

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
26 juillet 2007 (26.07.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/083071 A2

(51) Classification internationale des brevets :
C12P 7/26 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2007/050674

(22) Date de dépôt international :
22 janvier 2007 (22.01.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0650237 23 janvier 2006 (23.01.2006) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE - INRA [FR/FR]; 147 Rue de
l'Université, F-75341 Paris Cedex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : FERON,
Gilles [FR/FR]; 41 Rue du Paquier du Bois, F-21270
Pontailler Sur Saone (FR). BLIN, Caroline [FR/FR]; 28,
rue de la Garonne, F-31120 Roquettes (FR). MAUVAIS,
Geneviève [FR/FR]; 26 Avenue Recteur Marcel Bouchard,
F-21640 Gilly Les Citeaux (FR).

(74) Mandataires : CATHERINE, Alain etc.; Cabinet
HARLE et PHELIP, 7, rue de Madrid, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport
— avec la partie réservée au listage des séquences de la des-
cription publiée séparément sous forme électronique et dis-
ponible sur demande auprès du Bureau international

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: PROCESS FOR PREPARING A PRECURSOR OF AN AROMATIC COMPOUND BY BIOSYNTHESIS

(54) Titre : PROCEDE POUR LA PREPARATION D'UN PRECURSEUR D'UN COMPOSE AROMATIQUE, PAR BIOSYN-
THESE

(57) Abstract: The present invention relates to the field of the enzymatic or biological synthesis of aromatic compounds. The
invention relates more particularly to a process for obtaining an aromatic compound precursor, in particular a raspberry ketone pre-
cursor, by enzymatic bioconversion.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte au domaine de la synthèse de composés aromatiques par voie enzymatique ou biolo-
gique. L'invention est plus particulièrement relative à un procédé d'obtention d'un précurseur de composés aromatiques, notamment
un précurseur de cétone framboise, par bioconversion enzymatique.

WO 2007/083071 A2

**PROCEDE POUR LA PREPARATION D'UN PRECURSEUR D'UN
COMPOSE AROMATIQUE, PAR BIOSYNTHESE**

DOMAINE DE L'INVENTION

5 La présente invention se rapporte au domaine de la synthèse de composés aromatiques par voie enzymatique ou biologique.

 L'invention est plus particulièrement relative à un procédé d'obtention d'un précurseur de composés aromatiques, notamment un précurseur de cétone framboise, par bioconversion enzymatique

10 **.ART ANTERIEUR**

 En général, chaque arôme naturel est constitué de plusieurs centaines de composés volatils. Toutefois, parmi les nombreux composés volatils constitutifs d'un arôme naturel, un composé volatil, ou un nombre restreint de composés volatils, confère à lui seul la note olfactive
15 caractéristique dudit arôme.

 A ce jour, plus de 230 composés volatils ont été identifiés comme étant constitutifs de l'arôme framboise. Toutefois, la note olfactive de l'arôme framboise naturel lui est conférée essentiellement, sinon exclusivement, par le composé 4-(4'-hydroxyphényl) butane-2-one, qui est
20 aussi appelé para-hydroxyphényl-butane-2-one ou « cétone framboise », ou encore « frambinone ».

 La cétone framboise est une molécule aromatique très recherchée en agro-alimentaire. Dans ce domaine, la cétone framboise n'est pas seulement utilisée en tant qu'arôme framboise. La cétone framboise est
25 également employée dans divers mélanges aromatiques, notamment des mélanges aromatiques de pêche, d'ananas, de fraise, de kiwi ou encore de cerise. La cétone framboise est également utilisée pour ses capacités à fournir une note fruitée dans certains mélanges aromatiques en parfumerie, en cosmétique et en pharmacie.

30 Les fruits de framboise représentent à ce jour la seule source permettant l'extraction directe de la cétone framboise. Toutefois, la cétone

framboise est présente à de très faibles concentrations dans le fruit, de l'ordre de 0,1mg/l de jus de framboise. En conséquence, le prix de revient de la cétone framboise obtenue par extraction directe à partir du fruit n'est pas compatible avec les contraintes économiques liées à la fabrication de produits industriels, notamment alimentaires et cosmétiques, qui doivent être d'un prix de revient modéré lorsqu'ils sont destinés à une large diffusion auprès du public.

Pour pallier ces contraintes techniques et économiques, on a décrit, dans l'état de la technique divers procédés de synthèse chimique de la cétone framboise. On a ainsi décrit un procédé de synthèse chimique de la cétone framboise par condensation de phénol avec la méthyl-vinylcétone, en présence d'un catalyseur approprié. Cependant, ce procédé de synthèse chimique présente de nombreux inconvénients. La méthyl-vinylcétone est un composé difficile à synthétiser, et qui de plus est instable. En outre, le phénol est un produit de synthèse toxique qui provoque des brûlures graves sur la peau.

On a aussi décrit un procédé de synthèse chimique de cétone framboise en deux étapes, respectivement (i) une étape de synthèse du para-hydroxyphényl-3-buten-2-one par condensation du parahydroxybenzaldéhyde avec la cétone, suivie (ii) d'une étape d'hydrogénation catalytique du parahydroxyphényl-3-buten-2-one pour obtenir le parahydroxyphényl-butan-2-one ou cétone framboise. La cétone framboise obtenue par un tel procédé est classée comme un arôme « nature-identique », du fait qu'elle est chimiquement identique à la cétone framboise naturelle mais qu'elle a été obtenue par synthèse chimique.

Toutefois, il existe un besoin dans l'industrie pour des arômes naturels, c'est-à-dire des substances aromatisantes chimiquement définies et qui sont obtenues à partir des sources naturelles, soit par des procédés physiques appropriés, y compris la distillation et l'extraction par

solvant, soit par des procédés enzymatiques ou microbiologiques, à partir de la matière d'origine végétale ou animale.

Dans cet objectif de synthèse d'un composé d'arôme cétone framboise naturelle, il a antérieurement été mis au point un procédé
5 comprenant deux étapes de biosynthèse, respectivement (i) une étape de condensation du 4-coumaroyl-CoA avec le malonyl-CoA, puis (ii) une étape de décarboxylation du composé intermédiaire produit lors de l'étape précédente afin d'obtenir le 4-(4'-hydroxy-phényl)-but-3-ene-2-one. Puis le 4,4'-hydroxyphényl)-but-3-ene-2-one est réduit en cétone framboise par
10 catalyse enzymatique en présence de NADPH (Borejsza-wysocki et Hrazdina, 1994, Biosynthesis of p-hydroxyphenylbutane-2-one in Raspberry fruits and tissue cultures, Phytochemistry, vol. 35 : 623). En dépit de son apparente simplicité, ce procédé de biosynthèse de cétone framboise apparaît peu économique, notamment du fait qu'il nécessite
15 l'extraction préalable des enzymes de bioconversion à partir de tissus végétaux et aussi parce qu'il nécessite l'utilisation de co-facteurs tels que CoA SH, de l'APP et du NADPH.

Il a également été décrit un procédé d'obtention de cétone framboise par bioconversion du 3-(4'-hydroxyphényl)-1-méthyl-propyl-
20 bêta-D-glucopyranoside, aussi appelé bétuloside ou rhododendrine, par actions successives d'une bêta-glucosidase, puis d'une alcool secondaire déhydrogénase (ASDH), comme cela est décrit dans la demande PCT N°WO 99/49 069. Dans ce procédé de biosynthèse, le produit de départ, qui est le composé bétuloside, est extrait à partir du bouleau. Bien que ce
25 procédé de biosynthèse apparaisse satisfaisant sur le plan technique, son utilisation industrielle à des coûts modérés est incertaine, essentiellement du fait de la faible disponibilité du produit de départ, et, bien que dans une moindre mesure, aussi du fait de la nécessité d'utiliser des enzymes purifiées à partir de substances naturelles.

Il existe donc toujours un besoin dans l'état de la technique pour des procédés d'obtention de composés aromatiques, notamment de cétone framboise, par biosynthèse totale ou partielle, alternatifs aux procédés connus.

- 5 Notamment, il existe un besoin dans l'état de la technique pour de nouveaux procédés de biosynthèse de composés aromatiques, notamment de la cétone framboise, qui soient d'un prix de revient modéré.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

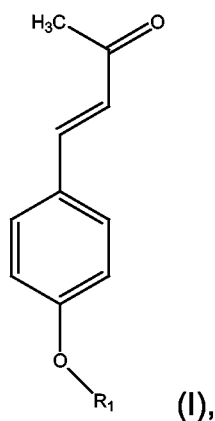
- 10 Il est fourni selon l'invention un nouveau procédé de préparation par biosynthèse de précurseurs aromatiques du type phényl-3-butèn-2-one substituée en position para, à partir de produits de départ naturels ou synthétiques aisément accessibles.

- 15 De manière surprenante, on a montré selon l'invention que les composés précurseurs aromatiques du type phényl-3-butèn-2-one substitués en position para pouvaient être obtenus grâce à une étape de condensation, par aldolisation enzymatique, de l'acétone avec un benzaldéhyde substitué en position para.

- 20 Ainsi, de manière surprenante, on a montré selon l'invention, que la réaction d'aldolisation entre l'acétone et un benzaldéhyde substitué par un hydroxy ou un alcoxy en position para, qui était jusqu'à aujourd'hui réalisée exclusivement par synthèse chimique, pouvait être réalisée par voie microbiologique.

- 25 Plus précisément, on a montré selon l'invention que l'étape d'aldolisation de l'acétone avec un composé benzaldéhyde substitué en position para par un groupe hydroxy ou alcoxy, afin de produire des précurseurs aromatiques du type phényl-3-butèn-2-one substitués en position para par un groupe hydroxy ou alcoxy, pouvait être réalisée par une étape de bioconversion enzymatique catalysée par une déoxyribose-phosphate aldolase (DERA).

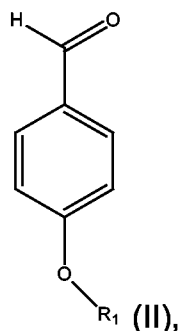
La présente invention a pour objet un procédé pour la préparation par biosynthèse du composé de formule (I) suivant :



dans laquelle R_1 représente l'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié non substitué ayant de 1 à 4 atomes de carbone, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

a) ajouter :

(i) un composé de formule (II) suivante :



10 dans laquelle R_1 représente l'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié non substitué ayant de 1 à 4 atomes de carbone, et

(ii) de l'acétone,

dans un milieu réactionnel comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase ; et

15 b) récupérer le composé de formule (I), à partir du milieu obtenu à la fin de l'étape a).

Ainsi, on a montré selon l'invention qu'une aldolase particulière, la déoxyribose 5-phosphate aldolase, encore appelée DERA, était capable

de convertir un benzaldéhyde substitué en position para en un phényl-3-butèn-2-one possédant le même substituant en position para, en présence d'acétone.

La 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase est une aldolase de classe I qui est connue pour sa capacité à catalyser la condensation de l'acétaldéhyde et du D-glycéraldéhyde-3-phosphate pour produire du 2-déoxyribose-5-phosphate.

La DERA est classée, selon la nomenclature internationale, dans la classe d'aldolases EC 4.1.2.4. L'activité catalytique spécifique de la DERA peut être aisément vérifiée par l'homme du métier, par exemple en utilisant la technique décrite par WONG et al. (2003, Bioorganic and Medicinal Chemistry, Vol. 11: 43-52; Section "Experimental", sous-section "DERA addition (aldol) assay")

Dans les composés de formule (I) et (II), le groupe R_1 représente l'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié non substitué ayant 1,2,3 ou 4 atomes de carbone.

Selon un premier aspect préféré, le composé de formule (II) est tel que R_1 représente un atome d'hydrogène. Dans ce mode de réalisation particulier, le composé de formule (II) est un composé de parahydroxybenzaldéhyde permettant, grâce au procédé de l'invention, de préparer le composé de formule (I) consistant en le parahydroxyphényl-3-butèn-2-one, aussi désigné 4-OH-benzylidène acétone, qui est un précurseur de la cétone framboise.

Selon un second aspect préféré, le composé de formule (II) est tel que le groupe R_1 représente un groupe $-CH_3$. Selon ce second aspect particulier, le composé de formule (II) consiste en le paraméthoxybenzaldéhyde, qui est aussi appelé anisaléhyde. Selon ce second aspect particulier, le composé de formule (I) obtenu selon le procédé de l'invention est le paraméthoxyphényl-3-butèn-2-one, qui est

aussi appelé anisylidène acétone, qui peut être également un composé précurseur de la cétone framboise.

Les produits de départ utilisés dans le procédé de biosynthèse de l'invention sont aisément accessibles et peu onéreux. Par exemple, le
5 parahydroxybenzaldéhyde peut être obtenu par extraction à partir de diverses sources biologiques. Le parahydroxybenzaldéhyde est par exemple produit par des organismes tels que certains coléoptères comme *Agabus melanarius*, des hétéroptères comme *Ilyocoris cimicoides* et *Notonecta*, ou encore par des lépidoptères comme *Eldana saccharina*.

10 Egalement, le parahydroxybenzaldéhyde peut être libéré, par exemple par simple chauffage en présence d'émulsine d'une suspension aqueuse d'hurrine, qui est un glucoside analogue à l'amygdaline, cette dernière étant présente notamment dans les jeunes pousses de sorgho (*Sorghum vulgare*). On peut aussi obtenir le parahydroxybenzaldéhyde
15 naturel, par biodégradation de la picéide, un stylbène présent dans l'écorce de l'épicéa, comme décrit par Shiotsu et al. (1989, Mukuzai, vol. 35 : 826).

Le parahydroxybenzaldéhyde peut être également obtenu par synthèse chimique, notamment selon les techniques décrites par
20 Freudenberg et Gehrke (1951, Chem. Ber, vol.84 : 443-450) ou encore de Schoutissen (1935, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, vol.54 : 97-99). De plus, le parahydroxybenzaldéhyde est un composé que l'on peut trouver couramment dans le commerce.

Un composé de formule (II) comme le paraméthoxybenzaldéhyde
25 ou anisaldéhyde peut être obtenu à partir de sources naturelles telle que l'huile extraite de l'anis étoilé. L'anisaldéhyde est également un composé chimique que l'on peut trouver couramment dans le commerce.

L'acétone qui est utilisée dans la mise en œuvre du procédé de l'invention peut être obtenue à partir de sources naturelles, tels que les
30 plantes et les arbres. L'acétone est également produite par divers

microorganismes. L'acétone peut être obtenue par fermentation du glucose par des cultures de cellules bactériennes de *Clostridium acetobutylicum*. L'acétone est par ailleurs un composé que l'on trouve couramment dans le commerce.

5 Ainsi, grâce au procédé de l'invention, on peut désormais obtenir un précurseur naturel de la cétone framboise. De plus, lorsque ce précurseur naturel de cétone framboise est subséquentement converti en cétone framboise par voie microbiologique, le produit final est alors une cétone framboise qui consiste en un arôme naturel.

10 Selon un troisième aspect préféré, le procédé ci-dessus est caractérisé en ce qu'à l'étape a), on ajoute dans le milieu réactionnel une quantité en poids d'acétone en excès, par rapport au poids de composé (II). Préférentiellement, pour un poids (P) déterminé du composé de formule (II), on ajoute à l'étape a) au moins deux fois le poids (P)
15 d'acétone. Dans certains modes de réalisation du procédé, on ajoute à l'étape a) au moins 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ou 32 fois le poids (P) en acétone. A titre illustratif, on utilise dans les exemples un poids (P) de 0,5 g/l de composé de formule (II) pour 16 g/l d'acétone, soit 32 fois le poids
20 (P).

Dans certains modes de réalisation du procédé, l'étape b) comprend les étapes suivantes :

- b1) réaliser au moins un cycle de congélation puis décongélation du milieu obtenu à la fin de l'étape a) ;
- 25 b2) récupérer le composé de formule (I) à partir du milieu décongelé obtenu à la fin de l'étape b1).

Sans vouloir être lié par une quelconque théorie, le demandeur pense que le ou les cycle(s) de congélation puis décongélation entraînent une modification dans la mobilité du solvant, qui peut être l'eau, au niveau
30 du site catalytique de l'enzyme. Cette modification dans la mobilité du

solvant conduirait à une modification de la solubilité et à l'accumulation d'intermédiaires réactionnels, de nature à favoriser l'achèvement de la réaction d'aldolisation du composé de formule (II), et de l'étape de déshydratation finale aboutissant à la production du composé de formule (I).

On a montré que l'on pouvait avantageusement mettre en œuvre le procédé de l'invention avec un milieu réactionnel comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase ayant au moins 30% d'identité en acides aminés avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°1.

Le polypeptide de séquence SEQ ID N° 1 consiste en la séquence d'acides aminés de la 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase exprimée par *Escherichia coli*.

De manière générale, on sait dans l'état de la technique qu'une identité d'au moins 30 % en acides aminés, sur un segment d'au moins 100 acides aminés consécutifs, entre deux polypeptides signifie une relation structurelle et fonctionnelle forte entre ces deux polypeptides.

De plus, on a montré dans les exemples qu'un milieu réactionnel comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase de *Bacillus subtilis* ayant une identité en acides aminés de 36% avec la séquence SEQ ID N°1 était capable de catalyser la réaction d'aldolisation du composé de formule (II) pour produire le composé final de formule (I).

La 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase de *Bacillus subtilis* possède la séquence en acides aminés SEQ ID N°2 selon l'invention.

On a aussi montré dans les exemples qu'un milieu réactionnel comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase de *Bacillus cereus* ayant une identité en acides aminés de 38% avec la séquence SEQ ID N°1 était capable de catalyser la réaction d'aldolisation du composé de formule (II) pour produire le composé final de formule (I).

La 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase de *Bacillus cereus* possède la séquence en acides aminés SEQ ID N°3 selon l'invention.

Aux fins de la présente description, l'expression « séquence d'acides aminés » peut être employée pour désigner indifféremment un polypeptide ou une protéine. L'expression " séquence d'acides aminés " englobe le matériel protéique lui-même et n'est donc pas restreinte à l'information concernant sa séquence.

Selon l'invention, un premier polypeptide ayant au moins 30 % d'identité en acides aminés avec un second polypeptide de référence, possèdera au moins 30 %, de préférence au moins 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 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%, 97,5%, 98%, 98,3% 98,6%, 99%, ou au moins 99,5% d'identité en acides aminés avec ledit second polypeptide de référence.

Egalement, aux fins de la présente description, l'expression " séquence nucléotidique " peut être employée pour désigner indifféremment un polynucléotide ou un acide nucléique. L'expression " séquence nucléotidique " englobe le matériel génétique lui-même et n'est donc pas restreinte à l'information concernant sa séquence.

Les termes " acide nucléique ", " polynucléotide ", " oligonucléotide " ou encore " séquence nucléotidique " englobent des séquences d'ARN, d'ADN, d'ADNc ou encore des séquences hybrides ARN/ADN de plus d'un nucléotide, indifféremment sous la forme simple brin ou sous la forme de duplex.

Le terme " nucléotide " désigne les nucléotides naturels (A, T, G, C et U).

Aux fins de la présente invention, un premier polynucléotide est considéré comme étant " complémentaire " d'un second polynucléotide lorsque chaque base du premier nucléotide est appariée à la base

complémentaire du second polynucléotide dont l'orientation est inversée. Les « bases », complémentaires sont A et T (ou A et U), et C et G.

Selon l'invention, un premier acide nucléique ayant au moins 30 % d'identité avec un second acide nucléique de référence, possèdera au moins 30 %, de préférence au moins 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 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%, 97,5%, 98%, 98,3%, 98,6%, 99%, ou au moins 99,5% d'identité en nucléotides avec ledit second acide nucléique de référence.

Le « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acides aminés ou entre deux séquences d'acides nucléiques, au sens de la présente invention, est déterminé en comparant les deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison.

La partie de la séquence d'acides aminés ou de la séquence nucléotidique dans la fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des additions ou des délétions (par exemple des « gaps ») par rapport à la séquence de référence (qui ne comprend pas ces additions ou ces délétions) de manière à obtenir un alignement optimal entre les deux séquences.

Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions auxquelles un acide aminé identique, ou une base nucléique identique, est observée pour les deux séquences comparées, puis en divisant le nombre de positions auxquelles il y a identité entre les deux acides aminés, ou entre les deux bases nucléiques, par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le résultat par cent afin d'obtenir le pourcentage d'identité en acides aminés ou en nucléotides des deux séquences entre elles.

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus.

De manière tout à fait préférée, le pourcentage d'identité de séquence est déterminé à l'aide du logiciel BLAST, version 2.0, qui met en œuvre l'algorithme BLAST (pour « Basic Local Alignment Search Tool »), tel que défini par Karlin et Altschul (Karlin, Samuel and Stephen F. Altschul (1990) ; Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68. Karlin, Samuel and Stephen F. Altschul (1993); Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7).

Pour déterminer le pourcentage d'identité en nucléotides entre deux polynucléotides, on utilise préférentiellement le logiciel BLASTN, basé sur l'algorithme défini par Altschul et al. (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402), en utilisant les paramètres par défaut.

Pour déterminer le pourcentage d'identité en acides aminés entre deux polypeptides, on utilise préférentiellement le logiciel BLASTP, basé sur l'algorithme défini par Altschul et al. (Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-10), en utilisant les paramètres par défaut.

Pour déterminer le pourcentage d'identité en acides aminés entre deux polypeptides, on utilise préférentiellement le logiciel BLASTP, version 2.2.10 , dont les principes sont décrits par Tatusova et al. (Tatusova TA, Madden TL (1999) BLAST 2 S, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiol. Lett. 174:247-250), avec les paramètres fixés comme suit : (1) Matrix=BLOSUM62; (2) Gap

Open=11; (3) Gap Extension=1; (4) X_dropoff=15; (5) Expect=10.000000;
(6) Wordsize=3; (7) Filter (T/F) default =T

Ainsi, l'étape a) du procédé ci-dessus peut être réalisée en utilisant un milieu réactionnel comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase ayant au moins 30% d'identité en acides aminés avec la
5 séquence SEQ ID N°1 de *E. coli* et codée par un acide nucléique provenant (i) soit d'un organisme procaryote, (ii) soit d'un organisme eucaryote, à l'exclusion des champignons filamenteux.

Notamment, l'étape a) du procédé ci-dessus peut être réalisée en
10 utilisant un milieu réactionnel comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase provenant d'un organisme procaryote d'une espèce choisie parmi *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Corynebacterium* et *Shewanella*.

Plus particulièrement, l'étape a) du procédé ci-dessus peut être
15 réalisée en utilisant un milieu réactionnel comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase codée par un acide nucléique provenant d'un organisme procaryote choisi parmi *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* CFT073, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Photobacterium profundum*,
20 *Vibrio fischeri*, *Erwinia carotovora*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Colwellia psycherythraea*, *Shewanella baltica*, *Shewanella amazonensis*, *Shewanella frigidimarina*, *Shewanella denitrificans*, *Chromohalobacter salexigens*, *Burkholderia pseudomallei*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*,
25 *Idiomarina loihiensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*, *Magnetospirillum magnetotacticum*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Coxiella burnetii*, *Nocardioides* sp. JS614, *Paracoccus denitrificans*, *Mesorhizobium* sp. BNC1, *Silicibacter* sp. TM1040, *Rhodobacter sphaeroides*, *Bacteroides thetaiotaomicron*,
30 *Francisella tularensis*, *Bacteroides fragilis*, *Silicibacter pomeroyi*,

Burkholderia fungorum, *Jannaschia* sp. CCS1, *Porphyromonas gingivalis*,
Legionella pneumophila, *Treponema denticola*, *Bacillus cereus*,
Geobacillus kaustophilus, *Bacillus halodurans*, *Solibacter usitatus*,
Streptococcus suis, *Bacillus licheniformis*, *Listeria monocytogenes*,
5 *Deinococcus geothermalis*, *Chloroflexus aurantiacus*, *Rubrobacter*
xylanophilus, *Desulfitobacterium hafniense*, *Arthrobacter* sp. FB24,
Bacillus clausii, *Rhodospirillum rubrum*, *Staphylococcus haemolyticus*,
Corynebacterium glutamicum, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*,
Symbiobacterium thermophilum, *Thermococcus kodakarensis* et
10 *Exiguobacterium* sp. 255-15.

Dans un mode de réalisation particulier du procédé ci-dessus, le milieu réactionnel comprend une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase codée par *Bacillus subtilis*, de préférence la 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase de séquence SEQ ID N° 2.

15 Dans un autre mode de réalisation particulier du procédé ci-dessus, le milieu réactionnel comprend une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase codée par *Bacillus cereus*, de préférence la 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase de séquence SEQ ID N° 3.

Comme cela a été mentionné précédemment, l'étape a) du procédé
20 ci-dessus peut aussi être réalisée en utilisant un milieu réactionnel comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase codée par un acide nucléique provenant d'un organisme eucaryote, par exemple un organisme eucaryote choisi parmi *Homo sapiens*, *Gallus gallus*, *Canis familiaris*, *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans*, *Anopheles gambiae*,
25 *Danio rerio*, *Xenopus tropicalis*, *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium falciparum*, *Apis mellifera*, *Drosophila melanogaster*, *Entamoeba histolytica*, *Aspergillus fumigatus*, *Strongylocentrotus purpuratus*, et *Aspergillus nidulans*.

Pour les séquences d'acides aminés et les séquences
30 nucléotidiques correspondant aux divers organismes procaryotes ou

eucaryotes spécifiés ci-dessus, l'homme du métier se réfèrera
avantageusement à la colonne de gauche du Tableau 1 dans lequel, pour
chaque organisme procaryote ou eucaryote, est indiquée la référence
d'accès aux séquences correspondantes, dans la base de données du
5 NCBI (pour « National Center for Biotechnology Information »).

Aux fins de la présente description, un « milieu réactionnel »
comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase englobe à la fois (i)
un milieu réactionnel consistant en une culture de cellules procaryotes ou
de cellules eucaryotes produisant une 2-déoxyribose-5-phosphate
10 aldolase, et (ii) un milieu réactionnel consistant en une composition
acellulaire comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase.

Dans certains modes de réalisation d'un milieu réactionnel du
premier type(i), les cellules sont choisies parmi le cellules procaryotes ou
eucaryotes décrites ci-dessus, qui produisent naturellement une 2-
15 déoxyribose-5-phosphate aldolase ayant au moins 30% d'identité en
acides aminés avec la 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase de *E. coli* de
séquence SEQ ID N° 1.

Dans d'autres modes de réalisation d'un milieu réactionnel du
premier type(i), les cellules sont choisies parmi des cellules
20 recombinantes dans lesquelles a été inséré un acide nucléique codant
une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase ayant au moins 30% d'identité
en acides aminés avec la 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase de *E. coli*
de séquence SEQ ID N° 1.

L'invention est également relative à l'utilisation d'un acide nucléique
25 codant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase tel que définie ci-dessus
en vue de produire une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase pour sa mise
en œuvre pour la préparation du milieu réactionnel utilisé dans le procédé
ci-dessus.

A partir des séquences en acides aminés et/ou des séquences
30 nucléotidiques des 2-déoxyribose-5-phosphate aldolases dont les

références sont spécifiées dans le Tableau 1, l'homme du métier est capable de détecter, isoler, cloner et caractériser tout acide nucléique codant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase, par exemple en synthétisant des sondes ou des amorces nucléotidiques spécifiques.

5 Pour construire de telles sondes ou amorces nucléotidiques, l'homme du métier peut se référer à l'une quelconque des nombreuses techniques conventionnelles connues dans l'état de la technique.

Selon un premier aspect, l'acide nucléique codant pour une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase consiste en l'acide nucléique codant le polypeptide de séquence en acides aminés SEQ ID N° 1, référencé sous
10 le n° P0A6L0 dans la base de données du NCBI ou dans la base de données SWISSPROT.

Selon un second aspect, l'acide nucléique codant pour une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase consiste en l'acide nucléique codant le polypeptide de séquence en acides aminés SEQ ID N° 2, référencé sous
15 le n° NP-391 821 dans la base de données du NCBI ou dans la base de données SWISSPROT.

Selon un troisième aspect, l'acide nucléique codant pour une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase consiste en l'acide nucléique codant le polypeptide de séquence en acides aminés SEQ ID N° 3, référencé sous
20 le n° NP-978 291 dans la base de données du NCBI ou dans la base de données SWISSPROT.

L'invention est également relative à un procédé pour la production de l'une des 2-déoxyribose-5-phosphate aldolases telles que définies ci-dessus, ladite méthode comprenant les étapes de :
25

i) insérer un acide nucléique codant pour ledit polypeptide dans un vecteur approprié ;

ii) cultiver, dans un milieu de culture approprié, une cellule hôte préalablement transformée ou transfecter avec le vecteur recombinant de
30 l'étape a) ;

iii) récupérer le milieu de culture conditionné ou lyser la cellule hôte, par exemple par sonication, par choc osmotique, ou à l'aide d'une presse de French ;

iv) séparer et purifier à partir dudit milieu de culture ou encore à partir des lysats cellulaires obtenus à l'étape c), ledit polypeptide ;

v) le cas échéant, caractériser le polypeptide recombinant produit.

Selon un autre aspect, une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase, produite par des cellules non recombinantes ou par des cellules recombinantes dans lesquelles l'acide nucléique correspondant a été inséré, peut être purifiée par passage sur une série appropriée de colonnes de chromatographie, selon les méthodes connues de l'homme de l'art, par exemple une colonne de chromatographie d'immunoaffinité sur laquelle les anticorps dirigés contre cette 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase ou contre un fragment de cette dernière ont été préalablement immobilisés.

Dans certains cas, une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase selon l'invention peut être également préparée par les techniques classiques de synthèse chimique indifféremment en solution homogène ou phase solide.

A titre illustratif, une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase telle que définie selon l'invention pourra être préparée par la technique de synthèse en solution homogène décrite par HOUBEN WEYL (Houben Weyl, 1974, in Methode der Organischen Chemie, E. Wunsch Ed., Volume 15-I et 15-II,) ou encore la technique de synthèse en phase solide décrite par MERRIFIELD (Merrifield RB, 1965a, Nature, Vol. 207(996): 522-523. Merrifield RB., 1965b, Science, Vol. 150(693): 178-185).

Pour obtenir des cellules recombinantes exprimant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase, on utilise avantageusement un vecteur recombinant comprenant un acide nucléique codant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase telle que définie ci-dessus.

Par "vecteur" au sens de la présente invention on entendra une molécule d'ADN ou d'ARN circulaire ou linéaire qui est indifféremment sous forme de simple brin ou double brin.

Sont préférés les vecteurs d'expression comprenant, outre un acide nucléique codant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase conforme à l'invention, des séquences régulatrices permettant d'en diriger sa transcription et/ou sa traduction.

Selon un mode de réalisation avantageux, un vecteur recombinant selon l'invention comprendra notamment les éléments suivants :

(1) des éléments de régulation de l'expression de l'acide nucléique à insérer, tels que des promoteurs et des enhanceurs ;

(2) la séquence codante comprise dans l'acide nucléique conforme à l'invention à insérer dans un tel vecteur, ladite séquence codante étant placée en phase avec les signaux de régulation décrits aux (1) ; et

(3) des séquences d'initiation et d'arrêt de la transcription appropriées.

En outre, les vecteurs recombinants selon l'invention pourront inclure une ou plusieurs origines de réplication chez les hôtes cellulaires dans lesquels leur expression est recherchée, un ou plusieurs marqueurs de sélection.

A titre d'exemples, les promoteurs bactériens pourront être les promoteurs LacI, LacZ, les promoteurs de l'ARN polymérase du bactériophage T3 ou T7, les promoteurs PR, ou PL du phage lambda.

Les promoteurs pour cellules eucaryotes comprendront le promoteur de la thymidine kinase du virus HSV ou encore le promoteur de la métallothionéine-L de souris.

De manière générale, pour le choix d'un promoteur adapté, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à l'ouvrage de SAMBROOK et al. (Sambrook, J. Fritsch, E. F., and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. Cold Spring Harbor

Laboratory, Cold spring Harbor, New York.) ou encore aux techniques décrites par FULLER et al. (Fuller S.A. et al., 1996, *Immunology in Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al. Eds, John Wiley & Sons, Inc., USA).

5 Des vecteurs particulièrement adaptés pour une expression des acides nucléiques selon l'invention dans des bactéries sont par exemple les vecteurs pQE70, pQE60 ou pQE-9 (commercialisés par la société QIAGEN), les vecteurs pBluescript, Page script, pNH8A ; pNH16a, pNH18a, pNH46A (commercialisés par la société Stratagene), les
10 vecteurs pKK223-3, pKK233-3, pDR540 et pRIT5 (commercialisés par la société Pharmacia) .

Des vecteurs particulièrement adaptés pour une expression dans cellules eucaryotes sont par exemple les vecteurs pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 et pSG (commercialisés par la société Stratagene), les
15 vecteurs pSVK3, pBPV, pMSG et pSVL (commercialisés par la société Pharmacia)

Un premier vecteur préférentiellement mis en œuvre dans le cadre de l'invention est le vecteur pcDNA3 commercialisé par la société Invitrogen .

20 Un second vecteur particulièrement préféré est le vecteur pBluescript SK (-), commercialisé par la société Stratagene.

Les vecteurs bactériens préférés selon l'invention sont par exemple les vecteurs pBR322(ATCC37017) ou encore des vecteurs tels que pAA223-3 (Pharmacia, Uppsala, Suède), et pGEM1 (Promega Biotech,
25 Madison, WI, ETATS-UNIS).

On peut encore citer d'autres vecteurs commercialisés tels que les vecteurs psiX174, pBluescript SA, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI, pSG(Stratagene).

Il peut s'agir également de vecteurs de type *baculovirus* tel que le vecteur pVL1392/1393 (Pharmingen) utilisé pour transfecter les cellules de la lignée Sf9 (ATCC N°CRL 1711) dérivées de *Spodoptera frugiperda*.

Il peut encore s'agir de vecteurs adénoviraux tels que l'adénovirus
5 humain de type 2 ou 5.

Dans d'autres modes de réalisation d'un milieu réactionnel, du second type (ii), ledit milieu réactionnel consiste en une composition acellulaire comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase conforme à l'invention ou encore en une composition liquide comprenant un extrait
10 enzymatique obtenu à partir d'une culture de cellules procaryotes ou eucaryotes produisant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase.

Par exemple, une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase conforme à l'invention peut être obtenue, à des degrés de purification variables, (i) soit à partir de cellules de l'un quelconque des organismes référencés dans le
15 Tableau 1 qui produisent naturellement ladite enzyme, (ii) soit à partir de cellules recombinantes dans lesquelles a été inséré un acide nucléique codant ladite enzyme, et qui produisent ladite enzyme.

A titre illustratif, un milieu réactionnel acellulaire comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase peut être préparé selon un procédé
20 comprenant les étapes suivantes :

- 1) cultiver des cellules, recombinantes ou non recombinantes, produisant ladite enzyme ;
- 2) récupérer le surnageant de culture cellulaire comprenant l'enzyme excrétée par les cellules cultivées.
- 25 3) le cas échéant, enrichir le milieu obtenu à la fin de l'étape b) en 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase, par purification.

Selon une autre alternative, un milieu réactionnel acellulaire comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase peut être préparé selon un procédé comprenant les étapes suivantes :

- 1) cultiver des cellules, recombinantes ou non recombinantes, produisant ladite enzyme ;
- 2) préparer un extrait cellulaire à partir des cellules cultivées à l'étape a) ;
- 5 3) le cas échéant, enrichir le milieu obtenu à la fin de l'étape b) en 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase, par purification.

A l'étape 2) ci-dessus, l'extrait cellulaire peut par exemple être préparé par broyage des cellules cultivées à l'étape 1), puis centrifugation du broyat cellulaire ainsi obtenu, afin de séparer les particules cellulaires solides indésirables et le liquide d'extraction qui contient la 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase en suspension. La centrifugation peut par exemple être réalisée à 800 g pendant une durée appropriée, par exemple allant de 1 à 30 minutes, préférentiellement de 15 à 25 minutes.

Le cas échéant, on peut ajouter au milieu réactionnel acellulaire enrichi en 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase un ou plusieurs composés inhibiteurs de protéases, afin de réduire ou bloquer l'éventuelle dégradation de la 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase, susceptible de se produire lors de l'exécution du procédé pour la préparation par biosynthèse du composé de formule (I) qui est l'objet de l'invention.

A l'étape a) du procédé de production du composé de formule (I), lorsque le milieu réactionnel consiste en une culture de cellules, recombinantes ou non recombinantes, produisant une DERA, les conditions de culture sont adaptées en fonction du type de cellules procaryotes ou eucaryotes qui sont utilisées.

En général, on utilise des cultures de cellules procaryotes ou eucaryotes ayant une densité cellulaire correspondant à au moins une valeur de 2 D.O., et encore mieux d'au moins 3 D.O., la valeur d'absorbance étant mesurée à la longueur d'onde de 600 nanomètres.

La valeur en densité cellulaire de la culture de cellules utilisée à l'étape a) du procédé peut être aisément adaptée par l'homme du métier

en fonction du type de cellules bactériennes utilisées, notamment de sa vitesse de croissance dans des cultures *in vitro* et de sa capacité à produire la 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase.

5 A l'étape a) du procédé, l'acétone et le composé (II) sont avantageusement ajoutés à la culture cellulaire de manière sensiblement simultanée dans le temps. Toutefois, l'ordre d'addition de l'acétone et du composé de formule (II) aux cultures de cellules est indifférent.

10 L'étape a) du procédé selon l'invention, a une durée qui peut varier entre 10 heures et 10 jours, selon le milieu réactionnel utilisé et les quantités de produit de départ ajoutés au début de cette étape.

Comme cela est illustré dans les exemples, un haut niveau de production du composé de formule (I) est obtenu dès les premières heures après l'ajout des produits de départ au milieu réactionnel contenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase. Un pic de composé
15 de formule (II) est observé après environ 6 heures à 30 heures suivant l'addition des produits de départ du milieu réactionnel, en particulier lorsqu'on utilise un milieu réactionnel cellulaire. Dans d'autres cas, on peut observer un pic de composé de formule (II) après plusieurs jours, par exemple après 5 à 10 jours suivants l'ajout des produits de départ au
20 milieu réactionnel, en particulier lorsqu'on utilise un milieu réactionnel acellulaire.

Dans d'autres modes de réalisation, le procédé est réalisé en continu.

25 L'étape a) de bioconversion des produits de départ en composé de formule (I) est réalisée, pendant la durée choisie, à une température variant de 35°C à 39°C, de préférence de 36°C à 38°C. L'étape a) est réalisée de manière tout à fait préférée à une température d'environ 37°C.

Comme déjà mentionné, on ajoute avantageusement dans le milieu réactionnel une quantité en poids d'acétone en excès, par rapport au
30 poids de composé (II).

A l'étape b), lorsque le milieu réactionnel consiste en un milieu acellulaire, ledit milieu réactionnel est récupéré selon toute technique connue, par exemple par simple aspiration.

5 A l'étape c), lorsque le milieu réactionnel consiste en une culture de cellules, le surnageant de culture peut être récupéré par toute technique connue de l'homme du métier. Il peut notamment être récupéré de manière conventionnelle, par centrifugation de la suspension de cellules procaryotes ou eucaryotes dans le milieu de culture, puis récupération du surnageant de centrifugation.

10 Dans les modes de réalisation du procédé dans lesquels l'étape b) comprend une étape b1) et une étape b2) on réalise à l'étape b1) avantageusement de 1 à 5 cycles de congélation puis décongélation, et mieux de 1 à 3 cycles de congélation puis décongélation du surnageant de culture obtenu à l'étape c).

15 Le procédé de l'invention peut être mis en œuvre avec succès en réalisant, à l'étape b1), un seul cycle de congélation puis décongélation du surnageant de culture obtenu à la fin de l'étape a).

Préférentiellement, le surnageant de culture est tout d'abord congelé à une température d'au moins -10°C , mieux d'au moins -20°C .

20 Préférentiellement, on procède à une phase de décongélation lente d'une durée d'au moins 5 heures.

Préférentiellement, on procède à la décongélation lente du surnageant congelé, par exemple en plaçant le surnageant congelé à une température d'au moins $+4^{\circ}\text{C}$, par exemple à la température de $+8^{\circ}\text{C}$, pendant une durée pouvant aller de 5 heures à 48 heures, mieux de 12 heures à 36 heures, par exemple pendant une durée de 18 heures à 24 heures.

25 L'étape b1) de réalisation d'au moins un cycle de congélation puis décongélation du surnageant de culture obtenu à la fin de l'étape c) est essentielle à l'obtention du composé (I).

30

A la fin de l'étape b) du procédé, ou à l'étape b2) selon les modes de réalisation, le composé (I) contenu dans le surnageant de culture après décongélation peut être récupéré par toute technique connue de l'homme du métier notamment par tout procédé d'extraction liquide/liquide ou
5 liquide/gaz appropriée.

On peut récupérer le composé de formule (I), à l'étape b), ou à l'étape b2) du procédé, notamment par une extraction liquide/liquide, par exemple dans une phase organique, tel que l'éther diéthylique ou des esters tel que l'acétate d'éthyle, ou encore dans tout solvant polaire non
10 miscible à l'eau approprié. Avantageusement, lorsque l'on récupère le composé de formule (I) par un procédé d'extraction liquide/liquide, à l'étape b) du procédé, on utilise avantageusement un solvant acceptable pour l'obtention d'un produit final sous une forme compatible avec la réglementation régissant la mise sur le marché ou l'incorporation dans les
15 produits alimentaires et cosmétiques des arômes naturels.

On peut également effectuer la récupération du composé de formule (I) à partir du surnageant de culture décongelé par toute technique de purification par chromatographie, y compris par chromatographie en phase inverse.

20 Grâce au procédé de l'invention, on peut désormais obtenir facilement un précurseur aromatique de type phényl-3-butèn-2-one substitué en position para par un groupe R_1 tel que défini ci-dessus, par simple bioconversion, et à partir de produits de départ qui peuvent être obtenus à partir de sources naturelles, notamment végétale.

25 Notamment, grâce au procédé de l'invention, on peut obtenir le parahydroxyphényl-3-butèn-2-one, qui est un précurseur du composé cétone framboise, à partir du parahydroxybenzaldéhyde en présence d'acétone.

D'autres précurseurs de la cétone framboise peuvent également
30 être obtenus en mettant en œuvre le procédé de l'invention avec d'autres

produits de départ tels que le paraméthoxybenzaldéhyde ou anisaldéhyde. Dans ce dernier cas, le procédé comprend une étape additionnelle de conversion du composé (II) anisaldéhyde en parahydroxyphényl-3-butèn-2-one, via une étape de déméthoxylation ou de déméthylation.

5 Cette étape de déméthoxylation ou de déméthylation peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier.

Par exemple, on peut utiliser la technique décrite par Lopretti et al. (Lopretti M et al. (1998) Demethoxylation of lignin-model compounds with enzyme extracts from *Gloeophilum trabeum*. Proc. Biochem. 33:657-661).

10 La technique décrite par Lopretti et al. inclut l'utilisation d'extraits enzymatiques de champignons filamenteux pour la déméthoxylation des composés phénoliques. Dans la pratique, on incube une quantité appropriée d'un extrait enzymatique obtenu à partir d'un champignon filamenteux, par exemple de *Gloeophilum trabeum*, à la température de
15 28°C, en présence du composé méthoxylé à transformer, puis on récupère le composé final déméthoxylé.

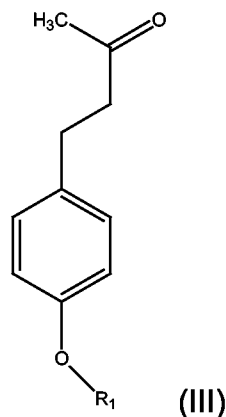
On peut aussi mettre en œuvre une technique similaire à celle décrite par Bossert et al. (Bossert et al. (1989) Anaerobic Oxidation of p-cresol mediated by a partially purified methylhydroxylase from a denitrifying bacterium. J. Bact. 171:2956-2962), qui comprend une étape
20 d'incubation d'une méthylhydroxylase, à la température de 25°C et en conditions anaérobies, puis une étape de récupération du composé final déméthoxylé.

Comme cela a déjà été mentionné précédemment dans la présente
25 description, les composés (I) constituent des précurseurs de composés aromatiques. Tout particulièrement, le composé (I) dans lequel R₁ est l'hydrogène, c'est-à-dire le parahydroxyphényl-3-butèn-2-one constitue un précurseur direct du composé cétone framboise.

De manière générale, on obtient la cétone framboise, à partir du
30 parahydroxyphényl-3-butèn-2-one, par une réaction de déhydrogénation,

par réduction chimique ou enzymatique du composé de formule (I) qui est obtenue à la fin de l'étape b), ou à la fin de l'étape b2) du procédé décrit ci-dessus.

En conséquence, la présente invention a également pour objet un
5 procédé d'obtention d'un composé de formule (III) suivante :



dans laquelle R₁ représente l'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié non substitué ayant de 1 à 4 atomes de carbone, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- 10 a) obtenir un composé de formule (I) à partir d'un composé de formule (II) en réalisant le procédé tel que décrit ci-dessus.
- b) synthétiser le composé de formule (III) par réduction chimique ou enzymatique du composé de formule (I) obtenu à l'étape a).

Le composé aromatique de formule (III), y compris la cétone
15 framboise, peut être obtenu, à l'étape b) du procédé ci-dessus, par réduction chimique classique, notamment à l'aide de tout procédé approprié mettant en œuvre un catalyseur d'hydrogénation, par exemple un catalyseur à base de nickel ou de palladium.

Selon un second aspect du procédé ci-dessus, la réduction du
20 composé de formule (I) pour obtenir le composé de formule (III) peut être réalisée par voie enzymatique, par exemple selon la technique décrite dans la demande de brevet français N°FR 2.729.386 et dans la demande PCT N°WO 96/21.739.

Selon cette technique, le composé de formule (I) est incubé en présence d'une culture de cellule de levure *Saccharomyces cerevisiae*, ou encore d'un extrait protéique ou enzymatique de *Saccharomyces cerevisiae*. Puis, le surnageant de culture des cellules de *Saccharomyces cerevisiae*, ou le milieu réactionnel comprenant l'extrait enzymatique de *Saccharomyces cerevisiae*, est récupéré. Puis, le composé aromatique final de formule (III) est récupéré, par exemple par extraction liquide/liquide ou liquide/gaz ou encore par purification par chromatographie, y compris par chromatographie en phase inverse ou par chromatographie en phase gazeuse.

Par exemple, pour réaliser l'étape b) de synthèse du composé de formule (III) par réduction enzymatique du composé de formule (I) du procédé ci-dessus, l'homme du métier se référera avantageusement à la technique décrite dans la demande PCT N°WO 96/21.739. Selon cette technique, on ajoute tout d'abord 1 kg de levure de boulanger à un récipient à l'air libre comprenant, sous agitation, 2,5 litres d'eau et 100 g de D-glucose. La suspension est vigoureusement agitée à la température de 30°C à 35°C. Après le démarrage de la fermentation du glucose, on ajoute goutte à goutte en 10 minutes une solution de composé (I) puis, après le temps d'incubation approprié, par exemple de 48 heures, on procède à une extraction du composé de formule (III).

L'extraction du composé (III) peut être classiquement une extraction liquide/liquide, par exemple à l'aide de méthyltertiobutyléther.

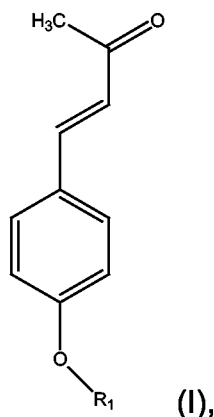
Si on le souhaite, le résidu solide obtenu après évaporation du solvant peut être soumis à une étape de purification finale du composé de formule (III) par cristallisation du composé de formule (III) dans une solution d'acétate d'éthyle à laquelle on rajoute goutte à goutte de l'hexane. Si désiré, on peut procéder à une recristallisation du composé de formule (III), par exemple dans un mélange d'eau et de méthanol.

A la place d'une culture de cellule de *Saccharomyces cerevisiae*, on peut utiliser un extrait protéique de levure tel que celui qui est commercialisé par la Société SIGMA sous la référence Y-2875, comme cela est décrit dans la demande PCT N°WO 96/21.739.

5 Lorsque l'on met en œuvre le procédé ci-dessus en utilisant un composé de formule (I) dans lequel le groupe R_1 signifie l'hydrogène, c'est-à-dire le composé parahydroxybenzaldéhyde, alors que le composé de formule (III) est le parahydroxyphényl-butan-2-one ou cétone framboise.

10 Avec le même procédé, on obtient également la cétone framboise en tant que produit final en utilisant la paraméthoxybenzaldéhyde ou anisaldéhyde comme produit de départ.

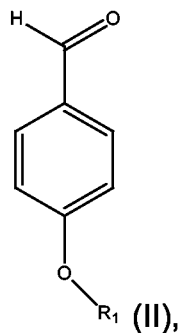
La présente invention a également pour objet un kit pour la préparation par biosynthèse du composé de formule (I) suivant :



15 dans laquelle R_1 représente l'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié non substitué ayant de 1 à 4 atomes de carbone, ledit kit comprenant :

a) un milieu réactionnel comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase;

20 b) un composé de formule (II) suivante :



dans laquelle R_1 représente l'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié non substitué ayant de 1 à 4 atomes de carbone, et

c) facultativement, de l'acétone ; et

- 5 d) le ou les réactifs chimiques ou enzymatiques nécessaires à la conversion d'un composé de formule (I) en un composé de formule (III).

Préférentiellement, dans le kit ci-dessus, le milieu réactionnel, le composé de formule (II), et éventuellement l'acétone, sont présentés dans des conteneurs séparés.

- 10 Comme cela a déjà été décrit en détail précédemment dans la présente description, le milieu réactionnel peut consister (i) soit en des cellules, recombinantes ou non recombinantes, qui produisent une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase conforme à l'invention, (ii) soit en une composition acellulaire comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase conforme à l'invention.
- 15

- Un milieu réactionnel du type (i) ci-dessus peut consister en un milieu liquide comprenant des cellules, recombinantes ou non recombinantes, en culture. Il peut s'agir d'un milieu de pré-culture cellulaire, qui nécessite la mise en œuvre d'une étape de croissance des cellules préalablement à l'ajout du composé de formule (II) et de l'acétone.
- 20 Il peut aussi s'agir d'un milieu réactionnel dans lequel la densité des cellules sont en nombre ou densité suffisantes pour débiter immédiatement le procédé de l'invention, par ajout des quantités appropriées du composé de formule (II) et de l'acétone.

Alternativement, un milieu réactionnel du type (i) ci-dessus, tel que contenu dans un kit selon l'invention, peut consister en une composition solide comprenant les cellules, recombinantes ou non recombinantes, sous forme lyophilisées. La mise en œuvre du procédé de l'invention, à l'aide d'un kit comprenant un tel milieu réactionnel nécessite l'ajout d'un volume approprié milieu de culture à la composition solide, et, le cas échéant, une étape préalable de pré-culture cellulaire, afin de fournir un milieu réactionnel directement utilisable pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention.

Dans d'autres modes de réalisation d'un kit ci-dessus, un milieu réactionnel du type (ii) peut consister en une composition liquide comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase conforme à l'invention, en suspension.

Alternativement, le milieu réactionnel du type (ii) peut consister en une composition solide, par exemple une composition solide comprenant la 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase conforme à l'invention, sous forme congelée ou lyophilisée.

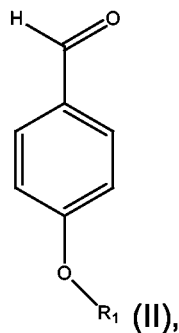
Préférentiellement, le kit ci-dessus se caractérise en ce que le composé de formule (II) consiste en un composé de formule (II) dans lequel R_1 représente un atome d'hydrogène.

Selon un second aspect préférentiel dudit kit, le composé de formule (II) consiste en un composé de formule (II) dans lequel R_1 représente le groupe $-CH_3$.

L'invention a également pour objet un kit pour préparer un composé de formule (III) tel que défini dans la présente description, à partir d'un composé de formule (II) tel que défini dans la présente description, ledit kit comprenant :

a) un milieu réactionnel comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase ;

b) un composé de formule (II) suivante :



dans laquelle R_1 représente l'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié non substitué ayant de 1 à 4 atomes de carbone,

c) facultativement, de l'acétone ; et

- 5 d) le ou les réactifs chimiques ou enzymatiques nécessaires à la conversion d'un composé de formule (I) en un composé de formule (III).

Préférentiellement, dans le kit ci-dessus, le milieu réactionnel, le composé de formule (II), éventuellement l'acétone, et le ou les réactifs nécessaires à la conversion d'un composé de formule (II) en un composé
10 de formule (III), sont présentés dans des conteneurs séparés.

Le milieu réactionnel consiste en l'un quelconque des milieux réactionnels utilisables pour le kit décrit précédemment. Ainsi, le milieu réactionnel peut consister (i) soit en des cellules, recombinantes ou non recombinantes, qui produisent une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase
15 conforme à l'invention, (ii) soit en une composition acellulaire comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase conforme à l'invention.

Selon un mode de réalisation particulier du kit ci-dessus, ledit kit comprend de plus un réactif enzymatique choisi parmi des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* et un extrait enzymatique de *Saccharomyces*
20 *cerevisiae*.

Selon un second mode de réalisation préféré du kit ci-dessus, ledit kit comprend un réactif chimique consistant en un catalyseur d'hydrogénation, par exemple un catalyseur à base de nickel ou un catalyseur à base de palladium.

La présente invention est en outre illustrée, sans pour autant être limitée, par les figures et les exemples qui suivent.

FIGURES

La **Figure 1** illustre la production du 4-OH-Benzylidene acétone à partir de
5 4-OH-Benzaldéhyde et d'acétone, en présence d'un milieu réactionnel comprenant des cellules de *E. coli* (Référence ATCC n° 86963).

- En abscisse : temps de culture, exprimé en heures. La période entre le temps -5h et le temps 0h consiste en un temps de pré-culture cellulaire.

- En ordonnées, sur l'échelle à gauche de la figure : concentration de 4-
10 OH-Benzaldehyde (◆) ou de 4-OH-Benzylidene acétone (■), exprimée en mg/l.

- En ordonnées, sur l'échelle à droite de la figure : densité des cellules bactériennes (▲), exprimé en Unités de Densité optique (DO) à la longueur d'onde de 600 nanomètres.

15 La **Figure 2** illustre la production d'Anisylidène acétone à partir d'Anisaldéhyde et d'acétone, en présence d'un milieu réactionnel comprenant des cellules de *E. coli* (Référence ATCC n° 86963).

- En abscisse : temps de culture, exprimé en heures. La période entre le temps -5h et le temps 0h consiste en un temps de pré-culture cellulaire.

20 - En ordonnées, sur l'échelle à gauche de la figure : concentration d'Anisaldéhyde (◆) , exprimée en mg/l.

- En ordonnées, sur l'échelle à droite de la figure : densité des cellules bactériennes (▲), exprimé en Unités de Densité optique (DO) à la longueur d'onde de 600 nanomètres, ou concentration d'Anisylidène
25 acétone (■), exprimé en mg/l.

La **Figure 3** illustre la production du 4-OH-Benzylidene acétone à partir de 4-OH-Benzaldéhyde et d'acétone, en présence d'un milieu réactionnel comprenant des cellules de *E. coli* K12.

- En abscisse : temps de culture, exprimé en heures. La période entre le temps -5h et le temps 0h consiste en un temps de pré-culture cellulaire.
- En ordonnées, sur l'échelle à gauche de la figure : concentration de 4-OH-Benzaldehyde (◆) , exprimée en mg/l.

- 5 - En ordonnées, sur l'échelle à droite de la figure : densité des cellules bactériennes (▲), exprimé en Unités de Densité optique (DO) à la longueur d'onde de 600 nanomètres, ou concentration de 4-OH-Benzylidène acétone (■) exprimée en mg/l.

10 La **Figure 4** illustre la production du 4-OH-Benzylidene acétone à partir de 4-OH-Benzaldéhyde et d'acétone, en présence d'un milieu réactionnel comprenant des cellules de *Bacillus subtilis* (Référence ATCC n° 31324).

- En abscisse : temps de culture, exprimé en heures. La période entre le temps -5h et le temps 0h consiste en un temps de pré-culture cellulaire.
- En ordonnées, sur l'échelle à gauche de la figure : concentration de 4-OH-Benzaldehyde (◆) ou de 4-OH-Benzylidene acétone (■), exprimée en mg/l.

- 15 - En ordonnées, sur l'échelle à droite de la figure : densité des cellules bactériennes (▲), exprimé en Unités de Densité optique (DO) à la longueur d'onde de 600 nanomètres.

20 La **Figure 5** illustre la production du 4-OH-Benzylidene acétone à partir de 4-OH-Benzaldéhyde et d'acétone, en présence d'un milieu réactionnel comprenant des cellules de *Bacillus subtilis* (Référence CIP n° 52.65).

- En abscisse : temps de culture, exprimé en heures. La période entre le temps -5h et le temps 0h consiste en un temps de pré-culture cellulaire.
- 25 - En ordonnées, sur l'échelle à gauche de la figure : concentration de 4-OH-Benzaldehyde (◆), exprimée en mg/l.
- En ordonnées, sur l'échelle à droite de la figure : densité des cellules bactériennes (▲), exprimé en Unités de Densité optique (DO) à la

longueur d'onde de 600 nanomètres, ou concentration de 4-OH-Benzilidène acétone (■) exprimée en mg/l.

La **Figure 6** illustre la production du 4-OH-Benzylidene acétone à partir de 4-OH-Benzaldéhyde et d'acétone, en présence d'un milieu réactionnel
5 comprenant des cellules de *Bacillus subtilis* 168 (Référence ATCC n° 23857).

- En abscisse : temps de culture, exprimé en heures. La période entre le temps -5h et le temps 0h consiste en un temps de pré-culture cellulaire.

- En ordonnées, sur l'échelle à gauche de la figure : concentration de 4-
10 OH-Benzaldehyde (◆) ou de 4-OH-Benzylidene acétone (■), exprimée en mg/l.

- En ordonnées, sur l'échelle à droite de la figure : densité des cellules bactériennes (▲), exprimé en Unités de Densité optique (DO) à la longueur d'onde de 600 nanomètres.

15 La **Figure 7** illustre la production du 4-OH-Benzylidene acétone à partir de 4-OH-Benzaldéhyde et d'acétone, en présence d'un milieu réactionnel comprenant des cellules de *Bacillus cereus* (Référence CIP n° 54.9).

- En abscisse : temps de culture, exprimé en heures. La période entre le temps -5h et le temps 0h consiste en un temps de pré-culture cellulaire.

20 - En ordonnées, sur l'échelle à gauche de la figure : concentration de 4-OH-Benzaldehyde (◆) ou de 4-OH-Benzylidene acétone (■), exprimée en mg/l.

- En ordonnées, sur l'échelle à droite de la figure : densité des cellules bactériennes (▲), exprimé en Unités de Densité optique (DO) à la
25 longueur d'onde de 600 nanomètres.

La **Figure 8** illustre la production du 4-OH-Benzylidene acétone à partir de 4-OH-Benzaldéhyde et d'acétone, en présence d'un milieu réactionnel

comprenant un extrait enzymatique de déoxyribose 5-phosphate aldolase provenant de *Escherichia coli* (Référence ATCC n° 86963).

- En abscisse : temps d'incubation, exprimé en jours.

- En ordonnées, sur l'échelle à gauche de la figure : concentration de 4-

5 OH-Benzaldehyde (■) exprimée en mg/l. La courbe (■) supérieure illustre l'évolution de la concentration de 4-OH-Benzaldehyde en présence d'un milieu réactionnel comprenant 1 mg, exprimé en quantité de protéine, d'extrait cellulaire. La courbe (■) inférieure illustre l'évolution de la concentration de 4-OH-Benzaldehyde en présence d'un milieu réactionnel
10 comprenant 5 mg, exprimé en quantité de protéine, d'extrait cellulaire.

- En ordonnées, sur l'échelle à droite de la figure : concentration de 4-OH-Benzylidene acétone (●), exprimée en mg/l. La courbe (●) inférieure illustre l'évolution de la concentration 4-OH-Benzylidene acétone en présence d'un milieu réactionnel comprenant 1 mg, exprimé en quantité
15 de protéine, d'extrait cellulaire. La courbe (●) supérieure illustre l'évolution de la concentration de 4-OH-Benzylidene acétone en présence d'un milieu réactionnel comprenant 5 mg, exprimé en quantité de protéine, d'extrait cellulaire.

20 **EXEMPLES**

A. MATERIEL ET METHODES

A.1. Souches bactériennes.

On a utilisé les souches bactériennes suivantes:

- a) *Escherichia coli* (Référence ATCC n° 86963) ;
- 25 b) *Escherichia coli* K12 (Référence ATCC n° 29425)
- c) *Bacillus subtilis* (Référence ATCC n° 31324 ; Référence DSM n° 704)
- d) *Bacillus subtilis* (Collection de l'Institut Pasteur –Référence CIP n° 52.65)

e) *Bacillus subtilis* 168 (Référence ATCC n° 23857) ; et

f) *Bacillus cereus* (Collection de l'Institut Pasteur – Référence CIP n° 54.9)

A.2. Milieux et conditions de culture

- 5 Composition du milieu de préculture (OSP 1 litre) produits BioValley et Sigma pour les sels : peptone de viande (4,3g), NaCl (6,4g), le pH est ajusté à 7 (NaOH ou HCl).

Composition du milieu de culture (QSR 1 litre) produits Bio Balley et Sigma pour les sels : Extrait de levure (2g), FeSO₄ – 7H₂O (0,001g),
10 CaCl₂(0,01g), CuSO₄·5H₂O (0,01g), MgSO₄ (0,8g), ZnSO₄·H₂O (0,01g), (NH₄)₂SO₄ (5g) , K₂HPO₄·3H₂O (1,32g), MnSO₄·H₂O (0,1g). Le pH est ajusté à 7 (NaOH ou HCl) et le milieu est autoclavé à 121°C pendant 20 mn. Quand la température du milieu est redescendue à 60°C on rajoute de la 2-Desoxyadenosine (Fluka) à une concentration finale de 10mM.

- 15 Toutes les cultures et précultures sont effectuées sur les milieux précédents à 30°C en fiole d'Erlenmeyer de 5 litres contenant 500 ml de milieu et bouchées avec du coton cardé. L'agitation est de 130 agitations par minute. Les précultures sont effectuées pendant 16h jusqu'à une DO de 4 à 4,5 pour les deux souches. Onensemence le milieu de culture
20 avec cette préculture à raison de 5%. Après 6h à 12h de préculture (DO de 2 à 3,5 environ, selon la souche étudiée), on ajoute les précurseurs (acétone (Sigma)) à 2% et le composé phénolique (Sigma) à 0,5g/l sous forme d'une solution éthanolique mère). L'ordre d'ajout n'a pas d'importance. Un prélèvement de 5 ml est effectué toutes les 4 heures. La
25 DO est mesurée à 600 nm.

A.3. Préparation d'un extrait cellulaire comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase.

- L'extrait cellulaire a été obtenu à partir de cellules de la souche de
30 *Escherichia coli* référencée à l'ATCC sous le n° 86963. Pour cette souche

de *E. coli*, la production de 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase est induite en présence de substrat.

La première étape consiste donc à une étape d'induction de la production de 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase par les cellules en culture, d'une durée de 24 heures.

Après 24h de pré-culture de *E. coli* à une D.O. de 3,2, les cellules sont centrifugées, lavées 5 fois dans du tampon phosphate pH 7,4 puis broyées à la presse de French dans le même tampon additionné de benzamidine (1 mM), EDTA (2 mM), PMSF (1 mM) et DTT (1 mM).

Après broyage, les extraits sont centrifugés à 8000xg pendant 15 minutes et le surnageant est conservé.

Les essais de production de composés de formule (I) sont réalisées avec cet extrait cellulaire, selon le protocole suivant :

- dans du tampon Triethanolamine 100mM pH 8,1 + EDTA 1mM, le composé de formule (II) et l'acétone sont ajoutés, ainsi que l'extrait enzymatique obtenu comme décrit ci-dessus.
- la réaction a lieu sous azote à 37°C. Des ajouts réguliers de PMSF (1 mM) sont effectués pour limiter l'action des protéases.
- les échantillons contenant les produits finals de la réaction enzymatique sont extraits tel que décrit ci-dessous.

A. 3. Extraction et dosage :

Mesure de la biomasse :

5 ml de culture sont filtrés sur filtre 0,45 µm préalablement pesé. Le filtre est mis à sécher à 60°C pendant 24h avant pesée finale.

Lorsque nécessaire, une mesure de viabilité est effectuée par étalement sur le milieu de culture correspondant additionné de gélose (15g/l).

Extraction des composés volatils

Les échantillons sont centrifugés 3000g pendant 15 minutes. Le surnageant est alors récupéré et congelé à -20°C.

Après décongélation lente (une nuit entre 4°C et 8°C) et après ajout de 40µl d'une solution de 1,4-Diméthoxybenzène à 1 g/l (Etalon Interne), le surnageant est extrait deux fois successivement avec 5 ml d'acétate d'éthyl (Carlo Erba). Les deux extraits sont alors réunis, séchés sur sulfate de sodium anhydre puis filtrés sur coton de verre et concentrés sous flux d'azote jusqu'à un volume de 500µl.

Dosage des composés volatils

1 µl d'extrait sont injectés sur une colonne DB5 (30m x 0.319mm) , épaisseur 0,25 µm (référence J & W US 1 477866H) . Gaz vecteur helium ou hydrogène (vélocité 40.5 cm/seconde à 40°C). Gradient de température de 40 à 240 °C/min.

Les composés sont quantifiés par rapport à l'étalon interne.

A.4. Témoins de réaction

Il a été vérifié qu'aucune production d'un composé final de formule (I) n'a été détectée, dans les conditions réactionnelles décrites ci-dessus, avec l'une quelconque des compositions témoin suivantes :

- Acétone 2% seule + milieu de culture + *E. coli* (ATCC 86963) ;
- 4-OH-benzaldehyde seul (0,5 g/l) + milieu de culture + *E. coli* (ATCC 86963) ;
- Acétone (2%) + 4-OH-benzaldehyde (0,5 g/l) seuls + milieu de culture ;
- Culture seule de *E. coli* (ATCC 86963) ;
- DERA seule (origine *Lactobacillus plantarum* ;

B. RESULTATS

Exemple 1 : Production d'un composé de formule (I) en utilisant un milieu réactionnel comprenant des cellules produisant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase.

Les résultats de la Figure 1 montrent que, grâce au procédé de l'invention, on produit du 4-OH-Benzylidène acétone, à partir de 4-OH-Benzaldéhyde et d'acétone, en utilisant un milieu réactionnel comprenant

des cellules de *E. coli* (ATCC 86963), en quantité significative (160 mg/ml).

Les résultats de la Figure 2 montrent que, grâce au procédé de l'invention, on produit de l'Anisylidène acétone, à partir d'anisaldéhyde et d'acétone, en utilisant un milieu réactionnel comprenant des cellules de *E. coli* (ATCC 86963), en quantité significative (6 à 10 mg/ml)

Les résultats de la Figure 3 montrent que, grâce au procédé de l'invention, on produit du 4-OH-Benzylidène acétone, à partir de 4-OH-Benzaldéhyde et d'acétone, en utilisant un milieu réactionnel comprenant des cellules de *E. coli* K12, en quantité significative (environ 4 mg/ml).

Les résultats de la Figure 4 montrent que, grâce au procédé de l'invention, on produit du 4-OH-Benzylidène acétone, à partir de 4-OH-Benzaldéhyde et d'acétone, en utilisant un milieu réactionnel comprenant des cellules de *Bacillus subtilis* (ATCC 86963), en quantité significative (environ 25 mg/ml).

Les résultats de la Figure 5 montrent que, grâce au procédé de l'invention, on produit du 4-OH-Benzylidène acétone, à partir de 4-OH-Benzaldéhyde et d'acétone, en utilisant un milieu réactionnel comprenant des cellules de *Bacillus subtilis* (CIP 52.65), en quantité significative (environ 3,5 mg/ml).

Les résultats de la Figure 6 montrent que, grâce au procédé de l'invention, on produit du 4-OH-Benzylidène acétone, à partir de 4-OH-Benzaldéhyde et d'acétone, en utilisant un milieu réactionnel comprenant des cellules de *Bacillus subtilis* 168, en quantité significative (environ 30 mg/ml).

Les résultats de la Figure 7 montrent que, grâce au procédé de l'invention, on produit du 4-OH-Benzylidène acétone, à partir de 4-OH-Benzaldéhyde et d'acétone, en utilisant un milieu réactionnel comprenant des cellules de *Bacillus cereus* (CIP 54.9), en quantité significative (environ 30 mg/ml).

Exemple 2 : Production d'un composé de formule (I) en utilisant un milieu réactionnel comprenant un extrait enzymatique de cellules de *E. coli* produisant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase.

5 Les résultats de la Figure 8 montrent que, grâce au procédé de l'invention, on produit du 4-OH-Benzylidène acétone, à partir de 4-OH-Benzaldéhyde et d'acétone, en utilisant un milieu réactionnel comprenant un extrait enzymatique obtenu à partir de cellules de *E. coli* (ATCC 86963), en quantité significative.

10 Plus particulièrement, les résultats de la Figure 8 montrent qu'avec une quantité d'extrait enzymatique comprenant 1 mg de protéines totales, on peut obtenir une concentration finale de 4-OH-Benzylidène acétone d'environ 2 mg/ml, après une durée de 5 jours de la réaction enzymatique.

Egalement, les résultats de la Figure 8 montrent qu'avec une
15 quantité d'extrait enzymatique comprenant 5 mg de protéines totales, on peut obtenir une concentration finale de 4-OH-Benzylidène acétone d'environ 5 mg/ml, après une durée de 5 jours de la réaction enzymatique.

Tableau 1

Ref séquence (N° d'accès)	Organisme	Score	% Identité	% Positif	% Gap	Longueur (a.a.)
BACTERIES						
P0A6L0	E. coli K12	Séquence de référence				259
NP_757311	E. coli CFT073	1301	100	100	0	267
NP_710121	Shigella flexneri	1292	99	99	0	259
YP_219402.1	Salmonella enterica subsp. enterica	1265	96	98	0	265
NP_808182	Salmonella enterica subsp. enterica	1260	99	99	0	265
NP_231980	Vibrio cholerae	1055	81	90	1	259
NP_995016	Yersinia pestis	1047	78	86	2	270
YP_069123	Yersinia pseudotuberculosis	1047	78	86	2	265
YP_128853	Photobacterium profundum	1027	77	87	2	257
YP_203887	Vibrio fischeri	1015	79	89	2	258
YP_048839	Erwinia carotovora	982	74	84	0	259

TABLEAU 1 (suite)

Ref séquence (N° d'accès)	Organisme	Score	% Identité	% Positif	% Gap	Longueur (a.a.)
BACTERIES						
ZP_00134225	Actinobacillus pleuropneumoniae	925	70	81	0	258
YP_268702	Colwellia psychererythraea	904	68	82	1	257
ZP_00581743	Shewanella baltica	879	71	80	1	256
ZP_00586348	Shewanella amazonensis	855	69	78	1	257
ZP_00640408	Shewanella frigidimarina	845	67	78	1	257
ZP_00635589	Shewanella denitrificans	837	68	80	1	258
ZP_00472214	Chromohalobacter salexigens	697	57	71	1	257
ZP_00496278	Burkholderia pseudomallei	671	55	71	1	260
YP_273146	Pseudomonas syringae pv. phaseolicola	567	44	66	1	259

TABLEAU 1 (suite)

Ref séquence (N° d'accès)	Organisme	Score	% Identité	% Positif	% Gap	Longueur (a.a.)
BACTERIES						
NP_790812	Pseudomonas syringae pv. tomato	566	44	66	3	259
YP_156264	Idiomarina loihiensis	554	48	66	4	248
YP_233935	Pseudomonas syringae pv. Syringae	552	43	63	2	261
ZP_00208959	Magnetospirillum magnetotacticum	531	46	62	2	252
NP_824522	Streptomyces coelicolor	498	46	60	4	329
NP_824522	Streptomyces avermitilis	494	46	60	4	329
NP_819073	Coxiella burnetii	482	44	62	2	241
ZP_00656167	Nocardioides sp. JS614	464	44	60	6	324

TABLEAU 1 (suite)

Ref séquence (N° d'accès)	Organisme	Score	% Identité	% Positif	% Gap	Longueur (a.a.)
BACTERIES						
ZP_00628495	Paracoccus denitrificans	450	39	56	7	314
ZP_00614687	Mesorhizobium sp. BNC1	425	39	55	7	333
ZP_00622367	Silicibacter sp. TM1040	424	41	57	7	351
ZP_00004176	Rhodobacter sphaeroides	421	39	55	8	324
NP_812175	Bacteroides thetaiotaomicron	420	41	56	5	300
YP_169184	Francisella tularensis	418	37	59	3	253
YP_209848	Bacteroides fragilis	416	40	56	6	298
YP_168563	Silicibacter pomeroyi	415	39	56	7	277
ZP_00282200	Burkholderia fungorum	409	38	56	8	331
ZP_00554093	Jannaschia sp. CCS1	397	38	55	7	466

TABLEAU 1 (suite)

Ref séquence (N° d'accès)	Organisme	Score	% Identité	% Positif	% Gap	Longueur (a.a.)
BACTERIES						
NP_906068	Porphyrromonas gingivalis	354	35	57	5	289
YP_095462	Legionella pneumophila	334	34	51	6	254
NP_971062	Treponema denticola	287	34	55	5	216
NP_978291	Bacillus cereus	286	38	54	9	223
YP_148352	Geobacillus kaustophilus	275	33	52	9	273
NP_242218	Bacillus halodurans	274	35	53	6	224
2ZP_0052659	Solibacter usitatus	268	34	50	5	295
2						
ZP_00332591	Streptococcus suis	266	33	52	11	220
YP_079881	Bacillus licheniformis	265	36	51	5	223

TABLEAU 1 (suite)

Ref séquence (N° d'accès)	Organisme	Score	% Identité	% Positif	% Gap	Longueur (a.a.)
BACTERIES						
ZP_00235217	Listeria monocytogenes	262	34	52	5	223
ZP_00395844	Deinococcus geothermalis	260	37	52	7	430
ZP_00356377	Chloroflexus aurantiacus	259	33	50	5	263
ZP_00601502	Rubrobacter xylanophilus	258	32	50	12	235
ZP_00559724	Desulfotobacterium hafniense	258	38	52	6	215
ZP_00411909	Arthrobacter sp. FB24	254	33	50	5	247
YP_175162	Bacillus clausii	253	36	54	5	224
ZP_00267765	Rhodospirillum rubrum	250	34	47	6	238
YP_252812	Staphylococcus haemolyticus	249	35	50	7	220
NP_599631	Corynebacterium glutamicum	247	34	48	6	224
ZP_00604653	Enterococcus faecium	245	34	51	10	220

TABLEAU 1 (suite)

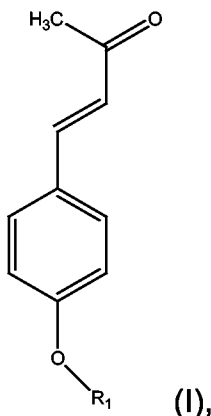
Ref séquence (N° d'accès)	Organisme	Score	% Identité	% Positif	% Gap	Longueur (a.a.)
BACTERIES						
NP_391821	Bacillus subtilis	244	36	51	6	211
YP_074394	Symbiobacterium thermophilum	243	33	50	5	220
YP_184517	Thermococcus kodakarensis	242	36	54	5	224
ZP_00538673	Exiguobacterium sp. 255-15	240	33	50	10	221
EUCARYOTES						
XP_796485	Strongylocentrotus purpuratus	431	41	56	8	282
NP_001006248	Gallus gallus	420	38	56	7	318
XP_534879	Canis familiaris	419	37	54	6	331
NP_766321	Mus musculus	412	38	54	6	318

TABLEAU 1 (suite)

Ref séquence (N° d'accès)	Organisme	Score	% Identité	% Positif	% Gap	Longueur (a.a.)
EUCARYOTES						
NP_057038	Homo sapiens	410	38	56	7	336
NP_495009	Caenorhabditis elegans	409	39	57	3	303
XP_319922	Anopheles gambiae	406	39	54	6	263
NP_001006097	Danio rerio	400	37	54	6	318
NP_001004891	Xenopus tropicalis	393	37	55	7	318
XP_744811	Plasmodium chabaudi	376	35	56	5	262
XP_676402	Plasmodium berghei	358	34	55	5	262
NP_700683	Plasmodium falciparum	357	34	55	5	263
XP_624372	Apis mellifera	342	35	54	5	283
NP_610781	Drosophila melanogaster	341	35	50	7	347
XP_651785	Entamoeba histolytica	247	32	49	6	218
XP_754947	Aspergillus fumigatus	236	34	49	4	364
XP_408909	Aspergillus nidulans	213	34	48	3	544

REVENDICATIONS

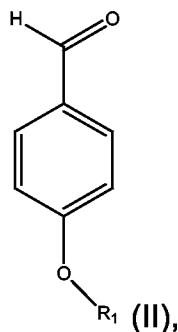
- 5 1. Procédé pour la préparation par biosynthèse du composé de formule (I) suivant :



- dans laquelle R_1 représente l'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié non substitué ayant de 1 à 4 atomes de carbone, ledit procédé
- 10 comprenant les étapes suivantes :

a) ajouter :

(i) un composé de formule (II) suivante :



- dans laquelle R_1 représente l'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié non substitué ayant de 1 à 4 atomes de carbone,
- 15 et

(ii) de l'acétone,

dans un milieu réactionnel comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase ; et

b) récupérer le composé de formule (I), à partir du milieu obtenu à la fin de l'étape a).

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le composé
5 de formule (II) est tel que R_1 représente un atome d'hydrogène.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le composé de formule (II) est tel que R_1 représente un groupe $-CH_3$.

10 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'à l'étape a), on ajoute dans le milieu réactionnel une quantité en poids d'acétone en excès, par rapport au poids de composé (II).

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que
15 l'étape b) comprend les étapes suivantes :

b1) réaliser au moins un cycle de congélation puis décongélation du milieu obtenu à la fin de l'étape a) ;

b2) récupérer le composé de formule (I) à partir du milieu décongelé obtenu à la fin de l'étape b1).

20

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que, pour chaque cycle de congélation puis décongélation de l'étape b1), la phase de décongélation consiste en une décongélation lente d'une durée d'au moins 5 heures.

25

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'à l'étape b2), le composé de formule (I) est récupéré par extraction à l'aide d'un solvant choisi parmi l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle ou encore tout solvant polaire non miscible à l'eau.

30

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase possède une séquence d'acides aminés ayant au moins 30 % d'identité avec la séquence d'acides aminés SEQ ID N°1

5

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase possède une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 et SEQ ID N°3.

10

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase est codée par un acide nucléique provenant d'un organisme procaryote d'une espèce choisie parmi *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Corynebacterium* et *Shewanella*.

15

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase est codée par un acide nucléique provenant d'un organisme procaryote choisi parmi *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* CFT073, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Photobacterium profundum*, *Vibrio fischeri*, *Erwinia carotovora*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Colwellia psychererythraea*, *Shewanella baltica*, *Shewanella amazonensis*, *Shewanella frigidimarina*, *Shewanella denitrificans*, *Chromohalobacter salexigens*, *Burkholderia pseudomallei*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Idiomarina loihiensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*, *Magnetospirillum magnetotacticum*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Coxiella burnetii*, *Nocardioides* sp. JS614, *Paracoccus denitrificans*, *Mesorhizobium* sp. BNC1, *Silicibacter* sp. TM1040, *Rhodobacter sphaeroides*, *Bacteroides thetaiotaomicron*,

20

25

30

Francisella tularensis, *Bacteroides fragilis*, *Silicibacter pomeroyi*,
Burkholderia fungorum, *Jannaschia* sp. CCS1, *Porphyromonas*
gingivalis, *Legionella pneumophila*, *Treponema denticola*, *Bacillus*
cereus, *Geobacillus kaustophilus*, *Bacillus halodurans*, *Solibacter*
5 *usitatus*, *Streptococcus suis*, *Bacillus licheniformis*, *Listeria*
monocytogenes, *Deinococcus geothermalis*, *Chloroflexus aurantiacus*,
Rubrobacter xylanophilus, *Desulfitobacterium hafniense*, *Arthrobacter* sp.
FB24, *Bacillus clausii*, *Rhodospirillum rubrum*, *Staphylococcus*
haemolyticus, *Corynebacterium glutamicum*, *Enterococcus faecium*,
10 *Bacillus subtilis*, *Symbiobacterium thermophilum*, *Thermococcus*
kodakarensis et *Exiguobacterium* sp. 255-15.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que
la 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase est codée par un acide nucléique
15 provenant d'un organisme eucaryote appartenant à une espèce choisie
parmi *Homo sapiens*, *Gallus gallus*, *Canis familiaris*, *Mus musculus*,
Caenorhabditis elegans, *Anopheles gambiae*, *Danio rerio*, *Xenopus*
tropicalis, *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium*
falciparum, *Apis mellifera*, *Drosophila melanogaster*, *Entamoeba*
20 *histolytica*, *Aspergillus fumigatus*, *Strongylocentrotus purpuratus*, et
Aspergillus nidulans.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'à
l'étape a), le milieu réactionnel consiste en une culture de cellules
25 procaryotes ou eucaryotes produisant une 2-déoxyribose-5-phosphate
aldolase.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que les cellules
procaryotes ou eucaryotes consistent en des cellules produisant
30 naturellement une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase.

15. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que les cellules procaryotes ou eucaryotes consistent en des cellules recombinantes dans lesquelles a été inséré un acide nucléique codant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase.

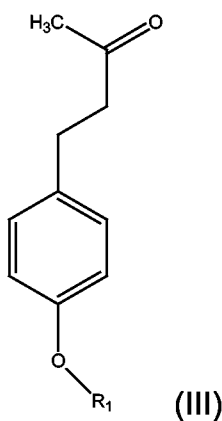
5

16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le milieu réactionnel consiste en une composition acellulaire comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase.

10 17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le milieu réactionnel consiste en une composition liquide comprenant un extrait enzymatique obtenu à partir d'une culture de cellules procaryotes ou eucaryotes produisant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase.

15 18. Procédé selon l'une des revendications 1 et 3 à 17, caractérisé en ce que lorsque le groupe R_1 du composé (II) signifie $-CH_3$, le procédé comprend une étape additionnelle c) de conversion dudit composé (II) en p-hydroxyphényl-3-butène-2-one.

20 19. Procédé d'obtention d'un composé de formule (III) suivante :



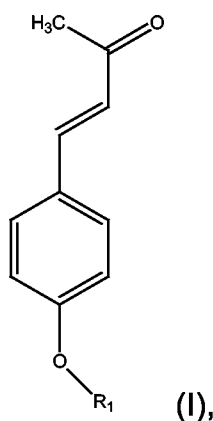
dans laquelle R_1 représente l'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié non substitué ayant de 1 à 4 atomes de carbone, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) obtenir un composé de formule (I) à partir d'un composé de formule (II) en réalisant le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18;
- b) synthétiser le composé de formule (III) par réduction chimique ou enzymatique du composé de formule (I) obtenu à l'étape a).
- 5

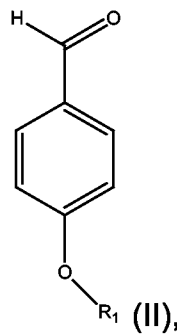
20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le composé de formule (II) possède un groupe R_1 qui signifie l'hydrogène ou un groupe $-CH_3$, et en ce que le composé de formule (III) est le p-hydroxyphényl-butan-2-one.

10

21. Kit pour la préparation par biosynthèse du composé de formule (I) suivant :



- 15 dans laquelle R_1 représente l'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié non substitué ayant de 1 à 4 atomes de carbone, ledit kit comprenant :
- a) un milieu réactionnel comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase ;
- 20 b) un composé de formule (II) suivante :



dans laquelle R_1 représente l'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié non substitué ayant de 1 à 4 atomes de carbone, et
c) facultativement, de l'acétone.

5

22. Kit selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il comprend un composé de formule (II) dans lequel R_1 représente un atome d'hydrogène.

10 23. Kit selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il comprend un composé de formule (II) dans lequel R_1 représente $-\text{CH}_3$.

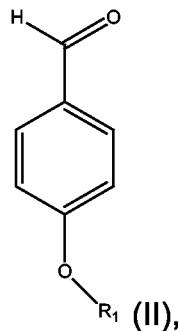
24. Kit selon l'une des revendications 21 à 23, caractérisé en ce que le milieu réactionnel consiste en une composition comprenant des cellules
15 procaryotes ou eucaryotes produisant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase.

25. Kit selon l'une des revendications 21 à 23, caractérisé en ce que le milieu réactionnel consiste en une composition acellulaire comprenant
20 une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase.

26. Kit pour préparer un composé de formule (III) tel que défini dans la revendication 19, à partir d'un composé de formule (II) tel que défini dans la revendication 1, ledit kit comprenant :

25 a) un milieu réactionnel comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase ;

b) un composé de formule (II) suivante :



dans laquelle R_1 représente l'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié non substitué ayant de 1 à 4 atomes de carbone,

5 c) facultativement, de l'acétone, et

d) le ou les réactifs chimiques ou enzymatiques nécessaires à la conversion d'un composé de formule (I) en un composé de formule (III)

10 27. Kit selon la revendication 26, caractérisé en ce que le milieu réactionnel consiste en une culture de cellules procaryotes ou eucaryotes produisant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase.

15 28. Kit selon la revendication 26, caractérisé en ce que le milieu réactionnel consiste en une composition liquide comprenant une 2-déoxyribose-5-phosphate aldolase.

20 29. Kit selon l'une quelconque des revendications 26 à 28, caractérisé en ce qu'il comprend un réactif enzymatique choisi parmi des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* et un extrait enzymatique de *Saccharomyces cerevisiae*.

25 30. Kit selon l'une quelconque des revendications 26 à 28, caractérisé en ce qu'il comprend un réactif chimique consistant en un catalyseur d'hydrogénation.

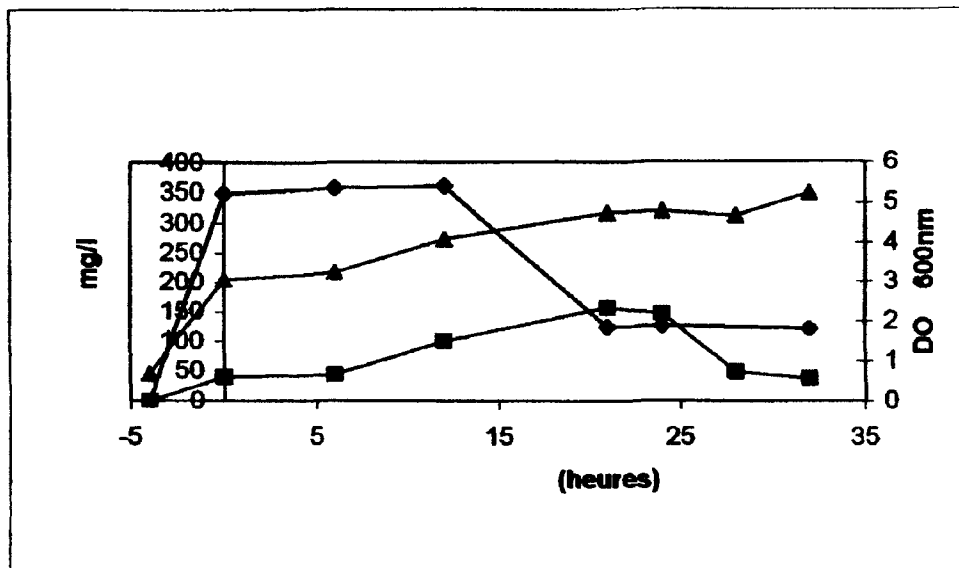


Figure 1

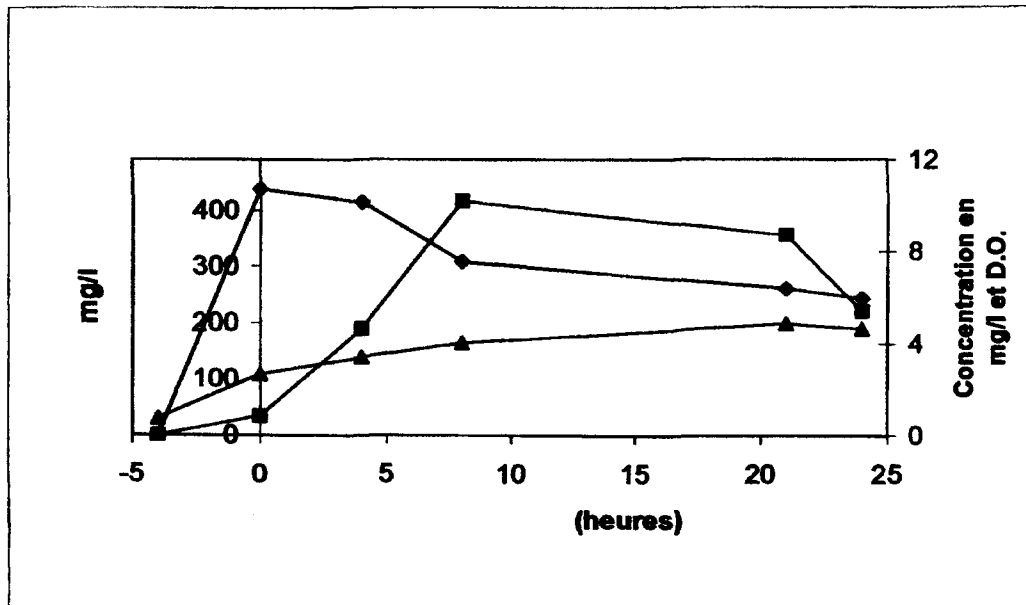


Figure 2

2/4

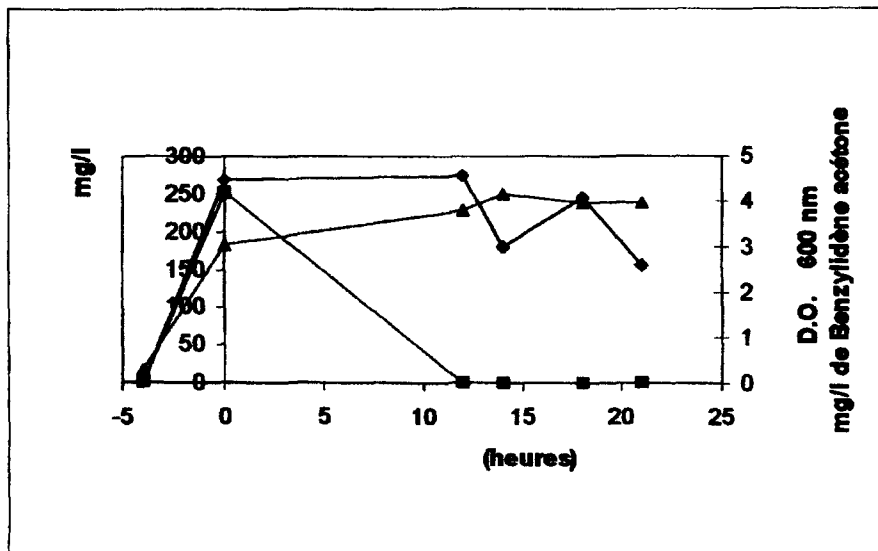


Figure3

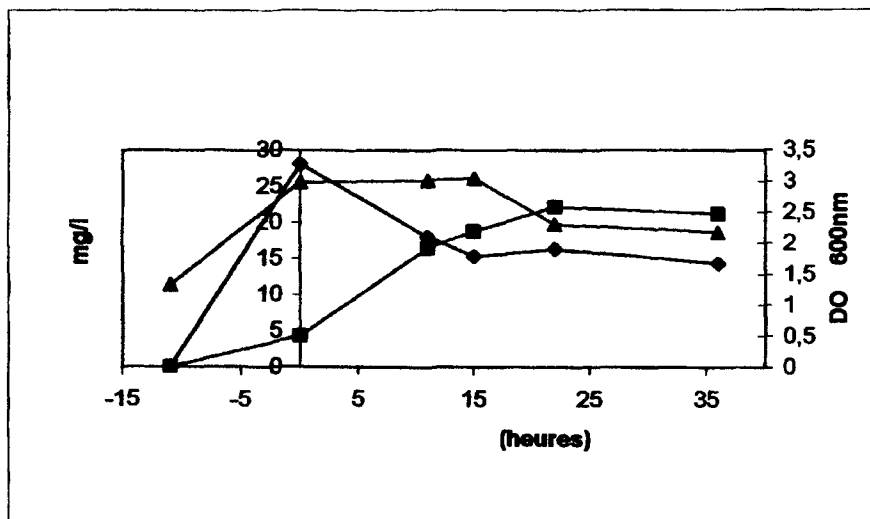


Figure4

3/4

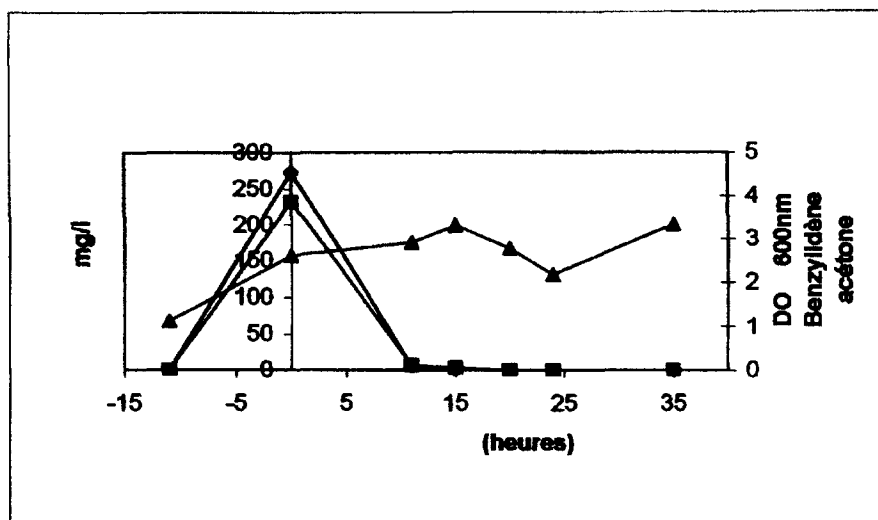


Figure 5

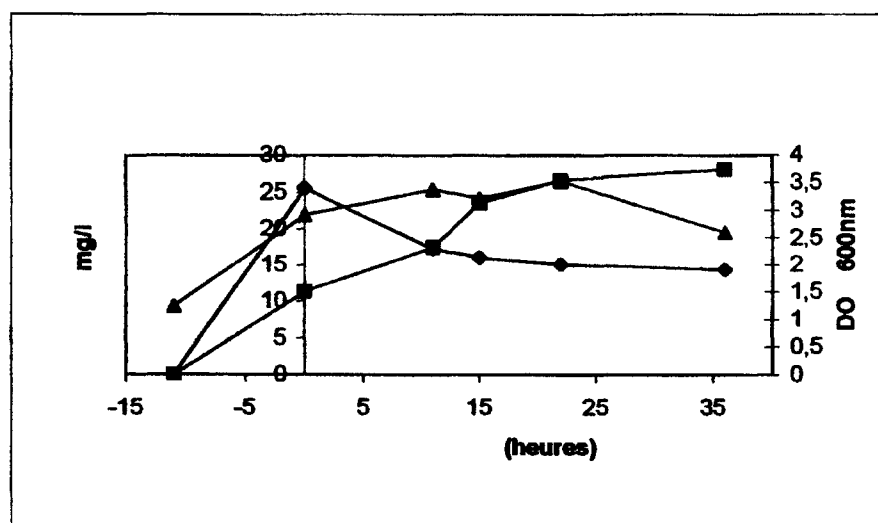


Figure 6

4/4

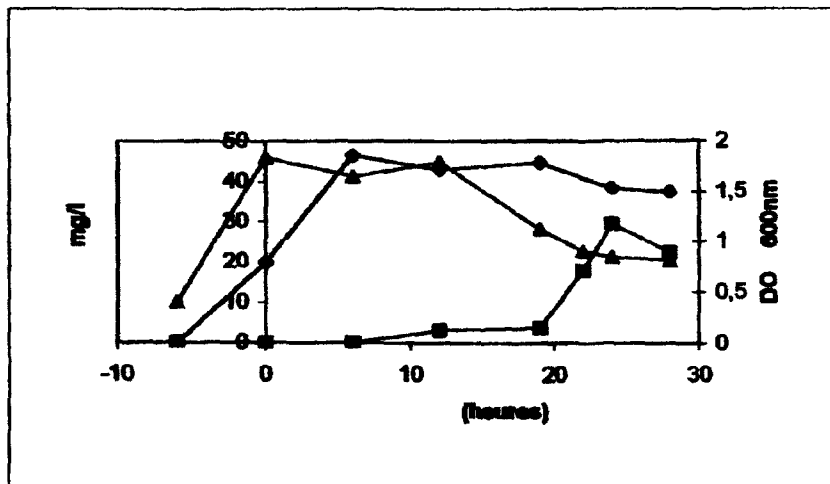


Figure 7

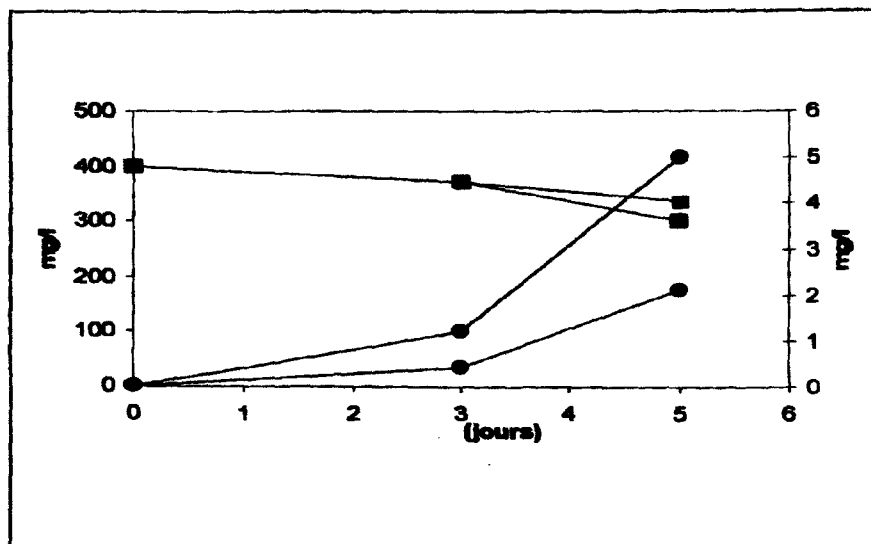


Figure 8