



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12P 7/42, C12N 9/02</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/34008</b> (43) Date de publication internationale: 8 juillet 1999 (08.07.99)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02819 (22) Date de dépôt international: 22 décembre 1998 (22.12.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/16727 24 décembre 1997 (24.12.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC AGRO [FR/FR]; 14/20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DEROSE, Richard [US/FR]; 31, rue du Bois Guillaume, F-91000 Evry (FR). SAILLAND, Alain [FR/FR]; 38, rue Albert Chalinel, F-69009 Lyon (FR). (74) Mandataire: TETAZ, Franck; Rhône-Poulenc Agro, DPI - 14/20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	
<p>(54) Title: METHOD FOR ENZYMATIC PREPARATION OF HOMOGENTISATE (54) Titre: PROCEDE DE PREPARATION ENZYMATIQUE D'HOMOGENTISATE (57) Abstract The invention concerns a method for enzymatic preparation of homogentisate (HMO) from 4-hydroxypyruvate (HPP), characterised in that it consists in carrying out in a suitable reaction medium the following enzymatic reactions: enzymatic conversion of HPP into 4-hydroxyphenylacetate (HPA) with a first appropriate enzyme; then an enzymatic conversion of HPA into HMO with a second appropriate enzyme. (57) Abrégé La présente invention concerne un procédé de préparation enzymatique d'homogentisate (HMO) à partir de 4-hydroxypyruvate (HPP), caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer dans un milieu réactionnel approprié les réactions enzymatiques suivantes: conversion enzymatique du HPP en 4-hydroxyphénylacétate (HPA) par une première enzyme appropriée, puis, conversion enzymatique de HPA en HMO par une deuxième enzyme appropriée.</p>		

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

<b>AL</b>	Albanie	<b>ES</b>	Espagne	<b>LS</b>	Lesotho	<b>SI</b>	Slovénie
<b>AM</b>	Arménie	<b>FI</b>	Finlande	<b>LT</b>	Lituanie	<b>SK</b>	Slovaquie
<b>AT</b>	Autriche	<b>FR</b>	France	<b>LU</b>	Luxembourg	<b>SN</b>	Sénégal
<b>AU</b>	Australie	<b>GA</b>	Gabon	<b>LV</b>	Lettonie	<b>SZ</b>	Swaziland
<b>AZ</b>	Azerbaïdjan	<b>GB</b>	Royaume-Uni	<b>MC</b>	Monaco	<b>TD</b>	Tchad
<b>BA</b>	Bosnie-Herzégovine	<b>GE</b>	Géorgie	<b>MD</b>	République de Moldova	<b>TG</b>	Togo
<b>BB</b>	Barbade	<b>GH</b>	Ghana	<b>MG</b>	Madagascar	<b>TJ</b>	Tadjikistan
<b>BE</b>	Belgique	<b>GN</b>	Guinée	<b>MK</b>	Ex-République yougoslave de Macédoine	<b>TM</b>	Turkménistan
<b>BF</b>	Burkina Faso	<b>GR</b>	Grèce	<b>ML</b>	Mali	<b>TR</b>	Turquie
<b>BG</b>	Bulgarie	<b>HU</b>	Hongrie	<b>MN</b>	Mongolie	<b>TT</b>	Trinité-et-Tobago
<b>BJ</b>	Bénin	<b>IE</b>	Irlande	<b>MR</b>	Mauritanie	<b>UA</b>	Ukraine
<b>BR</b>	Brésil	<b>IL</b>	Israël	<b>MW</b>	Malawi	<b>UG</b>	Ouganda
<b>BY</b>	Bélarus	<b>IS</b>	Islande	<b>MX</b>	Mexique	<b>US</b>	Etats-Unis d'Amérique
<b>CA</b>	Canada	<b>IT</b>	Italie	<b>NE</b>	Niger	<b>UZ</b>	Ouzbékistan
<b>CF</b>	République centrafricaine	<b>JP</b>	Japon	<b>NL</b>	Pays-Bas	<b>VN</b>	Viet Nam
<b>CG</b>	Congo	<b>KE</b>	Kenya	<b>NO</b>	Norvège	<b>YU</b>	Yougoslavie
<b>CH</b>	Suisse	<b>KG</b>	Kirghizistan	<b>NZ</b>	Nouvelle-Zélande	<b>ZW</b>	Zimbabwe
<b>CI</b>	Côte d'Ivoire	<b>KP</b>	République populaire démocratique de Corée	<b>PL</b>	Pologne		
<b>CM</b>	Cameroun	<b>KR</b>	République de Corée	<b>PT</b>	Portugal		
<b>CN</b>	Chine	<b>KZ</b>	Kazakstan	<b>RO</b>	Roumanie		
<b>CU</b>	Cuba	<b>LC</b>	Sainte-Lucie	<b>RU</b>	Fédération de Russie		
<b>CZ</b>	République tchèque	<b>LI</b>	Liechtenstein	<b>SD</b>	Soudan		
<b>DE</b>	Allemagne	<b>LK</b>	Sri Lanka	<b>SE</b>	Suède		
<b>DK</b>	Danemark	<b>LR</b>	Libéria	<b>SG</b>	Singapour		
<b>EE</b>	Estonie						

### Procédé de Préparation enzymatique d'homogentisate

La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation enzymatique d'homogentisate, ou acide 2,5-dihydroxy-phényl acétique (ci-après HMO).

5 L'HMO est un précurseur connu de molécules appelées les pigments ochronotiques qui sont des analogues de la mélanine. Ces molécules brunes sont d'ailleurs souvent citées comme "melanine like pigments", qui trouvent une application variée dans la cosmétique ou l'industrie pharmaceutique. L'addition de mélanine ou mélanine like pigments dans les laits solaires auraient un effet protecteur intéressant. Pour produire ces dérivés ochronotiques à  
10 partir d'HGA le procédé est simple puisque la molécule s'auto-oxyde rapidement en conditions alcalines. Différents procédés de préparation enzymatique d'HMO à partir d'acide 1-phényl acétique ou de tyrosine sont décrits dans l'état de la technique (WO 93/08295 ou EP 343 330), de même que la préparation subséquente de mélanine.

On sait également que l'HMO est un composé essentiel à la vie des plantes. Dans les  
15 cellules végétales, l'HMO est le produit de transformation enzymatique du 4-hydroxyphénylpyruvate (ci-après HPP) par la 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygénase (ci-après HPPD). Les inhibiteurs de cette enzyme sont des composés herbicides qui bloquent la production d'HMO dans la cellule végétale (Pallett K. E. et *al.* 1997 Pestic. Sci. 50 83-84). Lorsque l'on fait germer des plantes, d'*Arabidopsis thaliana* par exemple, sur milieu  
20 synthétique en présence d'un inhibiteur de l'HPPD, les plantes vont germer, rester blanches puis mourir très rapidement. Or, si dans le milieu synthétique additionné d'un inhibiteur de l'HPPD, on ajoute de l'HMO les plantes vont germer normalement et rester vertes tant que le milieu contiendra de l'HMO. Il est donc également important de pouvoir disposer d'HMO pour prévenir les carences des plantes liées à un dysfonctionnement métabolique de la  
25 biosynthèse de l'HMO, naturel ou induit notamment par des inhibiteurs de l'HPPD.

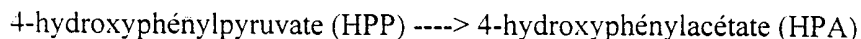
La présente invention concerne donc un procédé de préparation enzymatique d'HMO à partir de l'HPP, et plus particulièrement un procédé de préparation enzymatique d'HMO à partir de l'HPP insensible aux inhibiteurs de l'HPPD.

Le procédé selon l'invention consiste à effectuer dans un milieu réactionnel approprié  
30 les réactions enzymatiques suivantes:

- conversion enzymatique du HPP en 4-hydroxyphénylacétate (ci-après HPA) par une première enzyme appropriée, puis

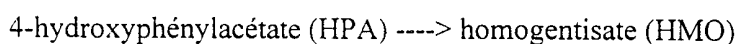
- conversion enzymatique de HPA en HMO par une deuxième enzyme appropriée.

La première réaction enzymatique suivante



est catalysée par une HPP-oxydase appropriée. De telles oxydases se trouvent dans de nombreuses espèces procaryotiques ou eucaryotiques, en particulier dans les bactéries capables de pousser sur l'HPP comme seule source de carbone, le transformant en HPA, plus particulièrement chez un *Arthrobacter* où une telle oxydase responsable d'une étape du catabolisme de la tyrosine (Blakley, E.R. 1977 Canadian Journal of Microbiology 23 1128-1139).

La deuxième réaction enzymatique suivante :



est catalysée par une HPA-hydroxylase appropriée. De telles hydroxylases se trouvent dans de nombreuses espèces procaryotiques ou eucaryotiques, en particulier dans les bactéries capables de pousser sur l'HPA comme seule source de carbone, le transformant en HMO, plus particulièrement chez *Pseudomonas acidovorans*, souvent appelée *Comamonas acidovorans*. (Hareland. W.A. et al 1975 Journal of Bacteriology 121 272-285) chez certaines *Xanthobacter* (Van Den Tweel W. J. J. et al. 1986 Antonie van Leeuwenhoek 52 309-318), chez *Pseudomonas alcaligenes* (Karigar C. S. et Pujar B. G. 1993 FEMS Microbiology Letters 110 59-64), chez *Flavobacterium sp* (Van Den Tweel W. J. J. et al. 1988 Arch Microbiol. 149 207-213), chez *Bacillus subtilis* (Crawford R. L. 1978 FEMS Microbiology Letters 4 233-234), chez *Nocardia sp* DM1 (Raju S. G. et Vaidyanathan C. S. 1986 J.Indian Inst. Sci. 66 511-520) et chez *Rhodococcus erythropolis* (Suemori A. et al. 1996 Journal of Fermentation And Bioengineering Vol 81, N°2 133-137).

De manière avantageuse, l'HPA-hydroxylase employée dans le procédé selon l'invention est extraite de *Pseudomonas acidovorans*.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les deux réactions enzymatiques sont effectuées dans le même milieu réactionnel contenant de l'HPP, les deux enzymes appropriées étant présentes ensemble simultanément dans le milieu réactionnel.

Les deux enzymes appropriées peuvent être introduites dans le milieu réactionnel approprié sous forme d'extrait protéique, ledit extrait protéique pouvant être brut ou purifié totalement ou en partie, ou encore produites in situ par des organismes biologiques appropriés. Elles peuvent être ainsi produites in situ par chaque organisme biologique

produisant naturellement les deux enzymes, ou encore par un seul organisme biologique modifié de manière qu'il produise les deux enzymes. Cet organisme biologique peut être une bactérie, une levure ou encore une cellule végétale.

Les deux enzymes étant insensibles aux inhibiteurs de l'HPPD, le procédé selon l'invention peut être conduit en présence d'un inhibiteur de l'HPPD dans le milieu réactionnel approprié.

Le milieu réactionnel approprié est constitué par tout milieu aqueux dont les conditions de température, de pH et de force ionique sont appropriés pour les réactions enzymatiques. Lorsque les enzymes sont produites in situ par un ou plusieurs organismes biologiques, le milieu réactionnel est approprié pour la croissance desdits organismes.

En fin de réaction, l'HMO peut être isolé du milieu réactionnel et purifié, ou bien laissé dans le milieu réactionnel. Dans ce deuxième cas, le milieu réactionnel contenant l'HMO peut être employé comme milieu nutritif pour la culture de plantes, plus particulièrement pour la culture de plantes présentant un dysfonctionnement métabolique de la biosynthèse de l'HMO, naturel ou induit notamment par des inhibiteurs de l'HPPD.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, sans toutefois chercher à en limiter la portée.

#### **Exemple 1: Production d'HPA à partir d'HPP avec un extrait protéique d'*Arthrobacter***

##### Culture d'*Arthrobacter* :

*Arthrobacter globiformis* est cultivé à 28°C, 220 tours par minute pendant 20 heures en Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu A supplémenté avec 0,1% L-tyrosine et 0,01 % d'extrait de levure [milieu A composé en gramme par litre de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5)  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (3,5)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1)  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,1)  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01)  $\text{NaMoO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01)  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,01)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,05)].

##### Extraction et dosage de l'activité HPP-oxidase.

A partir de 2,1 litres de culture un culot de cellules est récupérée par centrifugation à 3000 xg pendant 15 min. Le culot est lavé avec de l'eau distillé puis recentrifugé. Toutes les étapes ultérieures sont faites à 4°C.

30 Le culot de cellules, environ 3,4g est resuspendu dans 7 ml de tampon d'extraction (phosphate de potassium 0.05M pH7,5, TPP 0.1mM,  $\text{MgCl}_2$  0,1mM et mercaptoethanol 5mM) et soniqué à 23kHz pendant 2,5 min. 2 fois. La suspension résultante est centrifugée à

44 000 xg pendant 20 min. Le surnageant récolté est centrifugé à nouveau à 100 000 xg pendant 60 min. Le nouveau surnageant faisant 7 ml est additionné de 0.7 ml de protamine sulfate 2% dans le tampon d'extraction suivi d'une agitation douce. Le précipité qui se forme est éliminé par une centrifugation à 20 000 xg pendant 20 min. Le surnageant ainsi obtenu est additionné graduellement de sulfate d'ammonium pour arriver à 60% de la saturation. Cette nouvelle préparation est agitée 30 min. et le précipité formé récolté par centrifugation à 20 000 xg pendant 20 min. Le culot est resolubilisé dans 0,5 ml de tampon d'extraction et aliquoté en fractions de 0,1ml, fractions gardées à -80°C avant usage.

L'activité HPP-oxidase est mesurée en plaque de microtitration 96 puits avec 200 µl de réaction par puits consistant en 149,8 µl de sodium phosphate 67 mM pH7,4, 10µl de glutathion 13,4mM, 10µl de MgCl<sub>2</sub> 67 mM, 10µl de TPP 26,7mM, 10µl de FAD 67µM, 0,2µl de protéine (soit environ 6µg) et 10 µl d'HPP 2,5mM.

Quand on fait un essai d'inhibition par un inhibiteur de l'HPPD on ajoute 2µl de 4-[4-trifluorométhyle-2-(méthylsulfonyl)-benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole 10mM dans un tampon phosphate contenant 20% DMSO.

La réaction est initiée par l'addition du substrat, l'HPP, elle se déroule à 30°C pendant 5 min. sous agitation. La réaction est arrêtée par addition de 33 µl d'acide perchlorique 25%.

La plaque est ensuite centrifugée à 2000 tours par minute pendant 15 min. et le surnageant analysé par HPLC. 50 µl du surnageant est injecté sur une colonne Spherisorb ODS2 équilibrée avec le tampon A (acétonitrile 5,5%, TFA 0,1%) au débit de 1,5ml/min.

Le programme d'élution utilisé est:

0 min.: 0% de tampon B (acétonitrile)

6 min.: 15% de tampon B

6,5 min.: 15% de tampon B

7 min.: 60 % de tampon B

8 min.: 60 % de tampon B

8,5 min.: 0 % de tampon B

La détection est faite à 276 nm.

Le HPA produit par l'extrait enzymatique à partir d'HPP est comparé à une référence constituée d'HPA commercial en terme de temps de rétention et pic d'absorption spectrale.

#### Résultats.

L'analyse HPLC montre que l'extrait protéique extrait d'*Arthrobacter globiformis*

cultivée sur tyrosine comme source majeure de carbone, est capable de transformer l'HPP en HPA (la molécule produite comigre parfaitement avec l'HPA commercial de référence).

L'enzyme responsable de cette réaction n'est pas inhibée par 100  $\mu$ M d'inhibiteur de l'HPPD.

5

### **Exemple 2: Production d'HMO à partir d'HPA avec un extrait protéique de *Pseudomonas***

#### Culture de l'organisme.

*Pseudomonas acidovorans* est cultivé à 28°C, 220 tours par minute pendant 20 heures en Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu B supplémenté avec 0,15% HPA et 0,01 % d'acide nitrilotriacétique. [ milieu B composé en gramme par litre de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O (4,25) NH<sub>4</sub>Cl (2) FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,012) ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,003) MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,003) CoSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,01) MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2).]

#### Extraction et dosage de l'activité HPA-hydroxylase.

15 A partir de 0,1 litres de culture un culot de cellules est récupérée par centrifugation à 7500 xg pendant 10 min. Le culot est lavé avec de l'eau distillé puis recentrifugé. Toutes les étapes ultérieures sont faites à 4°C.

Le culot de cellules, environ 0,5 g est resuspendu dans 1,5 ml de tampon d'extraction (phosphate de potassium 0,1 M pH7,2, DTE 1 mM, MgMgSO<sub>4</sub> 5mM) et soniqué à 23 kHz pendant 2,5 min. 2 fois. La suspension résultante est centrifugée à 44 000 xg pendant 20 min. Le surnageant récolté est centrifugé à nouveau à 100 000 xg pendant 60 min. Le nouveau surnageant est aliquoté en fractions de 0,1ml, fractions gardées à -80°C avant usage.

25 L'activité HPA-hydroxylase est mesurée en plaque de microtitration 96 puits avec 200 $\mu$ l de réaction par puits consistant en 150  $\mu$ l de sodium phosphate 0,1M pH7,2, 10 $\mu$ l de DTE 20 mM, 10 $\mu$ l de NADH 3 mM, 15 $\mu$ l de FAD 67 $\mu$ M, 10 $\mu$ l de protéine (soit environ 7 $\mu$ g) et 5  $\mu$ l d'HPA 10 mM.

Quand on fait un essai d'inhibition par un inhibiteur de l'HPPD on ajoute 2 $\mu$ l de 4-[4-trifluorométhyle-2-(méthylsulfonyl)-benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole 10 mM dans un tampon phosphate contenant 20% DMSO.

30 La réaction est initiée par l'addition du substrat, l'HPA, elle se déroule à 30°C pendant 5 min. sous agitation. La réaction est arrêtée par addition de 33 $\mu$ l d'acide perchlorique 25%.

La plaque est ensuite centrifugée à 2000 tours par minute pendant 15 min. et le

surnageant analysé par HPLC. 10µl du surnageant est injecté sur une colonne Spherisorb ODS2 équilibrée avec le tampon A (acétonitrile 5,5%, TFA 0.1%) au débit de 1,5ml/min.

Le programme d'élution utilisé est:

0 min.: 0% de tampon B (acétonitrile)

5 0.8 min.: 0% de tampon B

1 min.: 60% de tampon B

1.7 min.: 60 % de tampon B

1,9 min.: 0 % de tampon B

5 min.: 0 % de tampon B

10 La détection est faite à 292 nm.

Le HMO produit par l'extrait enzymatique à partir d'HPA est comparé à une référence constituée d'HMO commercial en terme de temps de rétention et pic d'absorption spectrale.

#### Résultats.

15 L'analyse HPLC a permis de montrer que l'extrait protéique extrait de *Pseudomonas acidovorans* est capable de transformer l'HPA en HMO (la molécule produite co-migre parfaitement avec l'HMO commercial de référence).

L'enzyme responsable de cette réaction n'est pas inhibée dans nos conditions de test par 100µM d'inhibiteur d'HPPD.

### 20 **Exemple 3: Production d'HMO à partir d'HPP avec un extrait protéique d'*Arthrobacter* et de *Pseudomonas***

#### L'activité HPP-oxidase couplée à l'activité HPA-hydroxylase

25 L'activité HPP-oxidase couplée à l'activité HPA-hydroxylase est mesurée en plaque de microtitration 96 puits avec 200µl de réaction par puits consistant en 100 µl de sodium phosphate 100 mM pH7.2, 10µl de DTE 20 mM, 10µl de NADH 3 mM, 15µl de FAD 67 µM, 10µl de glutathion 13,4 mM, 10µl de MgCl<sub>2</sub> 67 mM, 10µl de TPP 26,7 mM, 2µl d'extrait HPP-oxidase (soit environ 60 µg), 25µl d'extrait d'HPA-hydroxylase (soit environ 18 µg) et 10 µl d'HPP 10 mM.

30 La réaction est initiée par l'addition du substrat, l'HPP, elle se déroule à 30°C pendant 30 min sous agitation. La réaction est arrêtée par addition de 33 µl d'acide perchlorique 25%.

La plaque est ensuite centrifugée à 2000 tours par minute pendant 15 min. et le surnageant analysé par HPLC. 25µl du surnageant est injecté sur une colonne Spherisorb

ODS2 équilibrée avec le tampon A (acétonitrile 5,5%, TFA 0,1%) au débit de 1,5ml/min.

Le programme d'élution utilisé est:

0 min.: 0% de tampon B (acétonitrile)

6 min.: 15% de tampon B

5 6,5 min.: 15% de tampon B

7 min.: 60 % de tampon B

8 min.: 60 % de tampon B

8,5 min.: 0 % de tampon B

La détection est faite à 276 nm et 292 nm simultanément

10 Résultats.

L'analyse HPLC a permis de montrer que l'extrait protéique extrait d'*Arthrobacter globiformis* associé à celui de *Pseudomonas acidovorans* est capable de transformer simultanément l'HPP en HMO (la molécule produite comigre parfaitement avec l'HM commercial de référence).

### Revendications

1. Procédé de préparation enzymatique d'homogentisate (HMO) à partir de 4-hydroxypyruvate (HPP), caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer dans un milieu réactionnel approprié les réactions enzymatiques suivantes:
- 5 - conversion enzymatique du HPP en 4-hydroxyphénylacétate (HPA) par une première enzyme appropriée, puis
- conversion enzymatique de HPA en HMO par une enzyme deuxième appropriée.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la première conversion enzymatique est catalysée par une HPP-oxydase appropriée.
- 10 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'HPP-oxydase provient de bactéries capables de pousser sur l'HPP comme seule source de carbone.
4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'HPP-oxydase provient d'*Arthrobacter*.
- 15 5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la deuxième conversion enzymatique est catalysée par une HPA-hydroxylase appropriée.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'HPA-hydroxylase provient de bactéries capables de pousser sur l'HPA comme seule source de carbone.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que les bactéries sont choisies
- 20 parmi *Pseudomonas acidovorans*, *Xanthobacter*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Flavobacterium* sp., *Bacillus subtilis*, *Nocardia* sp DM1 et *Rhodococcus erythropolis*.
8. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'HPA-hydroxylase est extraite de *Pseudomonas acidovorans*.
9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les deux
- 25 réactions enzymatiques sont effectuées dans le même milieu réactionnel contenant de l'HPP, les deux enzymes appropriées étant présentes ensemble simultanément dans le milieu réactionnel.
10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les deux enzymes appropriées sont introduites dans le milieu réactionnel approprié sous forme
- 30 d'extraits protéiques, ou encore produites in situ par des organismes biologiques appropriés.
11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il est réalisé en présence d'un inhibiteur de l'HPPD dans le milieu réactionnel approprié.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02819

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12P7/42 C12N9/02				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12P C12N				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	EP 0 343 330 A (MILES INC) 29 November 1989 cited in the application see the whole document ---	1-10		
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 15, 9 October 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 193271, SUEMORI, AKIO ET AL: "L-Phenylalanine and L-tyrosine degradative pathways in Rhodococcus erythropolis" XP002079481 see abstract & SEIMEI KOGAKU KOGYO GIJUTSU KENKYUSHO KENKYU HOKOKU (1995), 3(2), 33-6 CODEN: SKGIEM; ISSN: 0919-5351, 1995, --- -/--	1-10		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.				
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
° Special categories of cited documents :				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;">                     "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                      "E" earlier document but published on or after the international filing date                      "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)                      "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                      "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                 </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;">                     "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                      "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                      "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.                      "&amp;" document member of the same patent family                 </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">11 March 1999</div>		Date of mailing of the international search report  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">18/03/1999</div>		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Lejeune, R</div>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02819

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BLAKLEY E R: "The catabolism of L-tyrosine by an Arthrobacter sp." CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 23, 1977, pages 1128-1139, XP002079478                      cited in the application                      see abstract                      see page 1132 - page 1134</p>	4
A	<p>SUEMORI A ET AL: "Purification and characterisation of o-hydroxyphenylacetate 5-hydroxylase, m-hydroxyphenylacetate 6-hydroxylase and p-hydroxyphenylacetate 1-hydroxylase from Rhodococcus erythropolis." JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 81, no. 2, 1996, pages 133-137, XP002079479                      cited in the application                      see abstract                      see figure 1</p>	7
A	<p>HARELAND W A ET AL: "Metabolic function and properties of 4-hydroxyphenylacetic acid 1-hydroxylase from Pseudomonas acidovorans." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 121, no. 1, 1975, pages 272-285, XP002079480                      cited in the application                      see abstract</p>	8
A	<p>WO 93 08295 A (BASF AG) 29 April 1993                      cited in the application                      see examples 2-5</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02819

Patent document cited in search report	A	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0343330	A	29-11-1989	US 4877728	31-10-1989
			JP 1277495	07-11-1989
			US 4956279	11-09-1990
WO 9308295	A	29-04-1993	DE 4134774	06-05-1993
			AT 169961	15-09-1998
			CA 2121048	29-04-1993
			DE 59209468	24-09-1998
			EP 0609254	10-08-1994
			ES 2118828	01-10-1998
			JP 7500498	19-01-1995

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No

PCT/FR 98/02819

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 C12P7/42 C12N9/02

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

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

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

CIB 6 C12P C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 343 330 A (MILES INC) 29 novembre 1989 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-10
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 15, 9 octobre 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 193271, SUEMORI, AKIO ET AL: "L-Phenylalanine and L-tyrosine degradative pathways in Rhodococcus erythropolis" XP002079481 voir abrégé & SEIMEI KOGAKU KOGYO GIJUTSU KENKYUSHO KENKYU HOKOKU (1995), 3(2), 33-6 CODEN: SKGIEM;ISSN: 0919-5351,1995, ---	1-10
	-/--	

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

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document utilisateur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 mars 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18/03/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De le Internationale No  
PCT/FR 98/02819

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BLAKLEY E R: "The catabolism of L-tyrosine by an Arthrobacter sp." CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 23, 1977, pages 1128-1139, XP002079478 cité dans la demande voir abrégé voir page 1132 - page 1134 ----</p>	4
A	<p>SUEMORI A ET AL: "Purification and characterisation of o-hydroxyphenylacetate 5-hydroxylase, m-hydroxyphenylacetate 6-hydroxylase and p-hydroxyphenylacetate 1-hydroxylase from Rhodococcus erythropolis." JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 81, no. 2, 1996, pages 133-137, XP002079479 cité dans la demande voir abrégé voir figure 1 ----</p>	7
A	<p>HARELAND W A ET AL: "Metabolic function and properties of 4-hydroxyphenylacetic acid 1-hydroxylase from Pseudomonas acidovorans." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 121, no. 1, 1975, pages 272-285, XP002079480 cité dans la demande voir abrégé ----</p>	8
A	<p>WO 93 08295 A (BASF AG) 29 avril 1993 cité dans la demande voir exemples 2-5 -----</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De l'Organisation Mondiale de Propriété Industrielle No

PCT/FR 98/02819

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0343330 A	29-11-1989	US 4877728 A	31-10-1989
		JP 1277495 A	07-11-1989
		US 4956279 A	11-09-1990
-----			
WO 9308295 A	29-04-1993	DE 4134774 A	06-05-1993
		AT 169961 T	15-09-1998
		CA 2121048 A	29-04-1993
		DE 59209468 D	24-09-1998
		EP 0609254 A	10-08-1994
		ES 2118828 T	01-10-1998
		JP 7500498 T	19-01-1995
-----			