches testées sont :

- La souche TR3126-Δ*GEL3* présentant l'inactivation du gène ID78713 (*GEL3*) ;
- La souche parente TR3126 utilisée comme contrôle de viscosité forte

[0100] Les mesures de concentration en champignons montrent que les concentrations sont du même ordre dans toutes les cultures réalisées, autour de 10g/L de champignon en suspension (voir le Tableau 3 ci-dessous).

[0101] [Tableaux3]

Souches	Concentration en champignon (g/L)	
	Réplicat 1	Réplicat 2
TR3126	9,4	8,7
TR3126-Δ <i>GEL3</i>	8,6	11,6

[0102] Concentration en champignon pour les souches testées (expériences réalisées en duplicate)

[0103] Les mesures de viscosité (présentées en Figure 1) montrent que l'inactivation du gène ID78713 (*GEL3*) a entraîné une baisse drastique de la viscosité. A un cisaillement de 5 s⁻¹, la viscosité obtenue pour la souche TR3126-Δ*GEL3* est environ 8 à 10 fois plus faible que celle du témoin visqueux (TR3126).

[0104] **Exemple 5 : Protocole de culture en bioréacteur**

[0105] Les cultures en bioréacteurs sont réalisées dans des fermenteurs de 16 cm de diamètre, contenant 2L de milieu de culture,ensemencés à 10%v/v à partir d'une pré-culture réalisée selon le protocole décrit dans l'Exemple 3. L'agitation est effectuée par une turbine Rayneri de 8cm de diamètre, à une vitesse fixe de 1000 rpm. La température est contrôlée à 27°C, et le pH est contrôlé à 4,8 par ajout automatique d'une solution d'ammoniaque à 5N.

[0106] Le milieu de culture possède la composition finale suivante :

- 3 mL/L d'acide orthophosphorique à 85%

- 0,25 mL/L d'acide sulfurique à 96%
- 1,66 g/L de potasse KOH en cristaux
- 2,8 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 0,6 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,6 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,12 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 1 mL/L de solution d'oligos éléments (FeSO_4 : 5 g/L, MnSO_4 : 1,4 g/L, ZnSO_4 : 1,4 g/L, CoCl_2 : 3,7 g/l)
- 1 g/L de cornsteep (par exemple Roquette Solulys®)
- 80 g/L de glucose

[0107] Les composés sont stérilisés durant 20 minutes à 121°C (le glucose est stérilisé séparément des autres composés)

[0108] Le pH du milieu de culture est ajusté puis contrôlé à 4,8 avec la solution d'ammoniaque servant au contrôle du pH

[0109] Des prélèvements réguliers d'environ 100 mL sont effectués pour : (i) suivre le glucose résiduel, (ii) mesurer précisément la concentration en champignon (par filtration puis séchage sur filtres de 1,2µm) et (iii) mesurer la viscosité du moût (selon la méthode décrite dans l'Exemple 2).

[0110] **Exemple 6 : Comparaison des viscosités dans des cultures en bioréacteur**

[0111] Deux souches ont été cultivées en duplicate selon la méthode décrite dans l'Exemple 5, et la viscosité du moût de fermentation a été caractérisée (pour différentes concentrations en champignon dans le moût) selon la méthode décrite dans l'Exemple 2 :

- La souche TR3126- ΔGEL3 présentant l'inactivation du gène ID78713 (*GEL3*)
- La souche de référence Rut-C30 (utilisée comme contrôle de viscosité forte)

La caractérisation de la viscosité à différentes concentrations en champignon montre un réel avantage apporté par l'inactivation du gène ID78713 (*GEL3*) (voir la Figure 2) avec :

- comme en fioles agitées, une viscosité environ 10 fois plus faible quand la concentration en champignon est de l'ordre de 10 g/L ;
- une viscosité environ 3 fois plus faible quand la concentration est de l'ordre de 25 g/L ;
- la viscosité de la souche invalidée pour ID78713 (*GEL3*) (TR3126- ΔGEL3) à 35g/L du même ordre que la viscosité de la souche sauvage (Rut-C30) à 15 g/L.

[0112] Ainsi, une culture de la souche invalidée pour ID78713 (*GEL3*) à 35g/L ne demande pas plus d'énergie pour l'agitation qu'une culture de la souche sauvage à 15g/L, ce qui permet d'augmenter la productivité de la culture à même dépense énergétique.

Revendications

- [Revendication 1] Souche de champignon dans laquelle le gène ID78713 a été invalidé.
- [Revendication 2] Souche de champignon selon la revendication 1, dans laquelle le gène ID78713 a été invalidé par mutagénèse ou par recombinaison homologue, notamment à l'aide d'une cassette d'invalidation telle que représentée par la SEQ ID NO : 1.
- [Revendication 3] Souche de champignon selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, dans laquelle le champignon est un champignon filamenteux, notamment appartenant à la classe des sordariomycètes plus particulièrement appartenant au genre *Trichoderma*, et encore plus particulièrement à l'espèce *Trichoderma reesei*.
- [Revendication 4] Souche de champignon selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle le gène ID78713 correspond à un gène représenté par la SEQ ID NO : 2 ou un gène ayant au moins 80% d'identité avec le gène de SEQ ID NO : 2, notamment au moins 90% et plus particulièrement au moins 95%.
- [Revendication 5] Procédé de modification génétique d'une souche de champignon selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comprenant une étape d'invalidation du gène ID78713.
- [Revendication 6] Procédé de modification génétique d'une souche de champignon selon la revendication 5, dans lequel l'étape d'invalidation du gène ID78713 est réalisée par mutagénèse, par recombinaison homologue ou plus préférentiellement à l'aide d'une cassette d'invalidation représentée par la SEQ ID NO : 1.
- [Revendication 7] Procédé de production de biomasse de champignon, comprenant une étape de culture d'une souche de champignon selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 dans un milieu de culture comprenant un substrat approprié.
- [Revendication 8] Procédé de production de protéines d'intérêt, notamment des enzymes, comprenant une étape de culture d'une souche de champignon selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 dans un milieu de culture comprenant un substrat approprié.
- [Revendication 9] Procédé de production de produits biosourcés à partir de substrats celluloseux ou lignocelluloseux, comprenant une étape d'utilisation de la souche de champignon selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour produire des enzymes cellulolytiques.
- [Revendication 10] Procédé de production d'un biocarburant à partir de substrats cellu-

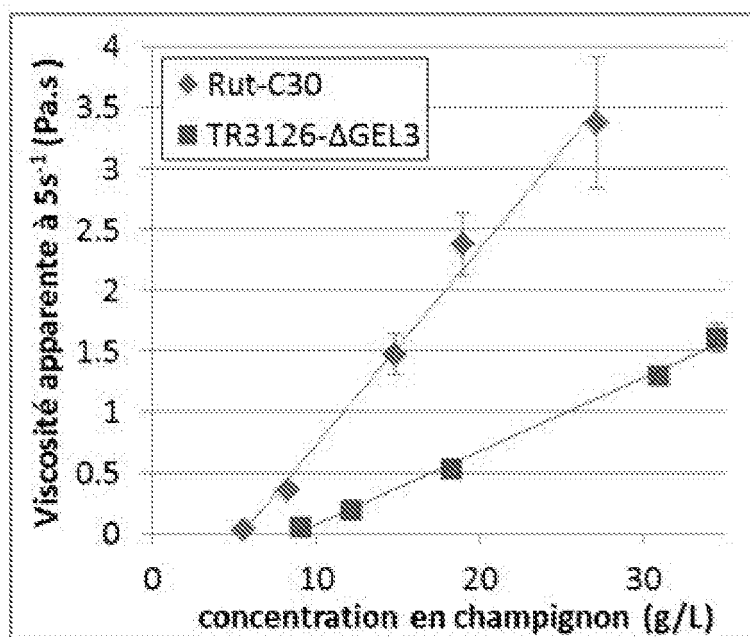
losiques ou lignocellulosiques, comprenant une étape d'utilisation de la souche de champignon selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour produire des enzymes cellulolytiques.

- [Revendication 11] Procédé de production d'un biocarburant à partir de substrats cellullosiques ou lignocellulosiques selon la revendication 10, comprenant :
- i) une étape de prétraitement d'un substrat cellulosique ou lignocellulosique afin d'obtenir un substrat prétraité,
 - ii) une étape d'utilisation de la souche selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour produire des enzymes cellulolytiques,
 - iii) une étape d'hydrolyse enzymatique du substrat prétraité, en présence des enzymes cellulolytiques obtenues à l'étape ii) et d'un substrat approprié, afin d'obtenir un hydrolysate,
 - iv) une étape de fermentation alcoolique de l'hydrolysate obtenu, l'étape iv) étant optionnellement réalisée en simultané avec l'étape iii).
 - v) une étape de séparation, notamment par distillation.
- [Revendication 12] Utilisation d'une souche de champignon selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour la production de protéines d'intérêt, plus particulièrement des enzymes, notamment des enzymes cellulolytiques telles que des cellulases.
- [Revendication 13] Utilisation d'une souche de champignon selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour l'hydrolyse de la cellulose ou de la lignocellulose en glucose.
- [Revendication 14] Utilisation d'une souche de champignon selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour la production de produits biosourcés à partir de substrats cellullosiques ou lignocellulosiques.
- [Revendication 15] Utilisation d'une souche de champignon selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour la production de biocarburant à partir de substrats cellullosiques ou lignocellulosiques.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



SEQUENCE LISTING

<110> IFP Energies nouvelles

<120> SOUCHE DE CHAMPIGNON AYANT UNE VISCOSITE DIMINUEE

<130> BFF190412

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5105

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Cassette d'invalidation

<400> 1

gactaagaga gagagagagg gagcattggc ctctatcgtg atgcctcggg gaatagagag 60

agtgagtgtg tgtgtggtat ttccactgc tgcgagcttc aattgagagc aatggccatg 120

atattacaca aggttcctac ctaggtaagg taatgcaagg tactacagcg aggtacagta 180

atactagcac gcaaacaac atgggccgca acacgagagt cgtaaatccc atcgtctacc 240

tactgcctac gagtacatgt agcctcgtga ccaactcccc tccccccctt gtcttacgag 300

gctctttgtg cctggacagc acaggtttcc aaccgtcgca cctcgagcca agaaatccga 360

gccgtttagt agccaattga tgccggatcc tcttcacct cgtctggggc actttccacc 420

caccctgtt ttttttctc ttttctttt tgcgagctac tgctagtcgc attctggcag 480

ctaacggcaa agatggggaa attgaaaggc tagacaggac gatatccttg atttccctg 540

ttcgtatcgt atctggcttg aaaagatggg gggggctga agcggaacta gtaggacagg 600

gcaggacggg acaggacagg acagggtaa ggccaaggcc gaggtcgtgg tgcattgctg 660

tgtacaagta cgatgccata acaatctcat catcgcgctt ctcttgctgg tggacgggat 720

ctgcaggttt cctctcttt tctctacca ttctttgac tctctcggg cctctgcagc 780

cgctctttct tgcattcgcc ggcttcaat gcggttgctg gggttattca ctgttgatc 840

caatcactcg ctctttgat aaaaccact ggcttgccag ctgtcgaggc ccgtccgtcc 900

accgtctcg ctctctctg tctctctcaa cctcgtctg ctgctcgtc ctctctctg 960

gtcacgttgc gctcacttc ttggtttcc ccccttccg cctctggggg acaatctgtg 1020

gccaaacaat tcttgggttg ggacgagaaa aaaatccgcc ttgtgctcgg ttccctcttt 1080
ctttacctt tctctcagtt tcggttttga acccattgac gagcttctct tcttggttgg 1140
tttgatctg ctcgaccaca tcgcgagccc ttcatcctc ccatctttct tttttttt 1200
ctctgttcg ccaagagttt tggaacagtg aacagaattc gattaccgc cgctccctt 1260
tggaaccaac agcttacctg catttcgact gtgtgacaca cgcaagtgtc cctgtgcatt 1320
ctgggtaaac gactcatagg agagttgtaa aaaagtttcg gccggcgat tgggtgttac 1380
ggagcattca ctaggcaacc atgcctcctt actattgtat accatcttag taggaatgat 1440
ttcgaggtt atacctacga tgaatgtgtg tcctgtaggc ttgagagttc aaggaagaaa 1500
catgcaatta tctttgcgaa ccagggctg gtgacggaat ttcatagtc aagctatcag 1560
agtaaagaag aggagcatgt caaagtacaa ttagagacaa atatatagtc gcgtggagcc 1620
aagagcggat tctcagttc cgtaggtctc ttgacgaccg ttgatctgct tgatctcgtc 1680
tccgaaaat gaaaatagct ctgctaagct attcttctct tcgccggagc ctgaaggcgt 1740
tactaggtg cagtcaatgc attaatgcat tgcagatgag ctgtatctgg aagaggtaaa 1800
ccgaaaacg cgttttatc ttgtgacat ggagctatta aatcactaga aggcactctt 1860
tgctgcttg acaaatgaac gtatcttctc gagatcctga acaccattg tctcaactcc 1920
ggctagcgaa ttctcgactc attcctttgc cctcgacga gtgctggggc gtcggttcc 1980
actatcggcg agtacttcta cacagccatc ggtccagacg gccgcgctc tcgggcgat 2040
ttgtgtacgc ccgacagtcc cggctccgga tcggacgatt gcgtcgatc gacctgcgc 2100
ccaagctgca tcatcgaaat tgccgtcaac caagctctga tagagttggt caagaccaat 2160
gcgagacata tacgcccgga gtcgtggcga tcctgcaagc tccggatgcc tccgctcgaa 2220
gtagcgcgtc tgctgtcca tacaagccaa ccacggcctc cagaagaaga tgttggcgac 2280
ctcgtattgg gaatccccga acatcgctc gctccagtca atgaccgctg ttatgcggcc 2340
attgtccgtc aggacattgt tggagccgaa atccgcgtgc acgaggtgcc ggacttcggg 2400
gcagtctcg gccaaagca tcagctcatc gagagcctgc gcgacggacg cactgacggt 2460
gtcgtccatc acagtttgc agtgatacac atggggatca gcaatcgcg atatgaaatc 2520
acgccatgta gtgtattgac cgattcctg cggctccgaat gggccgaacc cgctcgtctg 2580
gctaagatcg gccgcagcga tcgcatccat agcctccgcg accggttga gaacagcggg 2640
cagttcggtt tcaggcaggt ctgcaacgt gacaccctgt gcacggcggg agatgcaata 2700

ggtcaggctc tcgctaaact ccccaatgtc aagcacttcc ggaatcggga gcgcggccga 2760
tgcaaagtgc cgataaacat aacgatcttt gtgaaacca tcggcgcagc tatttaccg 2820
caggacatat ccacgccctc ctacatcgaa gctgaaagca cgagattctt cgccctccga 2880
gagctgcac aggtcggaga cgctgtcgaa ctttcgatc agaaacttct cgacagacgt 2940
cgcggtgagt tcaggctttt tcatgatggc cctcctaccg gtgatctcag ctgtaggaaa 3000
gagaagaagg ttagtagtcg acatggtggc cctcctatag tgagtcgtat tatactatgc 3060
cgatatata tgccgatgat taattgtcaa cactaggcgc cggtcacaac tagtagatat 3120
cacttacgtg ttgagaggcg gcatgcgata agaggtgtaa ttacctgaga acatcttgtt 3180
gccctgcttt ccgtgcgaaa tactaccggt acttttggga aacaaggga caggaggcg 3240
ctgctgtgcg cggttctgag tgttcaggat tgaagctgaa gaaggtgctg aggaagcgta 3300
gaactgttgc ggacgcgagt tctgagaaga gctgtaccga ttggtgaaag ccgaagaagt 3360
gagttggtgc cctgttcct ggataatgtt tgcaactcgc tggttctgca gagacggaga 3420
caaatgctgg ctacgatgtt gctgattcag gttgatacct cggtcgagac actgttttgg 3480
ttgataggg tggatttgg tgcagagaag agaaaggaag gtcaaagagg gaaaactggg 3540
cggagggaag gattttgtat caggcagcaa actgccactg cagtggccct ggcagtgccg 3600
ggcgaggcac ccacgcacgg ccgcgcaacc ggttggctct tgcccaccac gaaaccctc 3660
tgaaaggta gatggaagtg tgcgacagt gcggtccca agccaatgca ggcgccatgc 3720
actccccacc cgcaagattc actgtgcgtt cttattggtt gccgcaaggc cagccaaagg 3780
gggaagtatg agtcacagca ccgatacaag aaaattgcag aactaacata tggatgcgcg 3840
cgctattctg tagagctctg ggcaaagcac caatcctgcg ggtcggta caactagca 3900
ctgccattct ggccgtcaag accgaaactg tcagcgtggc caccgagacc ggtaccagca 3960
cggcggagag caccgcagac agcacctctg gcgacagcac gggtgctgcc acgacttcta 4020
ccccgaaatc atcatcttcc accacctcta gcgccgaaag cacggagacg tccaacggca 4080
gccccttga caagcgcgtc actgcgtttg gtgccggcct ggttggcgtc gtttgggtg 4140
ctgcggtctt gttgtaagat ggattcaagt tggttcgtt gatttgtatc gtcaaatcag 4200
tatcagatac ccatctactt ctgccatgc tttctgctc tttgttctt tttttgatg 4260
ttaccaaggg gcttgagctt gttggcctaa attccccct aatgctctt gtatgatggc 4320
tgaacgttg gagaggggat ggtttgttc tatgacatt gccgcgtaac gaggcagac 4380

tttattatat taatgcatga ggatatgttg tacatgaggt gtgaagagcc cttgcttatt 4440
tatgggtgtgg tgtggctcga cgccgaccaa ccctgtcatc gtgttcttgt tattatgcca 4500
cgcgctatcc tagctgaaat acgggaaccg ataattgccc tcgcgttggt aaccctcgcg 4560
tttgaaccc ttgcgttggt aaccctcgaa aaccgtgttt ccccttttc atatatgctt 4620
tttcatcttc ttctatcca atatctgcgg ttttggttc atctagtga actgtaatcg 4680
tagtgagag tagtgtttt aggccagtaa tggttatagt tgtgattgt tctgaagtat 4740
tctgattcag cctgggtggca ctgatattcg tcgtcgacaa aggtatctcg gtcgacaaag 4800
gtatgctggt cgaggcgggt gtatcgtcgt cgtcagagga ggaagaggac gagtaggtcc 4860
tgacggccga gttgccgacg aagacgaggc tgacggtgaa gatggcgagg acggaggcac 4920
agaggaggcc catggccagg tagcggatgc gcggtcgta gcggtggggg gaagagcccc 4980
agggggtgcg ggtgtgggtt tggcattgga ggtgtcgat catttatacg gtttttttc 5040
tcttgtttg atttttagg ttgttgagc ttgattgatg ttgctgaagt atgtggtga 5100
gaatt 5105

<210> 2

<211> 1122

<212> DNA

<213> Trichoderma reesei

<400> 2

atgcgttggt cttcggtgc cgttcgctg gcgagcgcca aatccttgc cgtggcgctg 60
gatcccgctt ccgtcgtggg aaacaagttc ttcaacaagg acggctcgca gttctttatc 120
aagggcattg cgtaccagct tgttcgcag gacccctcg tggacactga ccagtgcaaa 180
cgcatgcta agctcatggc cgagctcgga acaaacacca tccgctcta tcacgtcgac 240
ccggacgccg accatgacgg ctgcatgagt gcgtttgacg acgccggcat ctacgtcctt 300
gctgatctgg ataccttga tacctacatt attccccaaa ataactactg gaataagaca 360
aagttcgaca ggtatgccga ggtcctggac acgttcaaaa agtacgacaa cctcctgggc 420
gtcttcgtcg gaaacgagaa catcgtact aaagatgact cgccacggc gccctacctc 480
aaggctgctg cccgcgacat gaaggcgtac cgcgacgccc agggctaccg cgagatcccc 540
gtcggctact cggccgccga tatcttcag cttcgcccca tgcctcagga ctacctgacc 600
tgccggcgga actcgtccga gacagtcgac ttctcgccc tcaactcgta ctcgtggtgc 660

gacccagca cgtacaagga gtccacctac gaccagcttg aggctacgc caagaaattc 720
cccgtagcca tcttctctc cgagacaggg tgcacgttc ccggccctcg ccagttcgac 780
gaccaggacg ccatctttgg ccctgagatg gtcaatgact ggagcggcgc catcatctac 840
gagtggattc aggaggaaaa cggctacgga attataacat atgccccagc cggccaagct 900
gctggaccca acgtcgaggg tggcttcctt cgcaagggca ctcccacgcc aaagctgccc 960
gacttcaccg cgctcaagtc caagtgggcg accaacaccc ctaccggcgt cagccgagac 1020
gactacgacg caaaggacgt gtcgacccgt gcgtgtcctt cgtccactgc cggcggctgg 1080
tggcaggtgg atggcgatgc caaattgccc accctgggccc ag 1122

<210> 3

<211> 374

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 3

Met Arg Trp Ser Ser Val Ala Val Ala Leu Ala Ser Ala Lys Ser Phe
1 5 10 15

Ala Val Ala Leu Asp Pro Val Ser Val Val Gly Asn Lys Phe Phe Asn
20 25 30

Lys Asp Gly Ser Gln Phe Phe Ile Lys Gly Ile Ala Tyr Gln Leu Val
35 40 45

Pro Gln Asp Pro Leu Val Asp Thr Asp Gln Cys Lys Arg Asp Ala Lys
50 55 60

Leu Met Ala Glu Leu Gly Thr Asn Thr Ile Arg Val Tyr His Val Asp
65 70 75 80

Pro Asp Ala Asp His Asp Gly Cys Met Ser Ala Phe Asp Asp Ala Gly
85 90 95

Ile Tyr Val Leu Ala Asp Leu Asp Thr Phe Asp Thr Tyr Ile Ile Pro
100 105 110

Gln Asn Asn Tyr Trp Asn Lys Thr Lys Phe Asp Arg Tyr Ala Glu Val
115 120 125

Leu Asp Thr Phe Gln Lys Tyr Asp Asn Leu Leu Gly Val Phe Val Gly
130 135 140

Asn Glu Asn Ile Ala Thr Lys Asp Asp Ser Pro Thr Ala Pro Tyr Leu
145 150 155 160

Lys Ala Ala Ala Arg Asp Met Lys Ala Tyr Arg Asp Ala Gln Gly Tyr
165 170 175

Arg Glu Ile Pro Val Gly Tyr Ser Ala Ala Asp Ile Leu Gln Leu Arg
180 185 190

Pro Met Leu Gln Asp Tyr Leu Thr Cys Gly Gly Asn Ser Ser Glu Thr
195 200 205

Val Asp Phe Phe Ala Leu Asn Ser Tyr Ser Trp Cys Asp Pro Ser Thr
210 215 220

Tyr Lys Glu Ser Thr Tyr Asp Gln Leu Glu Ala Tyr Ala Lys Lys Phe
225 230 235 240

Pro Val Pro Ile Phe Leu Ser Glu Thr Gly Cys Ile Val Pro Gly Pro
245 250 255

Arg Gln Phe Asp Asp Gln Asp Ala Ile Phe Gly Pro Glu Met Val Asn
260 265 270

Asp Trp Ser Gly Ala Ile Ile Tyr Glu Trp Ile Gln Glu Glu Asn Gly
275 280 285

Tyr Gly Ile Ile Thr Tyr Ala Pro Ala Gly Gln Ala Ala Gly Pro Asn
290 295 300

Val Glu Gly Gly Phe Leu Arg Lys Gly Thr Pro Thr Pro Lys Leu Pro
305 310 315 320

Asp Phe Thr Ala Leu Lys Ser Lys Trp Ala Thr Asn Thr Pro Thr Gly
325 330 335

Val Ser Arg Asp Asp Tyr Asp Ala Lys Asp Val Ser Thr Arg Ala Cys
340 345 350

Pro Ser Ser Thr Ala Gly Gly Trp Trp Gln Val Asp Gly Asp Ala Lys
355 360 365

Leu Pro Thr Leu Gly Gln
370

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Amorce

<400> 4
gactaagaga gagagagagg gagc 24

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Amorce

<400> 5
aattctcaac cacatacttc agca 24

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Amorce

<400> 6
aacacccaat acgccggc 18

<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Amorce

<400> 7
gctctgggca aagcaccaa 19

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Amorice

<400> 8
gtgcgggatg catgaagacg 20

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Amorice

<400> 9
ccaccctacg attctgcaac c 21

<210> 10
<211> 1302
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Séquence 5' en amont du gène ID78713 (GEL3)

<400> 10
gactaagaga gagagagagg gagcattggc ctctatcgtg atgcctcggg gaatagagag 60
agtgagtgtg tgtgtggtat ttccactgc tgcgagcttc aattgagagc aatggccatg 120
atattacaca aggttcctac ctaggtaagg taatgcaagg tactacagcg aggtacagta 180
atactagcac gcaaacaac atgggccgca acacgagagt cgtaaatccc atcgtctacc 240
tactgcctac gagtacatgt agcctcgtga ccaactcccc tccccccctt gtcctacgag 300
gctctttgtg cctggacagc acaggtttcc aaccgtcgca cctcgagcca agaaatccga 360
gccgtttagt agccaattga tgccggatcc tcttcacct cgtctggggc actttccacc 420
caccctgtt ttttttctc ttttctttt tgcgagctac tgctagtcgc attctggcag 480
ctaacggcaa agatggggaa attgaaaggc tagacaggac gatatacctg attttccctg 540
ttcgtatcgt atctggcttg aaaagatggg gggggcttga agcggaacta gtaggacagg 600
gcaggacggg acaggacagg acagggtaaa ggccaaggcc gaggtcgtgg tgcattgctgg 660
tgtacaagta cgatgccata acaatctcat catcgcgctt ctcttgctgg tggacgggat 720

ctgcagggtt cctcctctt ttctttacca ttctttgac tctctcggtg cctctgcagc 780
 cgctctttct tgcattcgcc ggcttcaatc gcggttgctg gggttattca ctgttgatc 840
 caatcactcg ctcttagat aaaaccact ggcttgccag ctgtcgaggc ccgtccgtcc 900
 accgctctcg ctctctcg tctcttcaa cctcgcctcg ctgcctcgt ctctctctgg 960
 gtcacgttgc gctcactttc ttggtttcc cccctttccg cctctggggg acaatctgtg 1020
 gccaaacaat tcttggttg ggacgagaaa aaaatccgcc ttgtgctcg ttccctctt 1080
 cttttacctt tctctcagtt tcggtttga acccattgac gagcttctt tcttggttg 1140
 ttggatctg ctgcaccaca tcgcgagccc ttcatcctc ccatcttct tttttttt 1200
 ctctgttcg ccaagagttt tggaacagt aacagaattc gattaccgc cgctccctt 1260
 tggaaccaac agcttacctg catttcgact gtgtgacaca cg 1302

<210> 11

<211> 2603

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 11

caagtgtacc tgtgcattct gggtaaacga ctcattagg agttgtaaaa aagtttcggc 60
 cggcgtattg ggtgttacgg agcattcact aggcaacat gcatcctac tattgtatac 120
 catcttagta ggaatgattt cgaggtttat acctacgatg aatgtgtgtc ctgtaggctt 180
 gagagtcaa ggaagaaaca tgcaattatc ttgcgaacc cagggtggt gacggaattt 240
 tcatagtcaa gctatcagag taaagaagag gagcatgtca aagtacaatt agagacaaat 300
 atatagtcgc gtggagccaa gagcggattc ctcagtctcg taggtctctt gacgaccgtt 360
 gatctgcttg atctcgtctc ccgaaaatga aaatagctct gctaagctat tcttctctt 420
 gccggagcct gaaggcgta ctaggttgca gtcaatgcat taatgcattg cagatgagct 480
 gtatctggaa gaggtaaacc cgaaaacgcg tttattctt gttgacatgg agctattaaa 540
 tcactagaag gcactcttg ctgcttgac aaatgaacgt atcttatcga gatcctgaac 600
 accattgtc tcaactccg ctagcgaatt ctgcactcat tccttgccc tcggacgagt 660
 gctggggcgt cggttccac tatcggcgag tacttctaca cagccatcgg tccagacggc 720
 cgcgctctg cgggcgatt gtgtacgcc gacagtccc gctccgcat ggacgattgc 780
 gtgcacga cctgcgccc aagctgcat atcgaaatt ccgtcaacca agctctgata 840

gagttggtca agaccaatgc ggagcatata cgcccggagt cgtggcgatc ctgcaagctc 900
cggatgcctc cgctcgaagt agcgcgtctg ctgtccata caagccaacc acggcctcca 960
gaagaagatg ttggcgacct cgtattggga atccccgaac atcgctcgc tccagtcaat 1020
gaccgctgtt atgcggccat tgtccgtcag gacattgttg gagccgaaat ccgctgcac 1080
gaggtgccgg acttcggggc agtcctcggc ccaaagcatc agtcacga gagcctgcgc 1140
gacggacgca ctgacggtgt cgtccatcac agtttgccag tgatacatat ggggatcagc 1200
aatcgcgcat atgaaatcac gccatgtagt gtattgaccg attccttgcg gtccgaatgg 1260
gccgaacccg ctgctctggc taagatcggc cgcagcgatc gcatccatag cctccgcgac 1320
cggttgtaga acagcgggca gttcggtttc aggcaggtct tgcaacgtga caccctgtgc 1380
acggcgggag atgcaatagg tcaggctctc gctaaactcc ccaatgtcaa gcacttccgg 1440
aatcgggagc gcggccgatg caaagtgccg ataaacataa cgatcttgt agaaaccatc 1500
ggcgcagcta ttaccgcga ggacatatcc acgcccctct acatcgaagc tgaaagcacg 1560
agattcttcg ccctccgaga gctgcatcag gtcggagacg ctgtcgaact ttctgatcag 1620
aaacttctcg acagacgtcg cggtagttc aggccttttc atgatggccc tcctaccggt 1680
gatctcagct gtaggaaaga gaagaagggt agtagtcgac atggtggccc tcctatagt 1740
agtcgtatta tactatgccg atatactatg ccgatgatta attgtcaaca ctaggcgccg 1800
gtcacaacta gtagatatca cttacgtgtt gagaggcggc atgcgataag aggtgtaatt 1860
acctgagaac atcttgttc cctgcttcc gtgcgaaata ctaccggtac tttgggaaa 1920
caagggaaca ggagggcgct gctgtgcgcg gttctgagt ttccaggattg aagctgaaga 1980
aggtgctgag gaagcgtaga actgttcgg acgcgagttc tgagaagagc tgtaccgatt 2040
ggtgaaagcc gaagaagtga gttggtgccc tgtgcctgg ataattgttg caactcgtg 2100
gttctgcaga gacggagaca aatgctggct acgatgttc tgattcaggt tgatacctc 2160
gtcgagacac tgttttggt tgatagggtg gatttggtg cagagaagag aaaggaaggt 2220
caaagagggg aaactgggcg gaggggaagga tttgtatca ggcagcaaac tgccactgca 2280
gtggccctgg cagtgccggg cgaggcacc acgcacggcc gcgcaaccgg ttggtcctg 2340
cccaccacga aaccttctg aaaggtcaga tggaagtgtg cgacagtgcg cgtccccaag 2400
ccaatgcagg cgccatgcac tccccaccg caagattcac tgtcgttct tattggttc 2460
cgcaaggcca gccaaagggg gaagtatgag tcacagcacc gatacaagaa aattgcagaa 2520

ctaacatatg gatgcgcgcg ctattctgta gagctctggg caaagcacca atcctgcggg 2580

tcggtacaca cactagcact gcc 2603

<210> 12

<211> 1200

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Séquence 3' en aval du gène ID78713 (GEL3)

<400> 12

attctggccg tcaagaccga aactgtcagc gtggccaccg agaccggtac cagcacggcg 60

gagagcaccg cagacagcac ctctggcgac agcacgggtg ctgccacgac ttctaccccg 120

aaatcatcat ctccaccac ctctagcgcc gaaagcacgg agacgtccaa cggcagcccc 180

ttggacaagc gcgtcactgc gtttggtgcc ggcctgggtg gcgtcgttt ggggtgctgcg 240

gtcttgttgt aagatggatt caagttgggt cgttggattt gtatcgtcaa atcagtatca 300

gatacccatc tacttctcgc catgcttttc tgctctttgt ttctttttt tgatgttacc 360

aaggggcttg agcttgttgg cctaaattcc cccctaattg tctttgatg atggctgaac 420

gtttggagag gggatggtt ttgtctatga cattgccgc gtaacgaggc atgactttat 480

tatattaatg catgaggata tgtgtacat gaggtgtgaa gagcccttgc ttatttatgg 540

tgtggtgtgg tctgacgccg accaaccctg tcatcgtgtt cttgttatta tgccacgcgc 600

tatcctagct gaaatacggg aaccgataat tgccctcgcg ttgtgaacct tcgcttgtg 660

aacccttgcg ttgtgaacct tcgaaaaccg tgtttcccc tttcatata tgcttttca 720

tcttcttct atccaatatc tgcggtttg gtttcatcta gtggaactgt aatcgtaggt 780

gagagtagtg ttttaggcc agtaatgggt atagttgtga ttgtttctga agtattctga 840

ttcagcctgg tggcactgat attcgtcgtc gacaaaggta tctcggtcga caaaggtatg 900

ctggtcgagg cggttgtatc gtcgtcgtca gaggaggaag aggacgagta ggtcctgacg 960

gccgagttgc cgacgaagac gaggctgacg gtgaagatgg cgaggacgga ggcacagagg 1020

aggcccatgg ccaggtagcg gatgcgcggg tcgtagcggg ggggggaaga gcccagggg 1080

gtgcgggtgt gggtttgcca ttggaggttg tcgatcattt atacggtttt tttctcttg 1140

tttgatttt gtaggttgtt tgagcttgat tgatgttgct gaagtatgtg gttgagaatt 1200

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 877686
FR 1913766

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	WO 2012/145592 A1 (DANISCO US INC [US]; BODIE ELIZABETH A [US] ET AL.) 26 octobre 2012 (2012-10-26)	1-3,5-15	C12N1/15 C12N15/80 C12N9/42
Y	* exemple 1 *	4	C12N9/24 C12P1/02
X,D	WO 2012/145584 A1 (DANISCO US INC [US]; BODIE ELIZABETH A [US] ET AL.) 26 octobre 2012 (2012-10-26) * exemple 5 *	1-3,5-15	C12P21/00 C12P19/14 C12P7/10 C12R1/885
X	KAMEI MASAYUKI ET AL: "Deletion and expression analysis of beta-(1,3)-glucanosyltransferase genes inNeurospora crassa", FUNGAL GENETICS AND BIOLOGY, SAN DIEGO, CA, US, vol. 52, 27 décembre 2012 (2012-12-27), pages 65-72, XP029000808, ISSN: 1087-1845, DOI: 10.1016/J.FGB.2012.12.001 * le document en entier *	1-3,5-7	
Y,D	DATABASE UniProt [Online] 8 mai 2019 (2019-05-08), "RecName: Full=1,3-beta-glucanosyltransferase {ECO:0000256 RuleBase:RU361209}; EC=2.4.1.- {ECO:0000256 RuleBase:RU361209}; Flags: Fragment;"; XP55720560, extrait de EBI accession no. UNIPROT:G0RL27 Database accession no. G0RL27 * séquence *	4	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C07K C12N C12R
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
6 août 2020		Lejeune, Robert	
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 877686
FR 1913766

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	DATABASE UniProt [Online] 31 juillet 2019 (2019-07-31), "RecName: Full=1,3-beta-glucanoglucanotransferase {ECO:0000256 RuleBase:RU361209}; EC=2.4.1.- {ECO:0000256 RuleBase:RU361209}"; XP55720561, extrait de EBI accession no. UNIPROT:A0A024SD41 Database accession no. A0A024SD41 * séquence *	4	
A	ISABELLE MOUYN ET AL: "Deletion of GEL2 encoding for a [beta](1-3)glucanoglucanotransferase affects morphogenesis and virulence in Aspergillus fumigatus : GEL deletions affect A. fumigatus morphogenesis and virulence", MOLECULAR MICROBIOLOGY., vol. 56, no. 6, 29 avril 2005 (2005-04-29) , pages 1675-1688, XP055716077, GB ISSN: 0950-382X, DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04654.x * le document en entier *	1-15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
6 août 2020		Lejeune, Robert	
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 1913766 FA 877686**

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 **06-08-2020**
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 2012145592 A1	26-10-2012	AU 2012245319 A1	22-08-2013
		AU 2012245323 A1	19-09-2013
		AU 2012245325 A1	19-09-2013
		AU 2017235968 A1	19-10-2017
		BR 112013025434 A2	29-11-2016
		BR 112013026535 A2	29-11-2016
		BR 112013026559 A2	29-11-2016
		CA 2833539 A1	26-10-2012
		CA 2833756 A1	26-10-2012
		CA 2833765 A1	26-10-2012
		CN 103502266 A	08-01-2014
		CN 103502430 A	08-01-2014
		CN 103517981 A	15-01-2014
		DK 2673290 T3	14-11-2016
		DK 2699667 T3	01-08-2016
		DK 2699668 T3	26-02-2018
		EP 2673290 A1	18-12-2013
		EP 2699667 A1	26-02-2014
		EP 2699668 A1	26-02-2014
		JP 6042867 B2	14-12-2016
		JP 6042869 B2	14-12-2016
		JP 6042870 B2	14-12-2016
		JP 2014513530 A	05-06-2014
		JP 2014513532 A	05-06-2014
		JP 2014513533 A	05-06-2014
		KR 20140033046 A	17-03-2014
		KR 20140033047 A	17-03-2014
		KR 20140033049 A	17-03-2014
		US 2014127817 A1	08-05-2014
		US 2014220689 A1	07-08-2014
		US 2014315313 A1	23-10-2014
		WO 2012145592 A1	26-10-2012
		WO 2012145596 A1	26-10-2012
		WO 2012145598 A1	26-10-2012

WO 2012145584 A1	26-10-2012	AR 086200 A1	27-11-2013
		AR 086201 A1	27-11-2013
		AU 2012245322 A1	22-08-2013
		AU 2012245402 A1	22-08-2013
		AU 2017202753 A1	18-05-2017
		BR 112013025203 A2	29-11-2016
		BR 112013025430 A2	29-11-2016
		CA 2833541 A1	26-10-2012
		CA 2833660 A1	26-10-2012
		CN 103502431 A	08-01-2014
		CN 103517916 A	15-01-2014

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1913766 FA 877686**

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 **06-08-2020**

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
		DK 2663633 T3	23-05-2016
		DK 2699588 T3	13-03-2017
		DK 3000870 T3	30-04-2018
		EP 2663633 A1	20-11-2013
		EP 2699588 A1	26-02-2014
		EP 3000870 A1	30-03-2016
		JP 6042866 B2	14-12-2016
		JP 6042868 B2	14-12-2016
		JP 2014513529 A	05-06-2014
		JP 2014513531 A	05-06-2014
		KR 20140033048 A	17-03-2014
		KR 20140033053 A	17-03-2014
		US 2014094587 A1	03-04-2014
		US 2014099721 A1	10-04-2014
		WO 2012145584 A1	26-10-2012
		WO 2012145595 A1	26-10-2012
