

Mensuel
numéro

8-9

Août-sept 2002

l'actualité chimique

La catalyse enzymatique

Et si c'était
nous, l'avenir
de la chimie ?



Marie-Claude 07.2002

sfc
société
française
de chimie

SEMINAIRE

EUROFORUM
www.euroforum.fr

en partenariat
avec

l'actualité
chimique



Comment maîtriser la coulabilité de vos poudres ?

Effectuez les dosages
les plus précis, évitez les accidents,
améliorez votre productivité, obtenez
des produits de parfaite qualité

Paris, les 5 et 6 novembre 2002

Transport, capacité d'écoulement, compressibilité,
comprimabilité, dispersibilité, stockage...

Avec la participation de :

CNRS

Ecole des Mines d'Albi

Ecole des Mines de Nantes

Ecole Nationale supérieure
de Chimie de Lille

ENSAIA

ENSIA

Hosokawa Micron France

INRA

Iserco SA

Neu International

Sanofi Synthelabo

Sympatech

- Comment mesurer précisément la coulabilité d'une poudre ?
- Quels paramètres intrinsèques faut-il connaître ?
- Quelles conditions extérieures faut-il maîtriser ?
- Comment éviter les états de non fonctionnement ?
- Applications industrielles : quels sont les enseignements à tirer ?

EUROFORUM

Pour obtenir le programme :

Merci de faxer ce coupon au
01 44 88 16 99

à l'attention de Audrey MIAUX

Pour tout renseignement,
merci de contacter Audrey MIAUX
par téléphone au : 01 44 88 14 98
par mail à : ami@euroforum.fr

ou consultez notre site
www.euroforum.fr

02110307

Comment maîtriser la coulabilité de vos poudres ?

Paris, les 5 et 6 novembre 2002

Je souhaite recevoir le programme détaillé de ce séminaire en _____ exemplaires.

Mme Mlle Monsieur

Prénom : _____ Nom : _____

Fonction : _____ Service : _____

Société : _____ E-Mail : _____

Effectif : 0 à 9 10 à 19 20 à 49 50 à 99 100 à 199 200 à 499 +500

Adresse : _____

Code postal : _____ Ville : _____

Tél. direct : _____ Fax direct : _____ Code NAF : _____

RÉDACTION

Rédacteur en chef : Bernard Sillion
Rédactrice en chef adjointe :
Séverine Bléneau-Serdel

Secrétaire de rédaction, maquettiste,
webmaster : Évelyne Girard

Secrétaire de rédaction, activités de la SFC,
manifestations : Roselyne Messal

Chargés de rubrique : Lydia Bonazzola (Enseignement), Yves Dubosc (Livres et médias, Manifestations), Gilbert Schorsch (Industrie), Pierre Vermeulin (Chimie francophone)

Comité de rédaction : P. Aldebert (CNRS), P. Arpino (div. Chim. anal.), A. Audibert-Hayet (IFP), B. Badet (ICSN), X. Bataille (Histoire des sciences), E. Bordes (div. Cat.), J. Buendia (SCI), M. Carrega (div. Matér. polym.), G. Chambaud (com. interdiv. Enseignement), N. Cheymol (CPGE), J.-C. Daniel (groupe Formulation, GFP), R.-E. Eastes (ENS), J.-P. Foulon (UDP), J. Fourmier (club Histoire), Y. Gauduel (div. Chim. phys.), J.-S. Girardon (club des jeunes), G. Gros (chimie des procédés), J.-F. Gruson (IFP), J.-F. Lambert (div. Cat.), P. Pichat (ADT), A. Picot (Prévention des risques chimiques), D. Rutledge (div. Chim. anal.), G. Schorsch (SFC), F. Sécheresse (div. Chim. coord.), H. This (INRA-Collège de France), M. Verduguer (UPMC), P. Vermeulin (CNRS), J.-N. Verpeaux (div. Chim. orga.), C. Viel, D. Vivien (div. Chim. solide)

Journaliste stagiaire : Colin Droniou

Publication analysée ou indexée par :
Chemical Abstracts, la base de données PASCAL

ÉDITION

Société Française de Chimie
250, rue Saint-Jacques, 75005 Paris
Tél. : 01 40 46 71 64 - Fax : 01 40 46 71 61
E-mail : ac@sfc.fr - http://www.sfc.fr

Directeur de la publication : François Mathey,
président de la Société Française de Chimie

Imprimerie : SPEI, BP 26, 54425 Pulnoy

Maquettage articles : e-Press, 197, Bd Zerkouti
20000 Casablanca (Maroc)

ISSN 0151 9093

Commission paritaire n° 0402 G 75884

DIFFUSION

EDP Sciences S.A. 17, avenue du Hoggar,
PA de Courtaboeuf, BP 112, 91944 Les Ulis Cedex A
http://www.edpsciences.org
Tél. : 01 69 18 75 75 - Fax : 01 69 28 84 91
Marketing : Isabelle Pouliquen

PUBLICITÉ

Céline Hoarau, EDP Sciences
Tél. : 01 69 18 15 12 - Fax : 01 69 86 07 65
hoarau@edpsciences.org

© SFC 2002 - Tous droits réservés

Dépôt légal : août-septembre 2002

Toute représentation ou reproduction, intégrale ou partielle, fait sans le consentement de l'auteur, ou des ayants droits, ou ayant cause, est illicite (loi du 11 mars 1957, alinéa 1er de l'article 40). Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code pénal. La loi du 11 mars 1957 n'autorise, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, que les copies et les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective d'une part, et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration.

TARIFS 2002 - L'ACTUALITÉ CHIMIQUE

(11 numéros par an)

Particuliers : France 70 € - Étranger 75 €

Institutions : France 168 € - Étranger 180 €

Membres de la SFC : nous consulter

Abonnement : EDP Sciences

subscribers@edpsciences.org

Prix de vente au numéro : 15,5 €

De Eurochem 2002
à « chimie et société »

Un écho de Eurochem 2002, saisi rapidement : deux jeunes femmes, à la porte de l'auditorium dans lequel l'Union des Industries Chimiques présentait une série de remarquables conférences sur l'impact de la chimie dans la société, vont faire le choix de la session qu'elles vont suivre : « *On ne va pas aller écouter ce que raconte l'industrie...* », le reste s'est perdu dans le brouhaha des discussions des avant-séances.

On voit par là la distance à parcourir pour que les médias et l'opinion puissent être convaincus des réalisations industrielles de la chimie si des « petits maîtres » continuent à professer une défiance méprisante pour tout ce qui est en dehors de l'université !

Fort heureusement, les séances consacrées à l'enseignement ont mis l'accent sur une pédagogie moderne pour les lycées et les classes supérieures. Celle-ci pourrait amener les jeunes à cette discipline qui, comme l'a souligné Pierre Potier, est à de nombreuses sciences ce que le solfège est à la musique.

Mais laissons Eurochem, qui fut un congrès moderne et passionnant, et dont Gilbert Schorsch rendra compte en détail dans un prochain numéro, pour évoquer ce numéro spécial consacré à la chimie enzymatique qui s'inscrit dans une volonté d'élargissement des sujets traités dans *L'Actualité Chimique*.

La rédaction remercie Bernard Badet qui a été un coordonnateur remarquablement efficace pour ce numéro.

Bonne rentrée à toutes et à tous,

Bernard Sillion
Rédacteur en chef

Couverture : illustrations Marine Couderc ©. D.R.

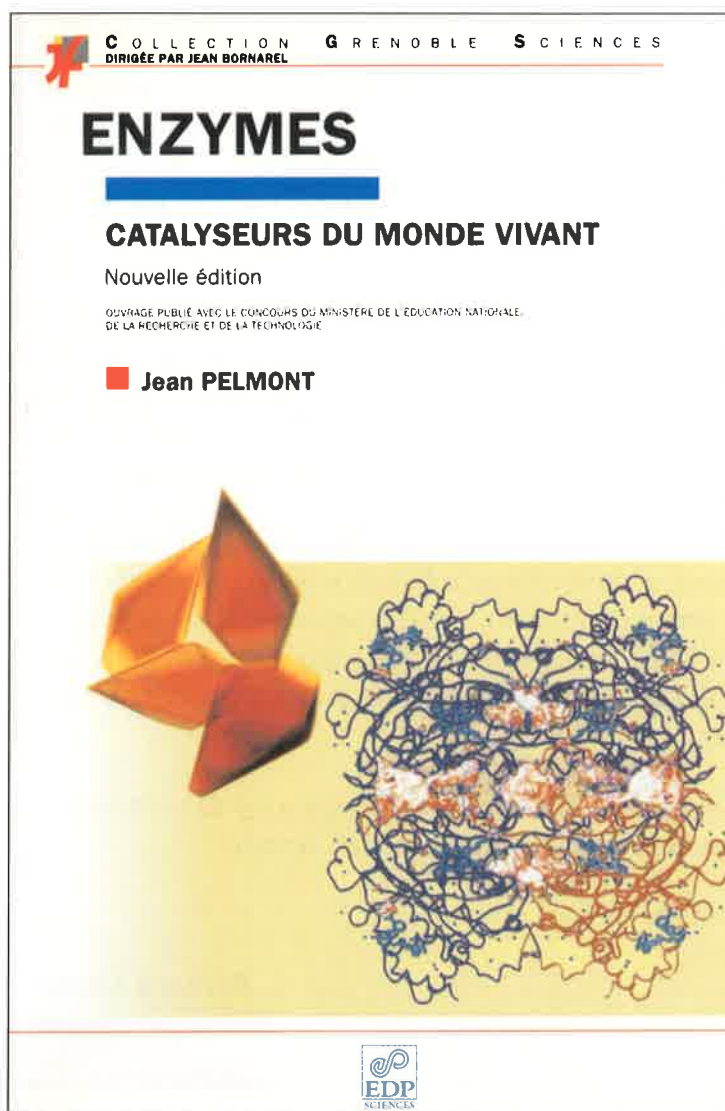
Index des annonceurs

Centre Européen de Bioprospective	III* de couv	IDEXPO	IV* de couv.
Éditions Plon	p. 57	Servcorp	p. 8
EDP Sciences	p. 2	Springer-Verlag	p. 75
Euroforum	II* de couv.		

Enzymes Catalyseurs du monde vivant

Jean Pelmont

Collection Grenoble Sciences



Les enzymes sont les catalyseurs de la vie. Sans ces protéines, les mécanismes extraordinaires qui président à la construction des cellules, à l'architecture des organismes, jusqu'au sommet de l'échelle où sont déterminés les comportements seraient impossibles.

L'ouvrage apporte des informations importantes, étayées par plus de 2 000 références. La lecture est facilitée par 850 croquis ou illustrations, un volumineux glossaire et un index.

Public

Ce livre s'adresse aux étudiants de licences, maîtrises et filières technologiques, ainsi qu'aux étudiants en médecine et en pharmacie. Les enseignants, chercheurs et ingénieurs trouveront ici bon nombre d'informations indispensables.

Jean Pelmont, agrégé de l'Université et ancien élève de l'École normale supérieure, est professeur de biochimie à l'Université Joseph Fourier de Grenoble.

- ISBN 2-86883-453-1
- broché, illustré
- 1040 pages
- index des auteurs
- glossaire
- 48,78 €

Éditorial	1
De Eurochem 2002 à « chimie et société », par B. Sillion	1
Numéro spécial : La catalyse enzymatique	
Introduction	4
Introduction, par B. Badet	4
Nouvelles activités enzymatiques et leur modulation	5
Enzymes issues d'extrémophiles, par J. Dietrich et Y. Gueguen	5
Les peptide-synthétases, des enzymes modulaires multifonctionnelles, par S. Rebuffat , J. Péduzzi et G. Leclerc	9
Anticorps catalytiques : vrais outils ou leurres pour le chimiste ?, par R. Ricoux , H. Sauriat-Dorizon , E. Girgenti et J.-P. Mahy	13
Enzymes à façon : adaptation des propriétés de la phosphatase alcaline bactérienne au marquage enzymatique, par J.-C. Boulain , B.H. Muller et F. Ducancel	18
L'évolution moléculaire dirigée des enzymes, par D. Pompon	22
Découverte et optimisation de nouvelles enzymes pour la catalyse enzymatique industrielle, par F. Lefèvre , G. Ravot , H.K. Nguyen , D. Lagarde , L. Fourage , J.-M. Sonet et D. Dupret	27
Bioconversions	31
Chimie fine et biocatalyse : l'apport des biotransformations, par R. Azerad	31
Les enzymes pour la formation stéréospécifique de la liaison carbone-carbone, par L. Hecquet , C. Demuyneck et J. Bolte	37
La biocatalyse solide/gaz : vers une réalité industrielle, par S. Lamare , K. Roule-Woiry , I. Goubet , T. Maugard et M.D. Legoy	43
Biocatalyse industrielle, par C. Bensoussan	48
Enzymes et environnement	52
La biodégradation des polluants organiques. Métabolisme, estimation des risques, dépollution et biodétection, par J. Ouazzani	52
La microbiologie des produits pétroliers et ses applications, par J.-P. Vandecasteele , F. Monot et D. Ballerini	58
La phytoremédiation des sols contaminés, par J.-L. Morel	63
Informations générales	67
Livres et médias	72
Manifestations	76
Enseignement de l'électrochimie. Compte rendu des 19 ^e JIREC, La Baume-les-Aix, 15-17 mai 2002, par P. Knauth , Y. Massiani et F. Rouquérol	76
New trends in photopolymerization. Compte rendu du workshop EPF/GFP, Paris, 27-28 mai 2002, par F. Ganachaud	77
Calendrier	78
Activités de la SFC	80
Courrier des lecteurs	87

La proposition de consacrer un numéro spécial à la catalyse en biologie a été émise au début de l'année 2001 par la rédaction qui m'a proposé d'en assurer la coordination. J'ai tout de suite accepté, mais cet empressement a cédé la place à une certaine inquiétude en réalisant la difficulté à définir les contours d'un tel numéro.

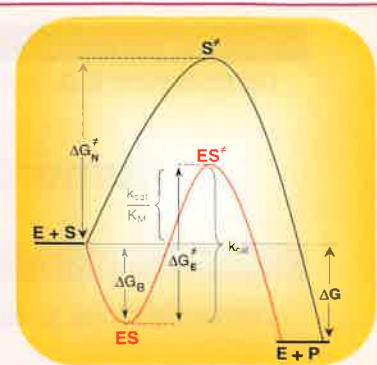
Après mûres réflexions et discussions avec plusieurs collègues impliqués dans différents aspects de la catalyse en biologie, nous avons choisi de centrer ce premier « cahier » sur la catalyse enzymatique au sens strict du terme, c'est-à-dire celle qu'effectuent les protéines. La réunion des contributions qui suivent sous la forme de trois chapitres, *Nouvelles activités enzymatiques et leur modulation*, *Bioconversions* et *Enzymes et environnement*, respectivement coordonnés par Jean-Pierre Mahy, Robert Azerad et Jamal Ouazzani, est sans doute un peu artificielle puisque, comme le lecteur pourra le constater, un thème donné peut fort bien se retrouver dans l'un ou l'autre de ces chapitres selon l'optique dans laquelle on l'expose et les applications recherchées. Il nous est cependant apparu qu'une telle présentation illustre bien les différentes facettes de la recherche actuelle dans ce domaine, en associant de nouvelles réactions aux applications que chacun d'entre nous peut en espérer dans la vie quotidienne.

Le numéro spécial « *Quoi de neuf en catalyse ?* » décrit très récemment l'éventail impressionnant des applications de la catalyse chimique (*L'Act. Chim.*, mai-juin 2002). L'objectif du présent cahier consacré à la catalyse enzymatique n'est pas d'opposer les performances décrites dans le précédent numéro à celles que réalisent les enzymes, ni de rejeter en bloc toute la chimie en la qualifiant de polluante, toxique et dangereuse. Il est d'abord d'informer nos collègues chimistes, peu familiers avec la biocatalyse, de la grande variété des réactions catalysées par ces macromolécules, des progrès réalisés dans la modulation de leurs activités et des applications actuelles ou potentielles. Que le lecteur ne se méprenne cependant pas ; il ne trouvera pas dans ce numéro spécial la liste exhaustive et détaillée des évolutions récentes de la catalyse enzymatique, mais plutôt un ensemble de contributions destinées à aiguïser sa curiosité.

Les millions d'années de l'évolution ont créé des milliers de micro-organismes contenant des enzymes capables de catalyser à peu près n'importe quelle réaction. La chimie mise en œuvre par la Nature s'est orientée vers le développement de procédés sélectifs et efficaces opérant dans des conditions généralement douces et respectueuses de l'environnement. Les scientifiques d'aujourd'hui ont la capacité d'identifier de nouveaux organismes et les nouvelles enzymes qu'ils peuvent renfermer, puis de remodeler ces biocatalyseurs, en accélérant les processus naturels d'évolution, pour en améliorer les performances dans une direction déterminée.

Instabilité et grande spécificité de substrat, tels sont les deux reproches adressés aux catalyseurs biologiques que sont les enzymes. La recherche de micro-organismes vivant en milieu extrême (température, acidité, pression, sels...) a déjà permis d'apporter un certain nombre de solutions au premier point. Quant à la spécificité de la réaction catalysée par la protéine, si elle reste contraignante du point de vue de la transformation chimique, elle pourra être modulée par l'utilisation de co-solvants, par le remodelage à façon de son

Rappelons qu'un catalyseur n'affecte pas la variation d'énergie libre de la réaction globale (ΔG), c'est-à-dire qu'il ne modifie pas la position de l'équilibre entre substrats et produits mais se contente d'accélérer l'atteinte de cet équilibre. **L'activité enzymatique** k_{cat} traduit la constante de vitesse de premier ordre pour la conversion du complexe de Michaelis ES en produit (reflétant ΔG_E^\ddagger), tandis que **l'efficacité enzymatique** k_{cat}/K_M représente la constante de deuxième ordre pour la conversion de E + S en produit (reflétant $\Delta G_E^\ddagger - \Delta G_B^\ddagger$). La vitesse de transformation d'un substrat S en produit P varie en raison inverse ($k.e^{-\Delta G^\ddagger/RT}$) de l'énergie libre d'activation de la réaction, ΔG_N^\ddagger pour une réaction non catalysée, ΔG_E^\ddagger pour une réaction catalysée par l'enzyme. Le rapport des vitesses d'une réaction catalysée et d'une réaction non catalysée, en d'autres termes l'accélération due à l'enzyme, sera donc d'autant plus grand que la différence des énergies libres ($\Delta G_N^\ddagger - \Delta G_E^\ddagger$) sera importante. *Pour une efficacité maximale, l'enzyme a donc tout intérêt à stabiliser l'état de transition. Ce rapport varie de 10^6 pour l'hydratation du gaz carbonique en bicarbonate à 10^{13} pour l'hydrolyse de la liaison peptidique pour atteindre 10^{17} dans l'hydrolyse de phosphodiester reflétant l'efficacité de la catalyse enzymatique !*



site actif ou par la création *ex nihilo* d'une activité catalytique en utilisant la machinerie conçue pour la reconnaissance des éléments du non soi que sont les anticorps. On réalise de plus que l'organisation modulaire des enzymes (séparation, spécificité et catalyse, enzyme multisubstrats) peut constituer un énorme avantage dans la versatilité des synthèses grâce à la création, avec l'aide du génie génétique, d'un **lego moléculaire**. Ces différents aspects sont illustrés par les six contributions du premier chapitre.

Les quatre contributions du second chapitre illustrent les applications des enzymes en biotechnologie. Qu'il s'agisse de chimie fine à l'échelle du laboratoire, du fonctionnement d'enzymes dans des conditions « hors normes », ou de production industrielle à l'échelle de centaines de tonnes, la transformation d'un substrat en produit par une enzyme isolée ou contenue dans un micro-organisme (notions regroupées sous le terme de bioconversion) constitue un outil de choix que l'industrie exploite depuis longtemps. Une démarche analogue est en cours dans l'utilisation des enzymes pour l'environnement comme en témoignent les contributions du troisième chapitre. La distinction entre les approches fondamentales de la catalyse enzymatique et ses approches appliquées est en passe de disparaître. L'utilisation des enzymes constitue en effet une puissante incitation pour la recherche de nouvelles réactions ou de nouveaux procédés permettant d'améliorer les catalyseurs existants, mais aussi pour la découverte, voire la création de nouvelles enzymes. Dans ce contexte, je ne peux qu'inciter mes jeunes collègues chimistes qui recherchent une voie scientifique innovante à utiliser leurs approches conceptuelles pour apporter leur contribution dans le domaine de la catalyse enzymatique.

Bernard Badet



Bernard Badet

est directeur de recherche CNRS à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles*.

* ICSN-CNRS UPR 2301, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette.

Tél. : 01 69 82 31 06. Fax : 01 69 07 72 47.

E-mail : Bernard.Badet@icsn.cnrs-gif.fr

Enzymes issues d'extrêmophiles

Jacques Dietrich et Yannick Gueguen

Summary

Enzymes from extremophiles

Since enzymes are extremely useful in a variety of industrial applications, there is considerable pressure to discover new microbial group with unique features which can be exploited in biotechnology. Ninety percent of the industrial enzymes are from microbial origin. Because only a small percentage of micro-organisms have been identified, they represent an incredibly diverse source of novel proteins. Recent developments clearly show that extremophiles are good candidates for the development of new enzymes products. Extreme environments in term of pH, temperature, salinity, pressure are often colonised by micro-organisms called extremophiles. Due to their properties, extremophiles are likely to provide important raw materials for development of future commercial enzyme products.

Mots-clés

Extrêmophiles, enzymes, archaea, biodiversité.

Key-words

Extremophiles, enzymes, archaea, biodiversity.

Les enzymes utilisées dans les procédés industriels sont pour 90 % d'entre elles issues de micro-organismes (champignons, levures, bactéries). Cependant, les études montrent qu'une toute petite fraction des micro-organismes vivant sur Terre (de 0,1 à 5 % selon les estimations) a été identifiée pour l'instant [1-2]. Le monde microbien représente une source extraordinaire de biodiversité et donc un potentiel immense d'activités catalytiques « nouvelles », encore très peu exploité. La biodiversité issue des environnements considérés par l'Homme comme extrêmes en termes de température, de pression, de pH et de salinité devient un sujet d'étude privilégié dans beaucoup de laboratoires de recherche publique et privée. En effet, la plupart des enzymes couramment utilisées en industrie le sont sous leur « forme naturelle » (purification de l'enzyme native ou clonage et expression de l'enzyme recombinante), alors que la plupart des enzymes en cours de développement dans les laboratoires ont subi des modifications au niveau moléculaire (mutagenèse dirigée, évolution moléculaire...) afin d'obtenir des enzymes plus performantes sous des conditions spécifiques liées à l'application industrielle [1]. Dans le développement de nouvelles enzymes, il est judicieux d'utiliser comme point de départ une enzyme qui présente les caractéristiques (T°C, pH, salinité...) les plus proches du biocatalyseur désiré ; il est donc particulièrement intéressant de développer de nouvelles enzymes destinées à travailler dans des conditions très agressives (solvants organiques, agents chaotropiques...) à partir de micro-organismes issus de milieux extrêmes.

On a donné le nom d'**extrêmophiles** à ces micro-organismes qui colonisent ces milieux d'apparence inhospitalière (figure 1). Sous ce terme, il convient de distinguer :

- les psychrophiles et thermophiles, qui croissent respectivement à des températures voisines de 0 °C (zone polaire) ou proches du point d'ébullition de l'eau (100 °C) au niveau des

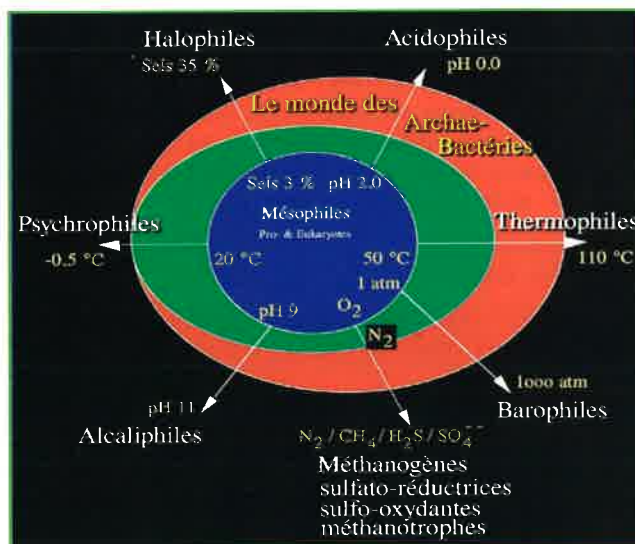


Figure 1 - Les micro-organismes de l'extrême [5].

Certains micro-organismes ont colonisé des biotopes où ils ont su s'adapter à des conditions de vie extrêmement dures. Pour s'adapter à ces conditions extrêmes, ces micro-organismes « extrêmophiles » produisent des enzymes capables de catalyser toutes les réactions nécessaires à leur métabolisme. Certaines enzymes sont ainsi capables d'activités catalytiques à des températures de plus de 100 °C (thermophiles). D'autres au contraire sont actives à des températures proches de la température de congélation (psychrophiles), ou sous de très fortes pressions de plus de 200 atm (barophiles), ou encore en présence de fortes concentrations salines (halophiles), à des valeurs de pH très élevés (alcaliphiles) ou très basses (acidophiles).

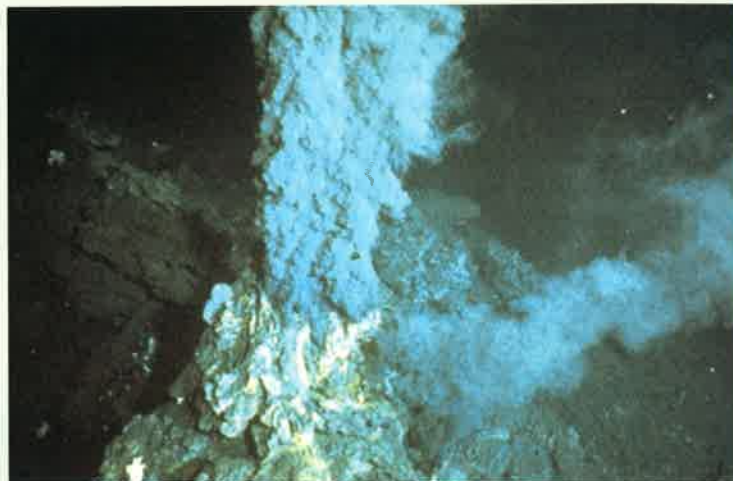
sites hydrothermaux d'origine océanique profond ou des geysers ;

- les barophiles, pouvant supporter des pressions allant jusqu'à 1 000 bars (source hydrothermale d'origine océanique profonde) ;

Les micro-organismes des sources hydrothermales profondes

Les sources hydrothermales profondes émettent des fluides à très haute température à partir de cheminées de sulfure. Elles sont appelées « fumeurs noirs » en raison de la couleur des précipités se formant lorsque le fluide hydrothermal à 350 °C, hautement réducteur, se mélange avec l'eau de mer ambiante, froide et oxygénée. Leurs caractéristiques physico-chimiques se distinguent de l'eau de mer environnante par le faible pH, de fortes concentrations en gaz dissous (H₂, CH₄, Co, CO₂, H₂) et en métaux (Si, Fe, Mn, etc.). Ces différents composés constituent des sources d'énergie utilisables par les bactéries chimiosynthétiques autotrophes, capable de transformer le dioxyde de carbone en carbone organique. Ces bactéries chimiolithotrophes ont une grande importance puisqu'elles assurent la production primaire des écosystèmes hydrothermaux sous-marins qui représentent de véritables « oasis » de vie animale. En effet, de riches communautés s'y développent, contrastant fortement avec l'apparence désertique du plancher océanique. On y trouve des micro-organismes vivant en symbiose dans des organismes (vestmentifères), ainsi qu'une grande diversité de bactéries vivant soit librement dans le mélange hydrothermal, soit fixées sur des supports comme les roches, les parois de cheminées... Les sources hydrothermales d'origine océanique profonde sont un exemple d'environnements extrêmes où l'on trouve une biodiversité microbienne tout à fait remarquable. La caractérisation de ces organismes et de leur machinerie cellulaire parfaitement adaptée pour fonctionner dans ces conditions de température (+2 à +100 °C), de pression (200 à 1 000 bars) font l'objet d'une recherche intensive. L'Institut Français de Recherche

© Ifremer



pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer) a organisé et participé depuis plus d'une dizaine d'années à plusieurs campagnes océanographiques afin d'étudier de tels sites géothermiques et de se constituer une collection de micro-organismes hydrothermaux. Parmi les molécules étudiées, les enzymes hyperthermostables provenant de ces micro-organismes extrêmes présentent un intérêt réel que ce soit dans les domaines du diagnostic (ADN polymérase, ADN ligase), de la chimie (alcool déshydrogénase, estérase...), de l'agroalimentaire (β-glucosidase, amylases...), ou de bien d'autres secteurs encore avec les protéases, les cellulases...

Enzymes issues d'extrémophiles et PCR

C'est à la fin des années 60 que le chercheur américain Thomas Brock démarra la révolution scientifique du monde des extrémophiles par la découverte dans les geysers du parc de Yellowstone (États-Unis) de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*, capable de se développer à 70 °C. La purification de l'ADN polymérase de *T. aquaticus* et la mise au point par Kary Mullis de la technique d'amplification de fragment d'ADN *in vitro* permettra à cette enzyme (*Taq* polymérase) issue d'un micro-organisme thermophile de devenir quelques années plus tard l'enzyme clé de la technique de PCR (« polymérase chain reaction », réaction de polymérisation en chaîne), technique universelle utilisée dans tous les laboratoires de biologie moléculaire, entraînant l'obtention du prix Nobel de chimie pour son inventeur (Kary Mullis) et des milliards de dollars de chiffre d'affaires. Depuis, d'autres ADN polymérases issues de micro-organismes hyperthermophiles (*Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus abyssi*, *Thermococcus fumicolans*...) ont été isolées et commercialisées.

La technique de PCR permet d'amplifier plus d'un milliard de fois l'ADN d'une région choisie d'un génome à condition de connaître au moins une partie de sa séquence nucléotidique. Pour cela, deux oligonucléotides (en vert), chacun complémentaire de l'une des chaînes de la double hélice d'ADN et situé sur les brins opposés de la région à amplifier sont synthétisés. Ces deux oligonucléotides servent d'amorces pour la synthèse de l'ADN qui est catalysée par l'ADN polymérase thermostable. Le principe de la réaction est illustré dans le schéma ci-dessous.

- A chaque cycle de la réaction qui comprend trois étapes, un bref traitement thermique (de quelques secondes à quelques minutes, entre 90 et 95 °C) permet de dénaturer les deux chaînes de la double hélice d'ADN (étape 1). Le succès de la technique dépend de l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable (issue d'un micro-organisme thermophile ou hyperthermophile) de telle sorte qu'elle ne soit pas dénaturée par les traitements thermiques répétés.

- La deuxième phase consiste en une étape d'hybridation (entre 30 et 60 °C) spécifique des amorces avec les séquences d'ADN complémentaires (étape 2).

- Enfin, en présence des quatre désoxyribonucléotides, l'ADN polymérase synthétise sélectivement (étape de polymérisation entre 72 et 75 °C) les régions de l'ADN en aval des amorces (étape 3).

A chaque cycle, les fragments nouvellement synthétisés servent à leur tour de matrice. Chaque cycle, d'environ cinq minutes, permet de doubler la quantité d'ADN synthétisé au cours du cycle précédent. A l'issue de la réaction, la population des molécules d'ADN est dominée par un seul fragment.

L'utilisation de la PCR permet d'amplifier rapidement des molécules d'ADN spécifiques sans avoir recours à une cellule vivante. Cette méthode, très sensible, permet de détecter une molécule unique d'ADN dans un échantillon et est aussi très utilisée pour le diagnostic des maladies génétiques et virales. En médecine légale, la technique de PCR permet l'identification certaine de l'origine humaine d'une cellule unique par son empreinte génétique.

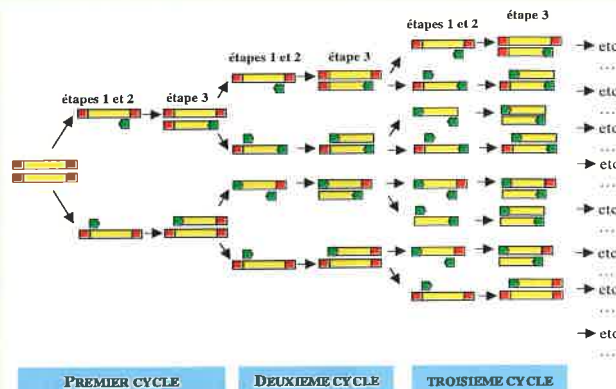


Schéma illustrant le principe de l'amplification par PCR

- étape 1 : dénaturation (séparation des brins d'ADN)
- étape 2 : hybridation avec les amorces
- étape 3 : synthèse du brin d'ADN complémentaire

ou domaines d'applications potentielles d'enzymes thermostables et les principales raisons de leur intérêt dans un procédé industriel.

L'intérêt économique lié à la recherche de nouvelles sources de micro-organismes et d'enzymes pouvant présenter des caractéristiques nouvelles est de plus en plus important. Le marché mondial des enzymes industrielles, qui représentait 400 millions d'euros en 1983, a été estimé à 1 milliard d'euros en 1995, pour atteindre vraisemblablement 2 milliards d'euros en 2005 [4]. Les enzymes d'origine mésophile (dites « classiques ») sont actuellement très largement utilisées dans de nombreux secteurs de l'industrie. L'industrie textile utilise des cellulases et des amylases. Celle des détergents utilise entre autres des protéases. Les industries alimentaires (industrie laitière, brasseries, jus de fruits, huiles, arômes, etc.) sont également des utilisateurs importants d'enzymes, de même que l'industrie de la pâte à papier, la pharmacie, la cosmétique et la chimie fine.

L'utilisation des enzymes pour la synthèse de composés chimiques présente de nombreux avantages par rapport aux techniques de synthèse chimique dont l'image « naturelle » par exemple. Leur spécificité chirale constitue un avantage considérable. En effet, malgré les progrès considérables de la synthèse organique, les stéréo-isomères utilisés dans la fabrication de certains produits chimiques sont plus facilement et plus économiquement produits par des enzymes que par synthèse totale. Le choix de la bioconversion doit tenir compte de nombreux paramètres techniques et économiques. L'utilisation industrielle d'enzymes pour la **synthèse** plutôt que pour leur rôle traditionnel consistant à **hydrolyser** des molécules de grande taille (polymères) en molécules plus simples devient de plus en plus importante. Et bien que certains procédés biocatalytiques aient trouvé leur application dans l'industrie, la majorité des travaux s'est effectuée jusqu'à présent à l'échelle du laboratoire. En effet, les conditions étroites de fonctionnement (solution aqueuse, pH neutre, température proche des températures physiologiques...) des enzymes « classiques » utilisées pour leur activité, limitent leur exploitation en chimie organique. Cependant, grâce au développement des extrêmenzymes qui permettra la mise à disposition d'enzymes résistantes à des conditions variées

et en particulier à des quantités importantes de solvant, l'utilisation de la biocatalyse pour la synthèse de molécules d'intérêt économique va devenir dans un très proche avenir un secteur en pleine expansion. Ainsi, en associant à l'immense réservoir d'activité enzymatique contenu dans la biodiversité naturelle et non encore exploré les techniques d'ingénierie protéique (mutagenèse dirigée, évolution moléculaire...), il est actuellement possible d'obtenir (modifier ou créer) en laboratoire des catalyseurs enzymatiques dont les propriétés répondent plus précisément aux besoins d'un procédé industriel.

Références

- [1] Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., Goodman R., *Curr. Biol.*, **1998**, 5, p. 245.
- [2] Carter J.M., *Commercial Opportunities in Enzyme Technology*, DM&D Reports, États-Unis, **1999**.
- [3] Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1990**, 87, p. 4576.
- [4] Frost, Sullivan, *European Industrial Enzyme Market*, **1996**.
- [5] Grosjean H., Les micro-organismes de l'extrême, *Regard sur la biochimie*, **1996**, 4, p. 78.



J. Dietrich

Jacques Dietrich

est chercheur au Laboratoire Ifremer-CNRS, Station méditerranéenne de l'environnement littoral*.

Yannick Gueguen

est chercheur au Laboratoire Ifremer-CNRS, Défense et résistance chez les invertébrés marins (DRIM)**.



Y. Gueguen

* Laboratoire Ifremer-CNRS, Station méditerranéenne de l'environnement littoral, 1 quai de la Daurade, 34200 Sète.

Tél. : 04 67 46 33 75. Fax : 04 67 46 33 99.
E-mail : Jacques.Dietrich@ifremer.fr

** Laboratoire Ifremer-CNRS, UMR 5098, DRIM, 2 place E. Bataillon, CP 80, 34095 Montpellier Cedex 5.

Tél. : 04 67 14 47 07. Fax : 04 67 14 46 22.
E-mail : ygueguen@ifremer.fr



Le Centre de Conférences Edouard VII, situé en plein cœur de Paris, est le lieu idéal pour vos séminaires, vos conférences et réunions.

Avec ses infrastructures modernes, ses équipements technologiques de dernière génération, son service haut de gamme et son cadre prestigieux, le Centre de Conférences Edouard VII est un outil de premier choix pour valoriser votre activité auprès de tous vos partenaires.

Centre de Conférences Edouard VII

23 Square Edouard VII
75009 PARIS

www.servcorp.fr
Conférence@servcorp.fr
Contact : Mme Françoise LESUISSE

Tel. : 01 53 43 91 00
Fax : 01 53 43 91 91


SERVCORP

Les peptide-synthétases

Des enzymes modulaires multifonctionnelles

Sylvie Rebuffat, Jean Péduzzi et Grégory Leclerc

Summary

Peptide synthetases, multifunctional modular enzymes

Many peptides of bacterial and fungal origin are synthesized non-ribosomally on large multifunctional proteins termed peptide synthetases. These enzymes contain repetitive units (modules), in which several catalytic domains perform specific reactions of peptide synthesis: amino acid monomers are activated by the adenylation domains and loaded onto the adjacent domains as thioesters, then the formation of peptide bonds and translocation of the growing chain are effected on the synthetase by the condensation domains. Significant progress has been made towards understanding the modular structure of these multifunctional enzymes, the catalytic mechanisms and the substrate specificity. The number and order of the modules within the synthetases determine the sequence of the peptide products. These advances enable the rational construction of hybrid genes encoding new functional peptide synthetases with specifically altered substrate specificity, allowing a new strategy for the design and development of novel drugs.

Mots-clés

Peptide-synthétase, biosynthèse peptidique non ribosomale, peptides bioactifs, enzymes modulaires multifonctionnelles.

Key-words

Peptide synthetase, non-ribosomal peptide biosynthesis, bioactive peptides, multifunctional modular enzymes.

La majorité des peptides bioactifs (antibiotiques, antiviraux, antitumoraux, immunosuppresseurs...) produits par des micro-organismes n'est pas biosynthétisée par la voie ribosomale, voie classique de biosynthèse des protéines. Ils résultent d'une voie enzymatique présentant une forte analogie avec la biosynthèse d'autres métabolites secondaires, comme les acides gras et les polyacétates. Le modèle initial proposé par Lipmann [1] a été progressivement affiné durant les dix dernières années [2]. Les réactions impliquées dans l'assemblage séquentiel des acides aminés sont réalisées par des enzymes modulaires multifonctionnelles nommées peptide-synthétases. Les peptides obtenus renferment fréquemment des acides aminés non-protéinogènes (acides aminés de la série D, α,α -dialkylés, N-méthylés...); les modifications mises en jeu peuvent être effectuées par ces enzymes.

études traitant de la biosynthèse du tripeptide δ -(L- α -aminoadipyl)-cystéinyl-D-valine (ACV) [5], précurseur des pénicillines et des céphalosporines.

Les peptides produits par les bactéries ne requièrent pas forcément une seule peptide-synthétase, tandis que ceux synthétisés par des champignons microscopiques résultent d'une seule enzyme. Chaque synthétase est formée d'une seule chaîne polypeptidique dont la taille varie de 51 kDa (actinomycine D-synthétase 1) à 1 689 kDa pour la cyclosporine A (CsaA)-synthétase [6, 8]. Actuellement, plusieurs opérons (unité d'expression et de régulation génétique comportant les gènes de structure et les éléments de contrôle) d'origine bactérienne et quelques gènes d'origine fongique codant pour des peptide-synthétases ont été clonés et séquencés (tableau I). Long de 45 kilobases,

Les peptide-synthétases : mécanisme de biosynthèse peptidique

Les données aujourd'hui disponibles sur ce mécanisme et les enzymes impliquées, pour lesquelles l'intérêt ne cesse de grandir, résultent principalement des travaux menés sur deux antibiotiques cycliques d'origine bactérienne, la gramicidine S (Grs) [3] et la tyrocidine A (Tyc) [4], et des

Tableau I - Sélection de peptides d'origine bactérienne et fongique biosynthétisés de façon non-ribosomale.

Peptide	Propriétés	Organisme	Opérons	Enzyme	Taille (kDa)
Gramicidine S [3]	antibactérien, tensio-actif chélatant de nucléotides	<i>Bacillus brevis</i>	grs	Grs 1	127
				Grs 2	509
Tyrocidine A [4]	antibactérien antibiotique local hémolytique	<i>Bacillus brevis</i>	tyc	Tyc 1	123
				Tyc 2	405
				Tyc 3	724
Actinomycine [6]	antibactérien antitumoral	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	acm	ACMS I	51
				ACMS II	284
				ACMS III	462
Surfactine A [7]	antimycobactérien tensio-actif chélatant de nucléotides	<i>Bacillus subtilis</i>	srf A	SrfA-A	402
				SrfA-B	401
				SrfA-C	144
ACV [5]	précurseur des β -lactamines (pénicillines, céphalosporines)	<i>Penicillium chrysogenum</i>	acv A	ACVS	421
Cyclosporine A [8]	immunosuppresseur	<i>Tolypocladium niveum</i>	css A	Csa A	1689

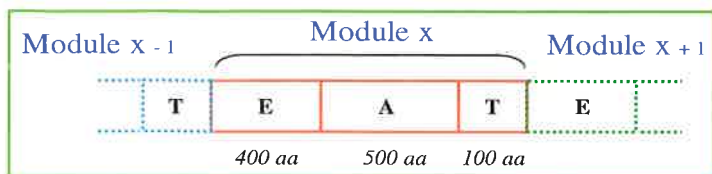


Figure 1 - Organisation des différents domaines catalytiques spécialisés dans l'adénylation du substrat (A), la formation de thioester (T) et l'élongation de la chaîne peptidique (E).

le gène *cssA* codant pour la *CssA*-synthétase qui comporte plus de 15 000 acides aminés est l'un des plus grands gènes connus.

Arrangement modulaire des peptide-synthétases

L'analyse de la structure primaire des peptide-synthétases a montré que ces enzymes sont composées de modules de 1 000 à 1 400 acides aminés (figure 1). Chaque module catalyse l'activation et la condensation d'un des acides aminés du peptide à produire, et dans certains cas la modification de ce résidu. L'identité et l'ordre dans lesquels se trouvent les modules déterminent la séquence du peptide qui est synthétisé de l'extrémité *N*- vers l'extrémité *C*-terminale.

Chaque module est subdivisé en plusieurs domaines fonctionnels [2, 9] : un domaine d'élongation (E) situé en début de module, responsable de la formation des liaisons peptidiques, un domaine d'adénylation (A) et un domaine de thioestérification (T) (figure 1). La peptide-synthétase peut présenter un domaine thioestérase localisé à l'extrémité *C*-terminale du dernier module, responsable de la terminaison de la chaîne peptidique. On trouve également des domaines de racémisation, de *N*-méthylation, et plus rarement des domaines à activité réductase ou de cyclisation responsables de la formation d'hétérocycles [9-10].

Réactions chimiques catalysées par les peptide-synthétases

Adénylation

Le domaine A est une région importante qui gouverne à la fois la reconnaissance de l'ATP et d'un acide aminé, conduisant à l'activation de ce dernier en aminoacyladénylate (figure 2). Il est analogue au domaine catalytique rencontré chez les enzymes formant des adénylates telles que les luciférases et les acyl-CoA-synthétases [3]. Le mécanisme d'activation consiste en une attaque nucléophile du

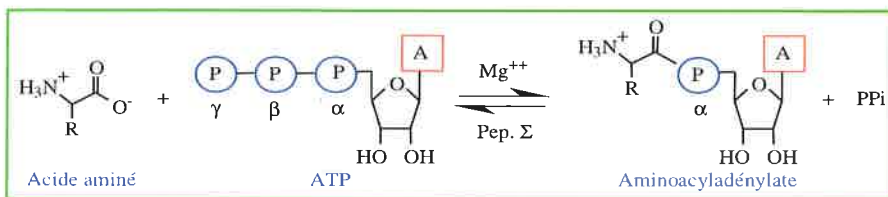


Figure 2 - Mécanisme d'adénylation du substrat impliquant la peptide-synthétase (Pep. Σ), l'ATP, un acide aminé, et conduisant à la formation d'un aminoacyladénylate et à la libération de PPI (phosphate inorganique).

groupe carboxyle de l'acide aminé sur le phosphate α de l'ATP conduisant à la libération de pyrophosphate et à la formation d'un aminoacyladénylate très réactif [4].

Thioestérification

Le second domaine fonctionnel est le domaine de thioestérification. Il est également désigné sous le nom de protéine-transporteur de groupement peptidyle (PTP), par analogie avec la protéine-transporteur de groupement acyle (PTA) rencontrée chez les synthétases d'acides gras. Comme pour les PTA, le domaine PTP est le site de fixation du cofacteur 4'-phosphopantéthéine (4'-PP). Après la phase d'adénylation, l'acidoacyladénylate est transféré sur le groupement cystéamine terminal du cofacteur 4'-PP, formant un thioester lié à l'enzyme via la libération d'AMP (figure 3) [11].

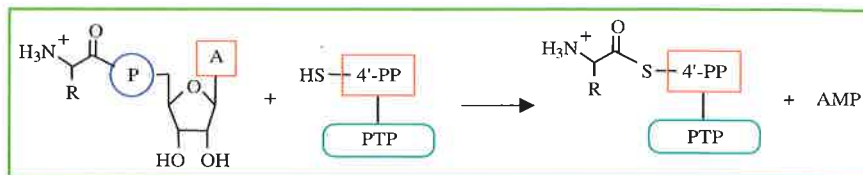


Figure 3 - Mécanisme de thioestérification impliquant l'acidoacyladénylate et le groupement cystéamine (SH) du cofacteur 4'-phosphopantéthéine (4'-PP) fixé sur la protéine-transporteur de groupement peptidyle (PTP).

Élongation

Contrairement aux domaines A et T, peu de données concernent le domaine E. Les informations sur les séquences de peptide-synthétases montrent que ce domaine est situé en amont du domaine A [9]. La comparaison des séquences a permis d'identifier un motif conservé nommé HIS [12]. Ce motif contient un résidu histidine qui déprotonerait le groupement NH_2 de l'acide aminé à incorporer, facilitant l'attaque nucléophile sur le carbonyle activé du peptide en cours d'élongation lié au cofacteur 4'-PP (figure 4).

Terminaison : domaine thioestérase

La terminaison de la synthèse peptidique consiste à rompre la liaison thioester qui lie le peptide à l'enzyme. Elle peut se réaliser de plusieurs façons : par hydrolyse du thioester (production d'un peptide linéaire), par cyclisation avec le groupement NH_2 d'une chaîne latérale (peptide ramifié) ou de l'acide aminé *N*-terminal (peptide cyclique), par lactonisation avec un groupement OH terminal ou de chaîne latérale (formation d'une lactone ou d'une lactone ramifiée).

Le mécanisme de terminaison reste encore mal connu. Une région d'environ 250 acides aminés située en partie *C*-terminale, en aval du dernier module d'activation, possède des homologies avec les thioestérases [3]. Il est dès lors tentant d'assimiler le rôle de cette région, appelée domaine thioestérase, au clivage du peptide mature en raison de sa localisation. Ce mécanisme explique la production de peptides linéaires. Selon une autre hypothèse [9], le domaine thioestérase pourrait avoir la fonction d'acyltransférase, ces deux familles d'enzymes partageant le même centre catalytique. Les cyclisations ou les ramifications seraient alors le résultat d'un

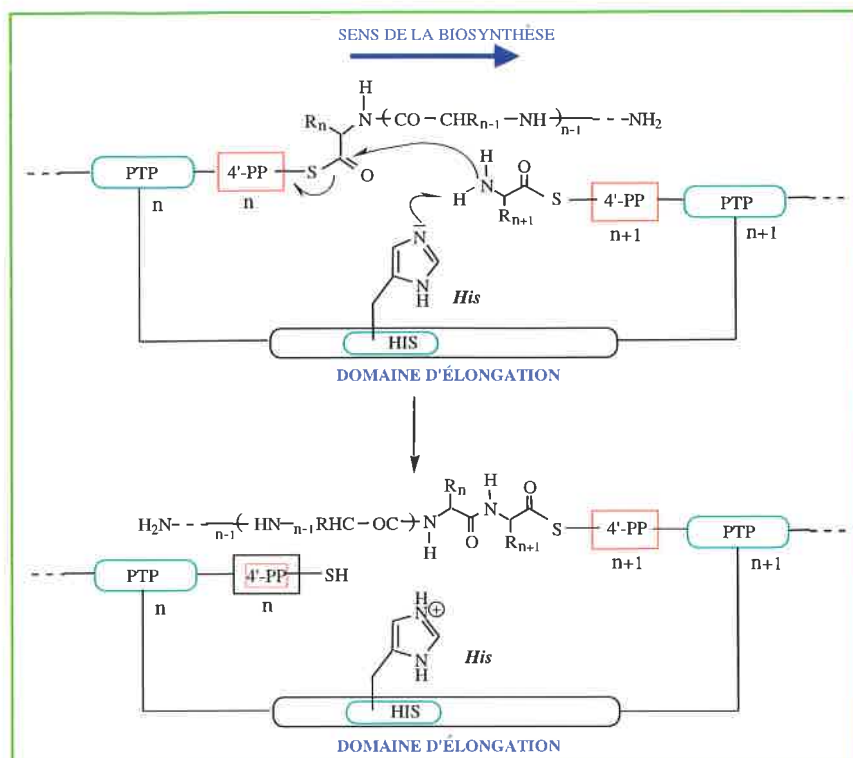


Figure 4 - Mécanisme proposé pour l'élongation de la chaîne peptidique impliquant une histidine du motif HIS inclus dans le domaine d'élongation, qui catalyse une attaque nucléophile de l'amine du résidu n+1 sur le carbonyle activé du résidu n [12]. PTP : protéine-transporteur de groupement peptidyle, 4'-PP : 4'-phosphopantéthéine.

transfert intramolécule d'un groupement acyle de la chaîne peptidique linéaire.

Purification et caractérisation de peptide-synthétases

La purification de peptide-synthétases d'origine bactérienne paraît, de façon générale, poser moins de problèmes techniques que celle des enzymes d'origine fongique. Ceci peut s'expliquer par les différences de caractéristiques cellulaires entre bactéries et moisissures, et par des masses moléculaires souvent plus élevées pour les enzymes d'origine fongique (tableau I). Entre 1987 et 1997, plusieurs peptide-synthétases provenant de bactéries ont été purifiées à homogénéité comme celles de *Bacillus brevis* produisant la gramicidine S et la tyrocidine A [3-4], celle de *Streptomyces chrysomallus* synthétisant l'actinomycine D [6] ou encore la pristinamycine-synthétase de *Streptomyces pristinaesoralis* [13]. Pendant cette même période, seules les ACV- et CsaA-synthétases d'origine fongique ont été purifiées respectivement à partir de *Penicillium chrysogenum* et *Tolypocladium inflatum* [5, 8]. Dans ce même domaine, notre groupe a récemment purifié, à partir du champignon filamenteux *Trichoderma longibrachiatum*, la peptide-synthétase responsable de la biosynthèse des longibrachines, peptaïbols de 20 résidus [14]. Ces peptides antibiotiques linéaires renferment une forte proportion de résidus acide α -amino-isobutyrique (Aib). Cette enzyme monomérique est caractérisée par un point isoélectrique de 5,5 et une masse moléculaire de 1920 kDa déterminée par ultracentrifugation analytique [15]. Elle constitue ainsi la peptide-synthétase de plus haute masse moléculaire isolée et caractérisée jusqu'à présent.

Intérêt biotechnologique des peptide-synthétases

L'organisation des peptide-synthétases en régions fonctionnelles séparées suggère la possibilité de modifier génétiquement l'ordre et le type de modules de façon à construire de nouvelles enzymes capables de produire des peptides originaux contenant éventuellement des acides aminés non-protéinogènes [9]. Cette approche représente une méthode de synthèse peptidique *in vivo*, ouvrant une voie vers la conception de nouveaux peptides bioactifs.

Dans cette perspective, les domaines A de différentes synthétases ont été échangés pour générer des enzymes hybrides capables de produire de nouveaux peptides. Ainsi, le remplacement du dernier domaine A de la surfactine-synthétase par un domaine A de la Grs-synthétase ou de l'ACV-synthétase a été réalisé [7]. Les peptides produits par la synthétase modifiée génétiquement portent en position C-terminale l'acide aminé reconnu par le nouveau domaine introduit dans le gène.

L'exploitation de la région thioestérase responsable de la libération du peptide synthétisé par l'enzyme a été également envisagée [16]. La surfactine-synthétase a ainsi été modifiée génétiquement en déplaçant la région thioestérase terminale à la

fin d'un domaine interne d'activation, de façon à générer des peptides tronqués de séquences prédéterminées. Ces résultats montrent la possibilité d'obtenir ainsi des peptides de tailles et caractéristiques différentes.

Par ailleurs, les fortes similarités entre peptide-synthétases et polycétide-synthases, tant au niveau de leur structure modulaire que de leur fonctionnement, ont suscité l'idée de combiner des modules appartenant à ces deux types d'enzymes multifonctionnelles [17]. Cette approche de biosynthèse combinatoire s'avère prometteuse pour produire de nouveaux composés hybrides peptide/polycétide.

Conclusion

Malgré les progrès rapides et croissants concernant les caractéristiques structurales et l'agencement modulaire des peptide-synthétases, de très nombreuses questions persistent encore dans ce domaine. En particulier, les données structurales sur les enzymes d'origine fongique sont presque inexistantes, la purification de ces synthétases s'avérant très délicate. Cependant, les développements de la biosynthèse combinatoire, utilisant soit des modules appartenant à différentes peptide-synthétases, soit des modules de peptide-synthétase et de polycétide-synthase, s'avèrent prometteurs pour la conception de nouvelles molécules.

Enfin, un dernier intérêt de ces peptide-synthétases concerne la place qu'elles occupent au cours de l'évolution des micro-organismes. En effet, la majorité des peptides bioactifs résulte, à de rares exceptions près, de la voie polyenzymatique non ribosomale. La question se pose dès lors de savoir quel bénéfice peuvent retirer les

micro-organismes d'une telle voie de biosynthèse, grande consommatrice d'énergie et peu spécifique. Cependant, la discrimination entre plusieurs acides aminés structuralement proches et donc la spécificité du système ribosomal ne tiennent pas tant à la sélectivité de l'aminocyl-ARNt-synthétase qu'à la présence d'un certain nombre de mécanismes de sauvegarde empêchant ou réparant les erreurs de traduction. Si l'on prend en compte tous ces mécanismes, il apparaît alors que le coût énergétique pour la cellule est sensiblement équivalent pour les deux voies de biosynthèse [18]. Quant à la faible spécificité attribuée à ces systèmes enzymatiques, des travaux récents [19] tendent à montrer que des règles orienteraient la reconnaissance, par le domaine d'adénylation, des acides aminés substrats.

Références

- [1] Lipmann F., *Science*, **1971**, 173, p. 875.
 [2] Von Döhren H., Keller U., Vater J., Zocher R., *Chem. Rev.*, **1997**, 97, p. 2675.
 [3] Turgay K., Krause M., Marahiel M.A., *Mol. Microbiol.*, **1992**, 6, p. 529.
 [4] Dieckmann R., Pavela-Vrancic M., Pfeifer E., Von Döhren H., Kleinkauf H., *Eur. J. Biochem.*, **1997**, 247, p. 1074.
 [5] Byford M.F., Baldwin J.E., Shiau C.Y., Schofield C.J., *Chem. Rev.*, **1997**, 97, p. 2631.
 [6] Pfennig F., Schauwecker F., Keller U., *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, p. 12508.
 [7] Stachelhaus T., Schneider A., Marahiel M.A., *Science*, **1995**, 269, p. 69.
 [8] Weber G., Schörgendorfer K., Schneider-Scherzer E., Leitner E., *Curr. Genet.*, **1994**, 26, p. 120.
 [9] Marahiel M.A., Stachelhaus T., Mootz H.D., *Chem. Rev.*, **1997**, 97, p. 2651.
 [10] Konz D., Marahiel M.A., *Chem. Biol.*, **1999**, 6, p. R39.
 [11] Stein T., Vater J., Kruff V., Otto A., Wittmann-Liebold B., Franke P., Panico M., Mc Dowell R., Morris H.R., *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, p. 15428.
 [12] De Crécy-Lagard V., Marlière P., Saurin W., *C.R. Acad. Sci. Paris/Life Sci.*, **1995**, 318, p. 927.
 [13] Thibaut D., Bisch D., Ratet N., Maton L., Couder M., Debussche L., Blanche F., *J. Bacteriol.*, **1997**, 179, p. 697.
 [14] Leclerc G., Rebuffat S., Péduzzi J., Goulard C., Barthélémy M., Bodo B., *Peptides 1998, Proceedings 25th European Peptide Symposium*, S. Bajusz, F. Hudecz, éd., Akademiai Kiado Budapest (Hongrie), **1999**, p. 142.
 [15] Leclerc G., Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), **2000**.
 [16] De Ferra F., Rodriguez F., Tortora O., Tosi C., Grandi G., *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, p. 25304.
 [17] Du L., Shen B., *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **2001**, 4, p. 215.
 [18] Trauger J.W., Walsh C.T., *Proc. Natl. Acad. Sci., États-Unis*, **2000**, 97, p. 3112.
 [19] Von Döhren H., Dieckmann R., Pavela-Vrancic M., *Chem. Biol.*, **1999**, 6, p. R273.



S. Rebuffat

Sylvie Rebuffat

est professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle*.

Jean Péduzzi

est chargé de recherche CNRS*.

Grégory Leclerc

est chercheur à l'Institut de Recherche Servier**.



G. Leclerc



J. Péduzzi

* Laboratoire de chimie des substances naturelles, ESA 8041 CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, 63 rue Buffon, 75005 Paris.

Tél. : 01 40 79 31 18. Fax : 01 40 79 31 35.

E-mails : rebuffat@mnhn.fr ; peduzzi@mnhn.fr

** Institut de Recherche Servier, 125 chemin de Ronde, 78290 Croissy-sur-Seine.

Tél. : 01 55 72 28 18.

E-mail : gregory.leclerc@fr.netgrs.com

Anticorps catalytiques

Vrais outils ou leurres pour le chimiste ?

Rémy Ricoux, Hélène Sauriat-Dorizon, Élodie Girgenti et Jean-Pierre Mahy

Summary

Catalytic antibodies: real tools or lures for the chemist?

In the last 15 years, a new kind of biocatalysts named abzymes, based on monoclonal antibodies, have emerged and are able to catalyze a wide range of chemical reactions. A first generation of abzymes constructed from antibodies elicited against transition state analogs, have shown relatively modest efficiency which has led to investigate other strategies to produce abzymes such as bait and switch strategy, reactive immunization, association of antibodies with cofactors or production of anti-idiotypic antibodies. The mechanisms of action of most of the abzymes have now been elucidated thanks to the analysis by X-ray diffraction studies of their 3-D structure. Finally, abzymes appear as interesting synthetic tools for the chemists, especially for the catalysis of some stereoselective steps involved in the total synthesis of molecules of biological relevance.

Mots-clés

Biocatalyseurs, anticorps catalytiques, abzymes, analogues d'état de transition.

Key-words

Biocatalysts, catalytic antibodies, abzymes, transition state analogs.

Dans sa quête de nouvelles réactions permettant d'atteindre des molécules cibles plus ou moins complexes présentant un intérêt industriel en chimie fine ou pharmacologique, le chimiste est sans cesse à la recherche de nouveaux catalyseurs capables de réaliser un certain nombre de réactions clés, de manière la plus efficace et la plus sélective possible, dans des conditions douces de pression et de température. Ceci requiert de la part de l'entité choisie non seulement des propriétés catalytiques, mais également des propriétés de reconnaissance moléculaire pointues. Ces propriétés sont l'apanage des enzymes qui catalysent en milieu biologique un large éventail de réactions et assurent la transformation spécifique de leur substrat qui vient se positionner de manière extrêmement précise au site actif, grâce à un réseau d'interactions multiples avec les chaînes latérales des acides aminés qui les composent : liaisons hydrogène, de Van der Waals, interactions électrostatiques, hydrophobes. Conscient de ce fait, et ce depuis une bonne dizaine d'années, le chimiste n'hésite plus à utiliser des enzymes comme catalyseurs dans des réactions de synthèse organique (bioconversions) et de nombreux travaux sont maintenant tournés vers la recherche de nouvelles activités dans des milieux extrêmes (extrêmophiles), ou vers la modulation ou la création de nouvelles activités par évolution dirigée à l'aide d'approches génétiques ou génomiques. Autant de thèmes qui seront développés par ailleurs dans les autres chapitres de ce numéro spécial.

En outre, à défaut d'utiliser les enzymes elles-mêmes, les chercheurs tentent d'élaborer des systèmes capables de reproduire au mieux leurs propriétés. Ainsi, des systèmes originaux, élaborés à partir d'anticorps, ont vu le jour ces quinze dernières années : les anticorps catalytiques ou abzymes (ab : antibody ; zyme : enzyme). Un bon nombre de revues ont déjà été dédiées à ces nouveaux biocatalyseurs [1-8] et le présent article ne prétend donc pas en être une de plus mais plutôt un article à l'adresse des chimistes

décrivant le concept des anticorps catalytiques, les diverses évolutions technologiques envisagées pour aller vers les meilleures performances possibles et ce que peuvent en espérer les chimistes.

Le concept des anticorps catalytiques ou abzymes

Les anticorps ou immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines d'environ 150 KDa sécrétées par des cellules du système immunitaire, les lymphocytes B matures, en réponse à une agression de l'organisme par un agent extérieur ou antigène : parasite, bactérie, virus, protéine... Ils fixent ces antigènes et forment des complexes immuns antigène-anticorps grâce à la reconnaissance spécifique d'une partie de l'antigène, ou épitope, par la partie variable N-terminale de l'anticorps ou paratope. Le processus de reconnaissance d'un antigène par un anticorps présente une forte analogie avec le phénomène de reconnaissance d'un substrat par une enzyme et s'effectue grâce au même type de réseau d'interactions multiples : interactions électrostatiques, hydrophobes, liaisons hydrogène, de Van der Waals, intervenant entre l'antigène et les chaînes latérales des acides aminés qui composent le site de liaison de l'anticorps. Cette analogie faisait donc des anticorps des outils de choix pour l'élaboration de nouveaux biocatalyseurs, à la condition de savoir résoudre ce problème clé : comment transformer un anticorps, capable de fixer une molécule dans son état le plus stable, l'antigène (ou haptène dans le cas de petites molécules), en un abzyme capable non seulement de fixer un haptène mais également de catalyser la transformation sélective du substrat correspondant ? La réponse à cette question est venue en trois temps. En effet, dès 1947, Linus Pauling énonça le principe de la catalyse enzymatique [9] dans lequel il suggérait que les enzymes accélèrent la vitesse des réactions en liant l'état de transition préférentiellement au

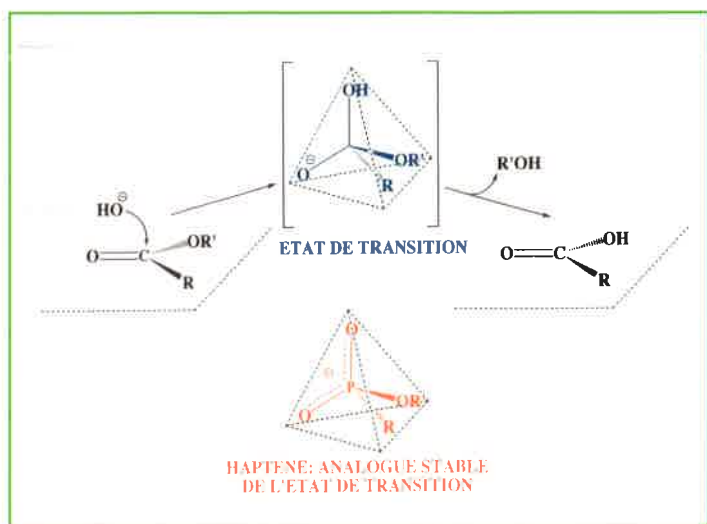


Figure 1 - Saponification d'un ester : conception d'un analogue stable de l'état de transition.

substrat dans son état fondamental, diminuant ainsi l'énergie d'activation de la réaction. S'inspirant de ce principe, Jenks suggéra alors en 1969 qu'en générant des anticorps dirigés contre un analogue stable de l'état de transition de la réaction qu'on souhaite catalyser, on pourrait obtenir des anticorps doués d'activité [10]. Il fallut encore attendre 17 ans pour que cette hypothèse soit démontrée indépendamment par deux groupes californiens, celui de Lerner [11] et de Schultz [12], qui obtinrent pour la première fois des anticorps capables d'accélérer l'hydrolyse des esters. Ils montrèrent ainsi que des anticorps dirigés contre des phosphonates, analogues stables de l'état de transition tétraédrique formé lors de l'hydrolyse des esters (figure 1), pouvaient catalyser cette réaction. Les cinétiques observées étaient de type michaëlien ; cependant, les facteurs d'accélération $k_{\text{cat}}/k_{\text{noncat}}$ restaient inférieurs à 10^3 .

Anticorps contre des analogues d'état de transition

La stratégie consistant à produire des anticorps contre des analogues d'état de transition a été de loin la plus employée dans les 15 années qui ont suivi ces premiers résultats et elle a permis l'obtention d'une première génération d'abzymes capables d'accélérer de nombreuses réactions [1-8]. Ces réactions peuvent être aussi bien monomoléculaires (réarrangement du chorismate en préphénate, réarrangement d'oxy-cope d'un hexadiène-1,5-disubstitué, ou isomérisation de stéroïdes) que bimoléculaires (hydrolyse d'esters, amides, carbonates). La plupart d'entre elles ont leur équivalent enzymatique et du point de vue du chimiste, notamment des adeptes des bioconversions, il est intéressant de noter que comme dans le cas des bioconversions où plus de 50 % des enzymes utilisées sont des estérases, une large majorité des abzymes obtenus à ce jour possèdent une activité hydrolytique. Cependant, il existe un certain nombre de réactions catalysées par les abzymes pour lesquelles une sélectivité différente de celle observée avec l'enzyme est obtenue, ou même, pour lesquelles il n'existe pas d'équivalent enzymatique. Un des exemples le plus frappant pour le

chimiste est sans conteste la réaction de Diels-Alder. En effet, alors qu'une seule enzyme capable de catalyser cette réaction a été découverte récemment, pas moins de quatre abzymes ont été décrits comme étant capables de réaliser cette réaction [1-7], le premier d'entre eux ayant été obtenu dès 1989 par l'équipe de Hilvert. A partir d'un haptène tricyclique, ils ont en effet produit un anticorps monoclonal 1E9 capable d'accélérer environ 100 fois la condensation du dioxyde de tétrachlorothiophène avec le N-éthylmaléimide pour conduire à un intermédiaire tricyclique qui se décompose en dioxyde de soufre et en dihydrophtalimide (figure 2A).

Globalement, cette première génération d'abzymes obtenus à partir d'analogues d'états de transition se comporte comme des enzymes, présente des cinétiques de saturation, une spécificité de substrat, une stéréosélectivité et des phénomènes d'inhibition compétitive. Cependant, les facteurs d'accélération $k_{\text{cat}}/k_{\text{noncat}}$ atteints restent faibles et varient entre 10^3 à 10^8 , ce qui est loin des valeurs des facteurs d'accélération des meilleures enzymes qui peuvent atteindre 10^{17} [6]. Dès lors, plusieurs stratégies associant la chimie, la biologie moléculaire, l'ingénierie des protéines et des techniques de criblage de plus en plus sophistiquées, ont été développées pour améliorer les performances des abzymes de première génération. Les paragraphes suivants ont pour but de présenter succinctement ces stratégies illustrées par un résultat particulièrement marquant pour chacune d'elles.

Stratégie du « bait and switch »

La stratégie du « bait and switch » a été développée pour la première fois par Shokat *et al.* en 1989 afin de générer au sein d'un anticorps des résidus de fonctionnalité voulue qui n'auraient pas forcément été induits par l'approche « analogue d'état de transition » [13]. Pour cela, il faut concevoir un haptène qui possède non seulement certaines caractéristiques structurales proches du substrat, de façon à assurer à ce dernier une reconnaissance suffisante par l'anticorps, mais également des fonctions portant une charge permanente susceptible d'induire dans l'anticorps une fonction de signe opposé ayant un rôle catalytique. Ainsi, l'utilisation d'un haptène portant un ammonium tertiaire a-t-elle permis d'induire dans le site d'anticorps un résidu glutamate dont la fonction carboxylate joue le rôle de base capable d'arracher un proton en α d'une cétone permettant l'élimination de HF [13] (figure 2B). Cette stratégie a permis un peu plus tard au groupe de Hilvert [1-8], grâce à l'élaboration d'un haptène portant une fonction amidinium, de générer des anticorps capables d'accélérer très efficacement la réaction d'ouverture d'un cycle benzisoxazole ($k_{\text{cat}}/k_{\text{noncat}} = 3.10^8$) (figure 2C). Cette même réaction a été catalysée par l'anticorps 4B2, généré contre un amidinium cyclique et, dans ce cas, une structure tridimensionnelle du complexe 4B2-haptène établie par diffraction des rayons X a montré la présence dans le site de l'anticorps 4B2 d'un glutamate face à la fonction amidinium [2] validant ainsi l'utilisation de la stratégie du « bait and switch ».

Immunsation réactive

Le terme d'immunsation réactive désigne la stratégie dans laquelle le haptène utilisé vient réagir avec un résidu du site actif de l'anticorps et engager une liaison covalente avec lui.

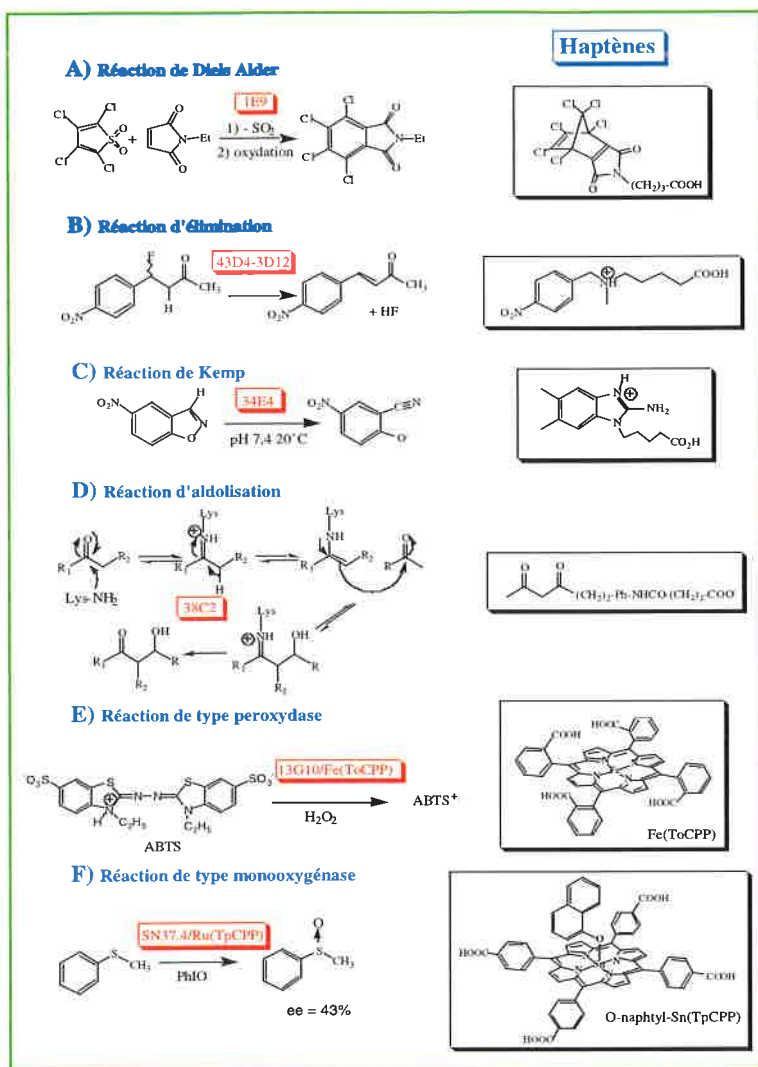


Figure 2 - Différentes réactions catalysées par des anticorps catalytiques et haptènes utilisés pour les générer [1-8].

L'avantage majeur de cette stratégie réside dans le fait que, de cette manière, ne sont sélectionnés naturellement que les clones qui sécrètent les anticorps possédant dans leur site de reconnaissance ce résidu correctement placé et capable de réagir avec l'haptène. Cette stratégie a en particulier été utilisée par l'équipe de Richard Lerner [14] pour obtenir des abzymes à activité aldolase. Ainsi, utilisant un haptène dicétonique, ils ont pu sélectionner les anticorps possédant une lysine suffisamment accessible dans leur site de liaison pour pouvoir former, après réaction avec l'haptène, un β -imino-cétone cyclique directement détectable en spectroscopie UV-visible ($\lambda_{\max} = 316 \text{ nm}$) (figure 2D). Les anticorps ainsi sélectionnés peuvent, comme les aldolases, former un iminium donneur qui pourra ensuite se condenser avec un aldéhyde accepteur. Deux des anticorps sélectionnés, 38C2 et 33F12, sont capables de catalyser aussi efficacement ($k_{\text{cat}}/k_{\text{noncat}} = 5.10^6$) que les aldolases naturelles des réactions d'aldolisation et de rétroaldolisation, mais sont capables d'accepter une gamme beaucoup plus large de substrats. Ces deux propriétés, ajoutées aux propriétés d'énantiosélectivité de ces abzymes, ont conduit à leur utilisation à l'échelle préparative en laboratoire et l'un des 2 abzymes (38C2) est le premier anticorps à avoir été commercialisé (Fluka-Aldrich).

Anticorps utilisant des cofacteurs

L'adjonction de cofacteurs à des anticorps est un moyen sûr pour leur conférer une activité catalytique dans la mesure où ce cofacteur est dépositaire de l'activité. En effet pour de nombreuses enzymes, l'interaction avec des cofacteurs tels que thiamines, flavines, phosphate de pyridoxal ou encore ions ou complexes métalliques est absolument essentielle pour la catalyse. Il s'agit donc là de construire un nouveau biocatalyseur à deux partenaires : le cofacteur responsable de l'acte catalytique et l'anticorps qui fixe le cofacteur, le substrat, et qui peut éventuellement participer à la catalyse grâce à l'un de ses amino-acides.

Suivant cette stratégie, des anticorps ont été associés à des cofacteurs inorganiques, cyanoborohydrure (réductions sélectives) et periodate de sodium (oxydations sélectives) ou organiques, flavines, phosphate de pyridoxal [1-8]. Cependant, la cible de choix reste sans conteste la réalisation de systèmes modèles d'hémoprotéines telles que monooxygénases à cytochromes P450 et peroxydases, en associant anticorps et hème naturel ou synthétique, de manière à produire de nouveaux biocatalyseurs d'oxydations sélectives. A ce jour, 5 anticorps ont montré en présence de leur cofacteur Fe(III)-porphyrine une activité peroxydase intéressante et nous avons, pour notre part, généré 2 anticorps dirigés contre une $\alpha, \alpha, \alpha, \beta$ -tétra-*ortho*carboxyphénylporphyrine de fer(III) qui, en présence de ce cofacteur, présente une activité peroxydase caractérisée par une constante $k_{\text{cat}} = 560 \text{ min}^{-1}$ (figure 2E) supérieure à celle de la peroxydase de raifort elle-même [15]. La constante K_M pour le substrat H_2O_2 (10 mM), bien supérieure à celle observée dans le cas de l'enzyme (5 μM), rend cet anticorps beaucoup moins efficace que l'enzyme.

Finalement, le résultat le plus probant dans le domaine des anticorps à cofacteur hémique a été obtenu récemment par l'équipe de E. Keinan [16]. Utilisant comme haptène une tétraarylporphyrine d'étain portant un ligand axial α -naphthoxy pour mimer l'état de transition probable de la réaction d'oxydation des sulfures aromatiques par les cytochromes P450, ils ont obtenu un anticorps capable, en présence de porphyrine de ruthénium, de catalyser l'oxydation énantiosélective du thioanisole avec 43 % d'excès énantiomérique (figure 2F).

Anticorps anti-idiotypes

L'idiotype est constitué par l'ensemble des parties variables de l'anticorps, c'est-à-dire celles qui sont impliquées dans la reconnaissance de l'antigène. La stratégie des anti-idiotypes s'inspire du postulat émis par Niels Jerne [17] selon lequel pour chaque anticorps Ab1 généré contre un antigène Ag, il existe un anticorps complémentaire Ab2 dirigé contre l'idiotype du premier anticorps. Par conséquent, certains des anticorps anti-idiotypes Ab2 possèdent dans leur site de reconnaissance une partie mimant la structure de l'antigène, ils constituent ainsi une image interne de cet antigène. Il s'agit donc de générer dans un premier temps des anticorps Ab1 dirigés contre le site actif d'une enzyme déterminée (figure 3). A ce stade, le choix du meilleur anticorps Ab1 le plus complémentaire possible du site actif de l'enzyme est primordial, un des moyens les plus sûrs étant de choisir l'Ab1 qui est le meilleur inhibiteur compétitif de l'enzyme. Dans un deuxième temps, les anticorps Ab2 dirigés contre l'idiotype

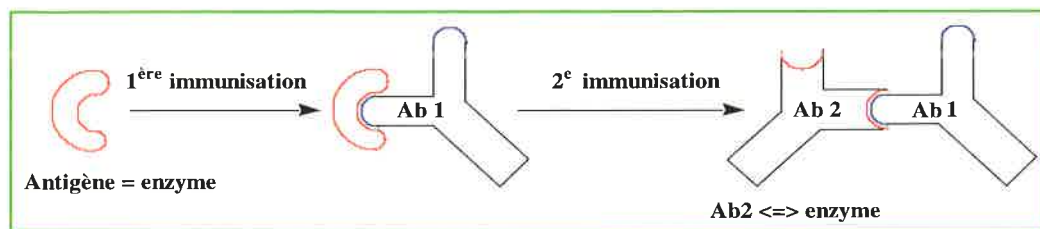


Figure 3 - Obtention d'abzymes par la méthode des anticorps anti-idiotypes.

d'Ab1 sont produits et parmi eux, ceux possédant en leur site de fixation une image interne du site actif de l'enzyme antigène sont potentiellement dotés d'une activité catalytique (figure 3).

L'exemple le plus marquant illustrant cette stratégie est venu de l'équipe de A. Friboulet et D. Thomas [18] qui ont produit des anticorps anti-idiotypes contre un anticorps monoclonal AE2 inhibiteur compétitif de l'acétylcholine estérase. L'un des anticorps sélectionnés (9A8) catalyse l'hydrolyse de l'acétylthiocholine avec un facteur d'accélération de $4,2 \cdot 10^8$. Ce paramètre remarquable, qui est seulement inférieur de 2 ordres de grandeur à celui de l'enzyme, fait de l'abzyme 9A8 l'abzyme le plus performant connu à l'heure actuelle.

Études structurales : les leurres démystifiés

Un bon nombre de structures tridimensionnelles ont été résolues ces dernières années [1-3]. Ceci a permis d'élucider les mécanismes suivant lesquels les anticorps catalytiques fonctionnent. Ainsi, les anticorps catalysent bien les réactions où il faut contraindre une molécule à adopter une conformation particulière et réactive, grâce à des

interactions privilégiées avec les acides aminés du site de liaison. Par exemple, les abzymes à activité ferrochélatase (7G12) contraignent la mésoporphyrine IX à adopter une conformation distordue propice à l'insertion d'un ion Cu^{2+} au centre du macrocycle [1-3] grâce à une interaction avec la méthionine H100c qui contraint

un des noyaux pyrroles à sortir du plan de la porphyrine (figure 4A). Les anticorps peuvent également agir comme des pièges à entropie en stabilisant une conformation particulière d'un substrat propice à la formation de l'état de transition. C'est le cas des anticorps 1F7 catalysant la transformation du chorismate en préphénate [3] qui stabilisent, grâce à plusieurs liaisons hydrogène et à une liaison ionique entre une arginine (Arg H95) et un carboxylate du substrat, la conformation du chorismate qui donnera naissance à l'état de transition en forme de chaise de cette réaction (figure 4B). La catalyse de réactions bimoléculaires telles que la réaction de Diels-Alder peut également être réalisée efficacement et spécifiquement par des abzymes tels que 1E9 [1-3]. L'anticorps joue alors le rôle de « template » et maintient les deux partenaires, diène et diénophile, dans une position favorable à la formation de l'état de transition de conformation bateau de cette réaction (figure 4C).

D'autre part, conformément à ce qui était initialement recherché, certains anticorps peuvent stabiliser l'état de transition d'une réaction donnée. C'est le cas des anticorps catalysant l'hydrolyse des esters tels que CNJ206 [2-3] qui stabilisent, par un réseau de liaisons hydrogène impliquant le N-H de l'histidine H35 et les fonctions amides de la chaîne

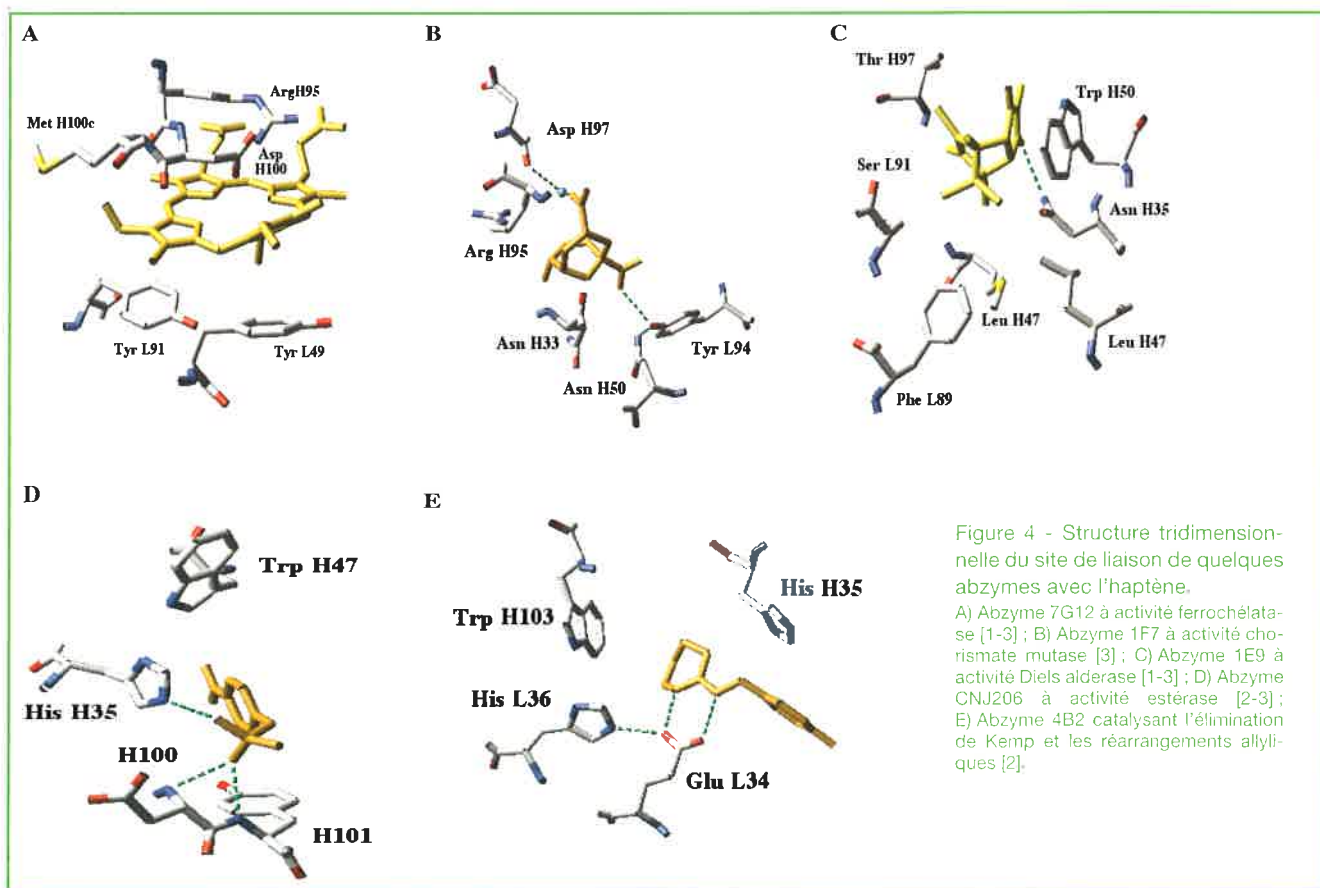


Figure 4 - Structure tridimensionnelle du site de liaison de quelques abzymes avec l'haptène.

A) Abzyme 7G12 à activité ferrochélatase [1-3] ; B) Abzyme 1F7 à activité chorismate mutase [3] ; C) Abzyme 1E9 à activité Diels alderase [1-3] ; D) Abzyme CNJ206 à activité estérase [2-3] ; E) Abzyme 4B2 catalysant l'élimination de Kemp et les réarrangements allyliques [2].

principale, la charge négative développée sur l'intermédiaire tétraédrique de la réaction et forment, comme dans les estérases ou les peptidases, un vrai « trou à oxy-anion » (figure 4D). Enfin, l'analyse des structures tridimensionnelles connues à ce jour a révélé qu'aucun abzyme ne possédait plus d'un résidu catalytique dans son site actif. L'obtention d'un tel résidu peut cependant être réalisée efficacement grâce à la stratégie du « bait and switch ». Ainsi, l'utilisation d'un haptène portant une fonction amidinium a permis de générer dans le site de l'anticorps 4B2 un glutamate (figure 4E) [2].

Que peut espérer le chimiste des anticorps ?

Il serait exagéré de considérer les abzymes comme des leurres pour chimistes. Il faut simplement leur demander de faire ce qu'ils peuvent faire, et donc pas de rivaliser avec les enzymes qui, pour des réactions comparables, présentent des constantes de vitesse et des facteurs d'accélération bien supérieurs. Le réel espoir pour le chimiste demeure plutôt dans la catalyse de réactions pour lesquelles il n'existe pas ou peu d'enzymes équivalentes (nous avons déjà mentionné le cas de la réaction de Diels-Alder) ou dans l'induction de sélectivités originales pour certaines réactions d'intérêt synthétique, comme le démontrent deux exemples frappants parus récemment dans la littérature : l'utilisation d'un anticorps (14D9) pour catalyser la coupure énantiosélective d'un éther d'énol dans une étape clé de la synthèse totale de la phéromone (-)- α -multistriatine (14D9) ou la production par des réactions de résolution cinétique catalysées par l'abzyme 38C2 de (+)-syn- β -hydroxycétones intermédiaires dans la synthèse d'anticancéreux épothilone A et C [1]. A l'opposé, le manque de sélectivité de substrat de l'anticorps 38C2 lui confère un avantage par rapport aux aldolases dans la mesure où il peut catalyser une gamme beaucoup plus large de réactions de condensation aldolique [1]. Finalement, des applications thérapeutiques peuvent également être envisagées pour les abzymes. Ainsi, des résultats récents ont montré que 38C2 était capable d'activer « *in vivo* » par rétro-aldolisation/rétro-Michael une prodrogue

de l'anticancéreux étoposide, pour délivrer spécifiquement cette drogue dans des cellules tumorales de souris atteintes de neuroblastome [1].

Même si les stratégies utilisées jusqu'à maintenant n'ont pas permis d'obtenir des abzymes capables de rivaliser avec les enzymes, les études mécanistiques et structurales ont fourni un faisceau d'informations intéressantes sur la catalyse enzymatique et sur son évolution, informations plus difficiles à obtenir à partir d'enzymes naturelles optimisées par des techniques d'évolution dirigée. De telles techniques devraient maintenant être de plus en plus employées pour améliorer les performances des abzymes de première génération et en explorer les limites et le chimiste devra donc vraisemblablement s'en remettre au biochimiste pour qu'il lui fournisse des outils plus performants. Cependant, la créativité du chimiste pourra encore être mise à profit pour la conception d'haptènes plus élaborés, comme en témoigne l'apparition récente du premier anticorps produit contre un haptène zwitterionique afin de générer deux résidus catalytiques dans le site actif.

Références

- [1] Stevenson J.D., Thomas N.R., *Nat. Prod. Rep.*, **2000**, *17*, p. 535.
- [2] Golinelli-Pimpaneau B., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2000**, *10*, p. 697.
- [3] Hilvert D., *Annu. Rev. Biochem.*, **2000**, *69*, p. 751.
- [4] Reymond J.-L., *Top. Curr. Chem.*, **1999**, *200*, p. 59.
- [5] Smithrud D.B., Benkovic S.J., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1997**, *8*, p. 459.
- [6] Thomas N.R., *Nat. Prod. Rep.*, **1996**, *13*, p. 479.
- [7] Kirby A.J., *Acta Chem. Scand.*, **1996**, *50*, p. 203.
- [8] Schultz P.G., Lerner R.A., *Science*, **1995**, *269*, p. 1835.
- [9] Pauling L., *Am. Sci.*, **1948**, *36*, p. 51.
- [10] Jencks W.P., *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York, **1969**, p. 288.
- [11] Tramontano A., Janda K.D., Lerner R.A., *Proc. Natl. Acad. Sci., États-Unis*, **1986**, *83*, p. 6736.
- [12] Pollack S.J., Jacobs J.W., Schultz P.G., *Science*, **1986**, *234*, p. 1570.
- [13] Shokat K.M., Leumann C.J., Sugasawara R., Schultz P.G., *Nature*, **1989**, *338*, p. 269.
- [14] Barbas C.F., Heine A., Zhong G., Hoffmann T., Gramatikova S., Bjornestedt R., List B., Anderson J., Stura E.A., Wilson I.A., Lerner R.A., *Science*, **1997**, *278*, p. 2085.
- [15] De Lauzon S., Desfosses B., Mansuy D., Mahy J.-P., *FEBS Lett.*, **1999**, *443*, p. 229.
- [16] Nimri S., Keinan E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, p. 8978.
- [17] Jerne N.K., *Ann. Immunol.*, **1974**, *125C*, p. 373.
- [18] Izadar L., Friboulet A., Remy M.H., Roseto A., Thomas D., *Proc. Natl. Acad. Sci., États-Unis*, **1993**, *90*, p. 8876.



R. Ricoux

Rémy Ricoux est ingénieur d'études CNRS, **Hélène Sauriat-Dorizon** est ATER, **Élodie Girgenti** est doctorante et **Jean-Pierre Mahy** est professeur au Laboratoire Chimie bioorganique et bioinorganique de l'université de Paris-Sud*.



E. Girgenti



H. Sauriat-Dorizon

* Laboratoire de Chimie bioorganique et bioinorganique, FRE 2127 CNRS, Institut de Chimie Moléculaire d'Orsay, Université de Paris-Sud XI, 91405 Orsay Cedex.
Tél. : 01 69 15 74 21.
Fax : 01 69 15 72 81.
E-mail : jpmahy@icmo.u-psud.fr



J.-P. Mahy

Enzymes à façon

Adaptation des propriétés de la phosphatase alcaline bactérienne au marquage enzymatique

Jean-Claude Boulain, Bruno H. Muller et Frédéric Ducancel

Summary

Fashioned enzymes: adjustment of properties of bacterial alkaline phosphatase to the enzymatic labelling

Enzymatic tracers can be easily designed by genetic fusion between a gene encoding a protein or a protein domain and the gene of the *E. coli* alkaline phosphatase. With the aim to enhance the sensitivity of the tests developed using such conjugates, we describe a strategy to improve the bacterial alkaline phosphatase efficacy. In a first step we generated an inactive form of the enzyme and in a second step we looked for revertants. Finally, the introduction of only two mutations provided an enzyme with a catalytic activity increased 40-fold relative to that of the wild-type enzyme while maintaining high thermostability. A large panel of « lab tests » can be quickly designed using the modified enzyme and the gene fusion approach, with a similar sensitivity to which obtained with conventional tracers.

Mots-clés

Phosphatase alcaline, mutagenèse, évolution dirigée.

Key-words

Alkaline phosphatase, mutagenesis, directed evolution.

La biodiversité naturelle offre un choix extraordinairement varié de protéines. L'accès à cette vaste bibliothèque s'est considérablement étendu récemment, grâce à l'amplification de fragments d'ADN issus des nombreux organismes non cultivables en laboratoire, au séquençage de nouveaux génomes ou encore à l'isolement de gènes issus d'organismes extrêmophiles. En matière de catalyse enzymatique, de nouvelles enzymes plus stables ou fonctionnant dans des conditions extrêmes de pH, de salinité ou de température, en un mot mieux adaptées à des applications biotechnologiques ou industrielles, ont ainsi été découvertes.

Cette richesse naturelle a cependant ses limites. Une enzyme naturelle est une protéine hautement spécialisée qui remplit un rôle précis au sein d'un réseau biochimique complexe et régulé dans une cellule vivante. En ce sens, certaines de ses propriétés ne sont pas appropriées pour des applications biotechnologiques et constituent des freins à son utilisation par l'Homme. Il en va ainsi de la vitesse de catalyse ou de la spécificité de substrat, ou encore de la quantité produite par un organisme qui peut être limitée par le produit de la réaction. Par ailleurs, aucune enzyme n'est adaptée pour fonctionner dans des milieux organiques.

La mise en œuvre des techniques d'évolution dirigée appliquées aux enzymes a déjà abouti à la modification de diverses propriétés : augmentation de la thermostabilité, modification de la spécificité de substrat, résistance aux solvants organiques ou à des conditions physico-chimiques extrêmes. Paradoxalement, il est plus difficile d'améliorer les propriétés naturelles des enzymes, particulièrement leur efficacité vis-à-vis de leurs substrats habituels. Cette difficulté reflète probablement le manque de méthodes de criblage adaptées à ce type de sélection. Le passage par une enzyme dépourvue de propriétés catalytiques constitue un moyen de résoudre ce problème.

L'évolution moléculaire dirigée des protéines constitue une approche récente et en constant développement, qui permet de s'affranchir de ces limites en générant artificiellement une nouvelle diversité, source de propriétés inédites identifiées à l'aide de cribles spécifiques [1]. Cette approche est décrite dans l'article qui suit (D. Pompon).

L'exemple développé ici concerne la création d'une enzyme stable et possédant une vitesse de catalyse élevée à partir de la phosphatase alcaline bactérienne d'*Escherichia coli*, l'objectif étant la fabrication de traceurs enzymatiques performants. Un traceur enzymatique est constitué d'une molécule d'intérêt couplée de façon covalente à une enzyme dont l'activité catalytique sur un substrat de synthèse conduit à un produit chromogène, fluorescent ou luminescent aisément détectable. Ce type de construction, permettant le suivi de la molécule initiale, est largement utilisé dans le domaine de l'analyse biologique et plus précisément des dosages immuno-enzymatiques. Dans ces dosages, un anticorps couplé à l'enzyme se fixe spécifiquement sur la substance recherchée.

Le couplage entre les partenaires s'effectue par voie chimique à l'aide de réactifs bifonctionnels. Lorsque la molécule d'intérêt est une protéine, il est également possible de créer de tels traceurs en fusionnant un gène codant pour une protéine ou un domaine protéique au gène de la phosphatase alcaline d'*E. coli* [2-3]. La bactérie synthétise alors le traceur enzymatique et l'exporte vers son périplasme¹ où il est aisément récupéré (figure 1). Cette technologie, simple à mettre en œuvre, peut être appliquée dans n'importe quel laboratoire pour réaliser des dosages à façon, mais également pour d'autres utilisations telles que l'étude d'interactions protéine-protéine ou la détection de différents composés. Nous avons cherché à accroître la vitesse de catalyse de l'enzyme bactérienne afin

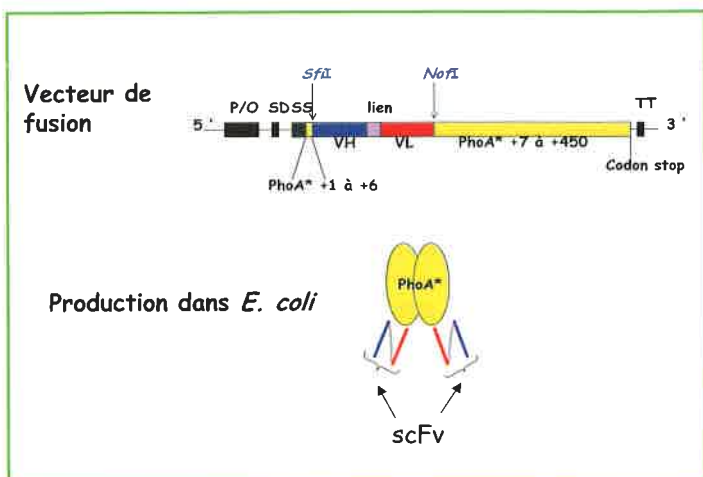


Figure 1 - Système de fusion génétique pour la préparation d'un conjugué immunoenzymatique, ici un fragment d'anticorps recombinant scFv.

P/O : promoteur/opérateur ; SD : Shine-Dalgarno ; SS : séquence signal ; VH, VL : domaine variable de chaînes lourde et légère ; TT : terminateur de transcription. La molécule produite dans le périplasma bactérien à partir de l'expression du gène de fusion est représentée en bas de la figure. Deux fragments scFv sont associés à un dimère de phosphatase alcaline.

d'augmenter la sensibilité et la rapidité des tests réalisés avec ces traceurs recombinants.

La phosphatase alcaline d'*E. coli* est une phospho-monoestérase à large spécificité, le groupement associé au phosphate n'intervenant pas dans la liaison du substrat à l'enzyme. Elle est constituée de deux sous-unités comportant chacune 450 résidus et deux ponts disulfure. Sous sa forme dimérique active, elle est localisée dans le périplasma bactérien. Chaque monomère contient un site actif au sein duquel on trouve deux atomes de zinc et un atome de magnésium (figure 2). Son mécanisme réactionnel comprend deux attaques nucléophiles (figure 3). La première est celle de la sérine 102 sur le substrat phosphaté qui a pour conséquences la libération d'un alcool et la formation d'un complexe covalent enzyme-phosphate. Elle est suivie par l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur le complexe phospho-séryl avec formation d'un complexe non-covalent enzyme-phosphate stabilisé par un réseau dense de liaisons hydrogène [4]. Dans les conditions optimales de

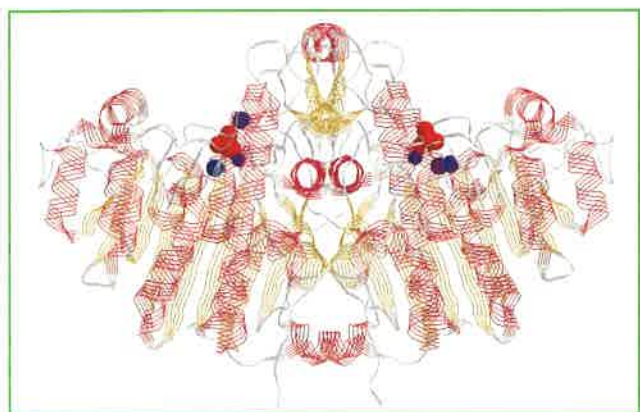


Figure 2 - Structure tridimensionnelle de la phosphatase alcaline d'*E. coli*.

L'extrémité N-terminale de chaque monomère, lieu de la fusion avec une autre protéine, apparaît en bas de la figure. Les deux atomes de zinc et l'atome de magnésium présents dans le site catalytique sont représentés en bleu. Le phosphate est en orange.

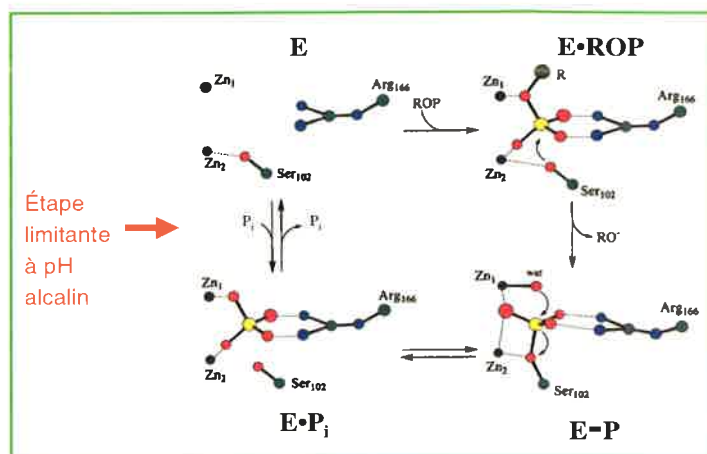


Figure 3 - Schéma du mécanisme catalytique de la phosphatase alcaline. Le groupement phosphate du substrat à hydrolyser est symbolisé par les sphères jaunes (phosphore) et rouges (oxygène).

fonctionnement, c'est la dissociation de ce complexe qui constitue l'étape limitante de la réaction et qui est responsable de la faible vitesse de catalyse de l'enzyme ($k_{cat} = 65 \text{ s}^{-1}$). Sa déstabilisation est donc une condition nécessaire à l'augmentation de la vitesse d'hydrolyse du substrat.

Les progrès réalisés dans le domaine de la modélisation moléculaire ne permettent pas, encore aujourd'hui, de prévoir l'ensemble des conséquences résultant de l'introduction d'une ou plusieurs mutations dans une séquence protéique. Ces conséquences potentielles sont nombreuses : niveau d'expression du gène dans l'organisme hôte, effet sur le repliement ou la stabilité de la protéine, influence sur les différentes étapes de la réaction enzymatique, etc. Une approche rationnelle était par conséquent difficilement envisageable pour augmenter la vitesse de catalyse de la phosphatase alcaline d'*E. coli*. La stratégie que nous avons développée comprend une succession d'étapes de mutagenèse dirigée et de mutagenèse aléatoire.

Dans une **première étape**, une enzyme chimère a été construite en introduisant dans la phosphatase alcaline bactérienne quatre résidus présents à des positions correspondantes dans la phosphatase alcaline d'intestin bovin. Ces résidus sont situés dans ou à proximité du site catalytique et constituent les principales différences de séquence entre les deux types d'enzyme dans cette région. Cette simple transposition fournit une enzyme chimère normalement produite par la bactérie mais dépourvue d'activité catalytique.

Dans une **seconde étape**, des mutations provoquant la réversion de cette inactivation ont été recherchées. Pour cela, le gène spécifiant l'enzyme chimère a été soumis à une mutagenèse aléatoire par une réaction d'amplification génique (PCR) conçue de manière à introduire des erreurs dans la séquence du gène [5]. En bref, le principe de cette méthode consiste à effectuer plusieurs cycles d'amplification de l'ADN (cf encadré *Enzymes issus d'extrémophiles et PCR* dans l'article de Y. Gueguen et J. Dietrich).

Chaque cycle comporte plusieurs étapes : i) dénaturation thermique de l'ADN afin de séparer les deux brins ; ii) hybridation d'amorces sur chacun des brins ; iii) extension *in vitro* à l'aide d'une ADN polymérase thermostable dans

des conditions où l'enzyme va introduire des erreurs de façon aléatoire dans la copie qu'il effectue. Les clones bactériens contenant les différents gènes modifiés ont été mis en culture en présence d'un substrat chromogène de l'enzyme. Ceux ayant recouvré une activité enzymatique phosphatase alcaline hydrolysent le substrat et apparaissent bleus. Parmi les nombreux clones obtenus, l'un d'eux exprimait une enzyme active. La mutation responsable de cet effet, identifiée par séquençage du gène, correspond à l'apparition d'un résidu asparagine en position 330 de l'enzyme, située en dehors du site catalytique, à 12 Å du phosphate. Dans un troisième temps, cette mutation a été transférée dans l'enzyme de type sauvage où elle remplace un acide aspartique. La vitesse de catalyse s'en trouve augmentée d'un facteur 3.

Un tel effet positif d'une mutation de réversion réintroduite dans un contexte sauvage a déjà été suggéré dans des études réalisées sur le répresseur du phage Lambda² [6]. L'hypothèse avancée pour expliquer ce phénomène était que la mutation provoquant la réversion peut soit simplement corriger l'altération provoquée par la première mutation, soit compenser cette altération en augmentant la fonction de la protéine par un autre moyen. Dans ce dernier cas, on s'attend effectivement à ce que la mutation responsable de la réversion ait un effet positif sur l'activité de la protéine naturelle. Cette stratégie, consistant à générer un mutant inactif puis à rechercher des mutations provoquant la réversion, pourrait constituer une approche générale dans le cadre de l'amélioration des propriétés catalytiques des enzymes.

Enfin, dans une **dernière étape**, la substitution D330N a été associée à une autre mutation préalablement identifiée au niveau du résidu 153. A cette position, un résidu aspartique avait été substitué par un résidu glycine, provoquant une augmentation modérée de la vitesse catalytique [7]. Cette combinaison D153G/D330N a donné naissance à une enzyme dont la vitesse de catalyse est augmentée 40 fois et atteint un niveau comparable à l'enzyme d'origine bovine (*tableau I*). Elle présente également une stabilité thermique proche de l'enzyme initiale et des propriétés de conservation exceptionnelles [8]. Afin de comprendre les modifications intervenues au niveau du site catalytique et associées à de tels changements de propriétés, des études structurales, réalisées par diffraction aux rayons X, ont été entreprises. Elles révèlent que, dans le mutant sélectionné, le réseau de liaisons hydrogène maintenant le phosphate dans le site catalytique a été fortement réduit en comparaison avec la

situation observée dans l'enzyme initiale. Ce phénomène est probablement responsable de l'importante accélération de la vitesse de libération du phosphate à partir du complexe non covalent enzyme-phosphate, et par conséquent de l'augmentation de la vitesse de catalyse.

L'enzyme ainsi modifiée a été fusionnée avec les fragments scFv (« single chain fragment variable », fragment variable simple chaîne) d'anticorps anti-oestradiol selon le schéma présenté *figure 1*. La protéine recombinante obtenue a été utilisée pour identifier les résidus de l'anticorps participant à l'interaction avec son antigène. Pour cela, différentes mutations ont été introduites dans la séquence codante du fragment scFv d'anticorps. L'influence de chacune des mutations sur la liaison anticorps-antigène a été évaluée en mesurant l'intensité du signal associé au complexe formé entre les deux partenaires. La grande vitesse de catalyse de l'enzyme permet un marquage direct de l'anticorps étudié et de ses variants, sans qu'il soit nécessaire d'utiliser un second anticorps de révélation [9].

Dans une seconde construction, l'enzyme modifiée a été fusionnée avec un fragment scFv dérivé d'un anticorps reconnaissant l'acétylaminofluorène (AAF). Cet haptène est couplé avec un oligonucléotide pour préparer des sondes ADN ou ARN capables de s'hybrider à des fragments de gènes d'ARN ribosomiaux. Cette sonde est alors utilisée pour mettre au point un test de typage de souches bactériennes s'appuyant sur la détection de gènes conservés dans toutes les espèces bactériennes étudiées à ce jour et dont le principe est le suivant : l'ADN génomique de différentes souches bactériennes est enzymatiquement digéré et les fragments résultants sont soumis à une électrophorèse puis transférés sur des membranes de nitrocellulose. Les fragments s'hybridant à la sonde sont alors révélés avec le scFv fusionné à l'enzyme et reconnaissant l'AAF. Les profils obtenus sont spécifiques de chaque espèce bactérienne. Ce test présente la même sensibilité et la même spécificité que celui réalisé avec un conjugué classique préparé par voie chimique et utilisant l'enzyme bovine [3].

Cette évolution artificielle de la phosphatase alcaline bactérienne montre que deux substitutions introduites dans la séquence de la phosphatase bactérienne suffisent à lui conférer un ensemble de propriétés (k_{cat} , K_M , mais aussi pH optimum et activation par le magnésium) similaires à celles de l'enzyme intestinale bovine, pourtant différente par plus de 70 % de sa séquence. Ces observations sont à rapprocher de l'analyse réalisée par F.H. Arnold [10] qui oppose la grande dérive génétique des séquences naturelles au faible nombre de mutations qu'il est nécessaire d'introduire pour conférer à une enzyme tout ou partie des propriétés d'une autre enzyme de la même famille. Par exemple, la conversion d'une subtilisine psychrophile³ (active à basse température) en enzyme thermophile est obtenue en substituant un très petit nombre d'acides aminés, alors que les séquences naturelles présentant ces propriétés respectives sont très éloignées. Ainsi, la flexibilité fonctionnelle des protéines en général, et des enzymes en particulier, apparaît plus importante que ne le laissait penser la simple observation des séquences naturelles. Cette flexibilité fonctionnelle ne se limite d'ailleurs pas à la modulation de propriétés existantes, mais peut également conduire à la création d'enzymes qui fonctionnent dans des milieux organiques ou qui transforment des substances non naturelles. L'industrie chimique future pourrait se trouver considérablement transformée par ces nouvelles approches biotechnologiques.

Tableau I - Comparaison des principales propriétés de la phosphatase alcaline modifiée avec celles de l'enzyme naturelle bactérienne et de l'enzyme bovine intestinale.

[a] Les expériences ont été réalisées dans les conditions optimales d'activité pour chacune des enzymes :
 - 1 M Tris pH 8,0 et 25 °C pour l'enzyme bactérienne de type sauvage,
 - 1 M diéthanolamine pH 10,0 et 37 °C pour le double mutant,
 - Les paramètres cinétiques de la phosphatase alcaline bovine sont issus de Weissig *et al.*, *Biochem J.*, **1993**, 290, p. 503.

Enzyme	K_{cat} (s ⁻¹) [a]	K_m (μM) [a]	K_{cat}/K_m (x10 ⁶) (M ⁻¹ .s ⁻¹)
Type sauvage <i>E. coli</i>	65 +/- 1	23 +/- 1	2,80
D153G/D330N <i>E. coli</i>	3202 +/- 75	567 +/- 7	5,65
Intestinale bovine	3435 +/- 84	660 +/- 23	5,20

Notes

¹périplasme : compartiment cellulaire des bactéries à Gram négatif localisé entre la membrane interne et la membrane externe.

²répresseur du phage lambda : protéine qui inhibe la synthèse d'une particule de phage lambda.

³subtilisine psychrophile : enzyme isolée d'un organisme psychrophile (organisme dont la température optimale de croissance est d'environ 0 °C).

Remarque : mésophile environ 37 °C, thermophile > 60 °C, hyperthermophile > 80 °C.

Références

- [1] Arnold F.H., *Nature*, **2001**, *409*, p. 253.
- [2] Gillet D. *et al.*, *Protein Eng.*, **1992**, *5*, p. 273.
- [3] Muller B.H. *et al.*, *J. Immunol. Methods*, **1999**, *227*, p. 177.
- [4] Kim E.E., Wyckoff H.W., *J. Mol. Biol.*, **1991**, *218*, p. 449.
- [5] Cadwell R.C., Joyce G.F., *Methods Appl.*, **1994**, *3*, p. 136.
- [6] Hecht M.H., Sauer R.T., *J. Mol. Biol.*, **1985**, *186*, p. 53.
- [7] Dealwis C.G. *et al.*, *Protein Eng.*, **1995**, *8*, p. 865.
- [8] Muller B.H. *et al.*, *ChemBioChem*, **2001**, *2*, p. 517.
- [9] Bettsworth F. *et al.*, *J. Mol. Recognit.*, **2001**, *14*, p. 99.
- [10] Arnold F.H. *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, **2001**, *26*, p. 100.



J.-C. Boulain

Jean-Claude Boulain

est chef de Laboratoire au Département d'Ingénierie et d'Études des Protéines (DIEP) du CEA de Saclay*.



F. Ducancel

Bruno H. Muller

est cadre de recherche au sein de l'unité mixte CEA/BioMérieux.



B.H. Muller

Frédéric Ducancel

est responsable de l'unité mixte CEA/BioMérieux.

* DIEP, CEA Saclay, bâtiment 152, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex.

Tél. : 01 69 08 71 34. Fax : 01 69 08 90 71.

E-mail : jean-claude.boulain@cea.fr

Information aux annonceurs

Rejoignez notre **CLUB PARTENAIRES** dès **Janvier 2003**

Faites apparaître votre **LOGO**, vos **COORDONNÉES**
et vos **COMPÉTENCES**

pendant **6 mois** consécutifs pour **530 €**



Z.A. de Courtabœuf
17, avenue du Hoggar
BP 112
91944 LES ULIS Cedex A
Tél. : **01.69.18.75.75**
Fax : 01.69.86.07.65
www.edpsciences.org

Compétences : Éditeur scientifique international
(astronomie, chimie, électricité & électronique,
sciences de la vie, mathématiques, physique,
radioprotection)

Contact publicitaire : Céline HOARAU
hoarau@edpsciences.org

Pour toute adhésion
avant **novembre 2002**,
soyez en plus présent sur
le site **WEB** de la **SFC**
pendant un mois
www.sfc.fr

L'évolution moléculaire dirigée des enzymes

Denis Pompon

Summary

Directed molecular evolution of biocatalysts

Principles, industrial impacts and perspectives in directed molecular evolution of proteins are presented. After a description of basis principles driving cycles of directed evolutions, sources of natural sequence biodiversity are discussed. The next part describes major strategies used to generate artificial sequence diversity by mutagenesis and DNA shuffling, including family shuffling. A section describing principal expression and selection systems follows. Finally major current industrial application and market are discussed.

Mots-clés

Évolution, combinatoire, enzymes, recombinaison, mutations.

Key-words

Evolution, combinatorial, enzymes, recombination, mutants.

Disposer d'un catalyseur spécifique pour chaque étape d'un schéma de synthèse, pouvoir effectuer avec de très hauts rendements ces étapes de manière stéréo- et énanti-spécifiques sur des molécules complexes, fragiles et multifonctionnalisées, tel est certainement un des rêves du chimiste. Depuis des millions d'années, les enzymes ont été façonnées par l'évolution pour accomplir ces tâches hautement spécialisées sur les molécules biologiques. Mais, même si le chimiste s'intéresse souvent à ces molécules lorsqu'elles constituent par exemple le principe actif d'un médicament, nombre des problèmes auxquels il a à faire face concernent aussi des molécules artificielles n'ayant pas d'équivalent naturel et donc *a priori* pas d'enzyme dédiée à leur synthèse. Heureusement, même s'ils sont spécifiques, de nombreux biocatalyseurs tolèrent des variations structurales plus ou moins limitées de leur substrat, ce qui a conduit souvent à rechercher dans la biodiversité naturelle des enzymes reconnaissant par hasard un substrat non naturel d'intérêt. Néanmoins, dans de tels cas, l'activité est souvent sub-optimale et les conditions de solvant et de température que souhaite le chimiste pour de telles réactions sont souvent éloignées des conditions tolérées par l'enzyme. Est-il possible de reproduire au laboratoire les mécanismes de l'évolution biologique afin de fabriquer des biocatalyseurs adaptés à n'importe quelle réaction, en particulier sur une molécule non naturelle ? Peut-on optimiser une enzyme existant pour la faire fonctionner de manière optimale dans des conditions non naturelles (pH, salinité, température, solvant organique) ? Tels sont les enjeux d'une nouvelle technologie, « l'évolution dirigée », dont le principe est né il y a une dizaine d'années des travaux de l'Américain William Stemmer pour produire de la diversité dans des séquences d'ADN [1-2]. En 1996, ce chercheur a créé la société Maxygen, leader mondial actuel dans ce domaine, avec Alejandro Zaffaroni qui venait de quitter Affymetrix. La création d'un nouveau biocatalyseur par évolution dirigée repose sur deux principes : i) la sélection dans la biodiversité naturelle d'une enzyme ou d'une famille d'enzymes susceptibles d'effectuer une réaction mettant en œuvre une chimie adaptée au problème ; ii) l'adaptation de la séquence

de ces enzymes naturelles pour optimiser leur activité sur des substrats et dans les conditions souhaitées.

La biodiversité naturelle

Au cours de l'évolution, les organismes vivants ont en effet occupé tous les milieux naturels disponibles. C'est ainsi que l'on a trouvé des bactéries dans des sources chaudes sulfureuses des régions volcaniques, sous des pressions et des températures extrêmes au voisinage des « souffleurs noirs¹ » des failles sous-marines, dans les glaces de l'Antarctique ou encore dans les eaux saturées en sel (voir article de Y. Gueguen et J. Dietrich). Parallèlement, le monde des plantes et des micro-organismes fait preuve d'une extraordinaire diversité chimique sur de nombreuses molécules spécifiques dont certains de nos médicaments sont issus. Ces collections d'organismes permettent de rechercher des enzymes capables de fonctionner tant dans des conditions extrêmes que sur les substrats les plus étranges. Une fois l'information génétique correspondante extraite par des moyens adaptés, les séquences correspondantes formeront le matériel de départ pour le processus d'optimisation fonctionnelle par évolution dirigée.

L'évolution moléculaire artificielle : mimer la nature à l'échelle de temps du laboratoire

Après identification de l'enzyme souhaitée dans la biodiversité naturelle, le problème revient à trouver la combinaison de mutations synergiques conduisant à en optimiser la fonction recherchée. Le principe consiste à imiter la nature en enchaînant, à l'échelle de temps du laboratoire, des cycles de mutation, de sélection et de recombinaison de l'information génétique (figure 1). Une diversité moléculaire maximale est engendrée par des techniques de biologie moléculaire au niveau du gène codant pour l'enzyme d'intérêt qui est alors exprimée sous une forme sélectionnable. Un « crible », conçu en fonction de

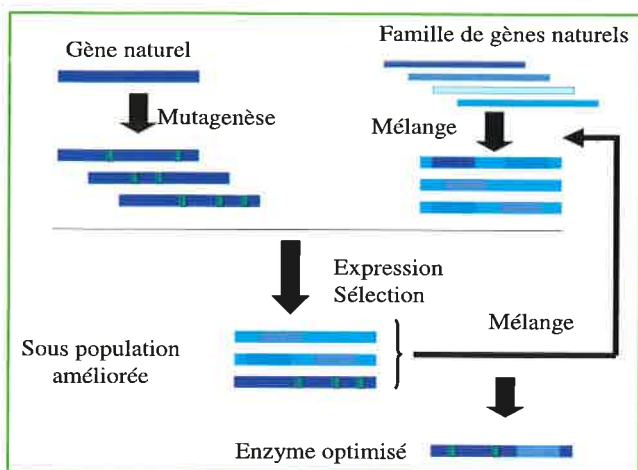


Figure 1 - Principe de l'évolution dirigée.

la propriété recherchée, permet alors de ne retenir que les enzymes « améliorées » dont les caractéristiques et les propriétés se rapprochent de l'objectif fixé. Jusqu'à ce stade, l'évolution moléculaire ressemble à une optimisation par mutagenèse et criblage. Néanmoins, trois différences majeures apparaissent à ce niveau :

- i) on ne cherche pas à sélectionner le « meilleur » mutant mais toute une série de variants présentant chacun une forme d'amélioration fonctionnelle ;
 - ii) l'information génétique de l'ensemble des variants retenus est remélangée afin de créer une nouvelle banque de mutants dans laquelle les mutations positives présentes dans chacun des variants sélectionnés auront une chance d'être réunies dans une même structure et, à l'inverse, où les mutations négatives auront une chance d'être éliminées ;
 - iii) le cycle mutation-sélection-recombinaison est recommencé plusieurs fois jusqu'à aboutir à la solution optimale.
- Si l'on suppose par exemple que le variant optimisé d'une protéine d'une centaine d'acides aminés doit porter cinq mutations distinctes, le calcul montre qu'il faudrait cribler une banque de l'ordre de 10^{15} mutants pour examiner toutes les possibilités dans une approche par mutagenèse-criblage classique. En revanche, si l'on sélectionne d'abord individuellement des molécules portant chacune l'une des cinq mutations avantageuses, puis que l'on recombine au hasard ces séquences entre elles, il suffira alors de cribler quelques milliers de variants par cycle d'évolution combinatoire pour avoir une chance de trouver le quintuple mutant recherché en moins de cinq cycles. Le gain d'efficacité est donc considérable et confère à cette approche un intérêt considérable.

Générer une biodiversité artificielle

Générer une biodiversité artificielle comprenant un très grand nombre de variants (de 10^3 à 10^{13}) d'une molécule est la première étape de tout processus d'évolution dirigée. La distribution des mutations peut être aléatoire et impliquer la totalité de la séquence d'intérêt ou seulement des segments ciblés si l'on dispose, par exemple, d'informations structurales permettant de prédire un rôle particulier de certains segments de séquence. En pratique, il est impossible de construire des banques exhaustives dès que le nombre de mutations simultanées par molécule dépasse 5 ou 6. Le choix est donc entre l'exploration complète d'une diversité limitée ou l'exploration incomplète d'une diversité

plus large. Pratiquement, la génération de mutations au hasard est la plupart du temps effectuée par amplification *in vitro* lors d'une réaction de PCR (*polymerase chain reaction*) plus ou moins « empoisonnée » afin d'ajuster le taux de mutations, ou alternativement *in vivo* par l'utilisation de souches de bactéries *E. coli* inactivées au niveau des gènes codant pour les systèmes de réparation de l'ADN. Dans le cas de mutations ciblées sur des zones particulières, l'utilisation d'oligonucléotides dégénérés en séquence au cours de leurs synthèses est préférée.

A ce stade, un facteur supplémentaire intervient : l'accumulation de mutations au hasard dans une protéine conduit rapidement à des « mutations létales » pour l'activité résultant par exemple de la modification de la structure tridimensionnelle de l'enzyme. Le choix est alors entre une faible biodiversité risquant de ne pas couvrir les « bonnes solutions » et une diversité de séquences élevée avec peu de diversité fonctionnelle du fait de l'accumulation d'enzymes « mortes ». Une solution proposée par W. Stemmer consiste à utiliser non pas des gènes mutagénisés, mais des gènes appartenant à une même famille. Au sein d'une famille de gènes homologues (présentant par exemple 40 à 80 % d'identité de séquence), les séquences et les fonctions varient mais la structure tridimensionnelle est conservée. Ces variations de séquences, sélectionnées par l'évolution naturelle comme compatibles avec la structure, sont en général beaucoup moins « toxiques » pour la fonction que des mutations au hasard [3]. Ce type de biodiversité peut être généré par recombinaison comme pour l'étape de remélange de l'information génétique.

Mélanger des séquences pour redistribuer l'information génétique

Cette étape qui intervient après l'étape de sélection fonctionnelle (qui sera décrite par la suite) a pour objet de remélanger les séquences de l'ensemble d'une population de variants afin de réunir les mutations positives et d'éliminer les négatives. Elle est techniquement délicate si l'on veut éviter la formation de « biais », en particulier lorsque les séquences à recombiner sont relativement divergentes (25 % ou plus de différence). Les technologies mises en œuvre (figure 2) sont toutes couvertes par des brevets et constituent un point clé en matière de propriété industrielle. La méthode la plus utilisée nommée *DNA-shuffling* ou « PCR sexuelle » a été proposée en 1994 par Willem Stemmer. Elle consiste dans un premier temps à fragmenter au hasard les

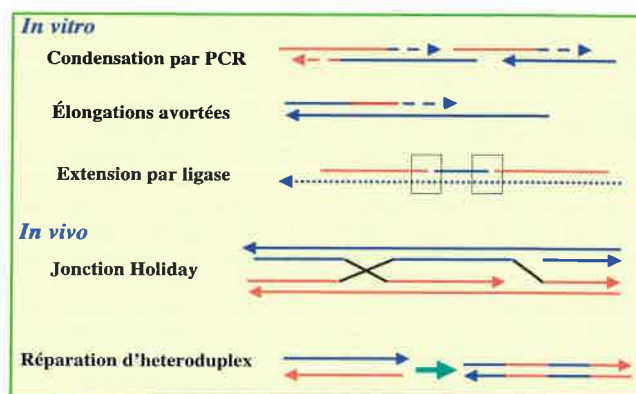


Figure 2 - Principaux mécanismes de recombinaison utilisés pour le mélange de gènes.

gènes codant pour les variants de l'enzyme d'intérêt par exemple avec une nucléase. Cette fragmentation est suivie d'une PCR de réassemblage où chaque fragment d'ADN dénaturé s'hybride sur un autre fragment dans une région de complémentarité de séquence et sert d'amorce ou de matrice pour l'élongation. En quelques dizaines de cycles de PCR, des gènes mosaïques plus ou moins complets sont reconstruits, puis amplifiés dans un second temps par un jeu d'amorces situées aux extrémités. Cette dernière étape permet de n'amplifier que les gènes reconstitués en entier. Ces derniers sont alors clonés puis exprimés pour permettre l'étape de sélection fonctionnelle.

Cette méthode de réassemblage est elle-même mutagène, ce qui est à la fois un avantage et un inconvénient. L'avantage est que cette mutagenèse constitue la première étape du cycle d'évolution suivant, l'inconvénient est que l'accumulation de trop de mutations conduit à un nombre croissant d'enzymes « mortes » dans la population. Les protocoles optimisés permettent de descendre à environ 0,5-1 mutation par kilobase. Pour réduire encore ce taux, on peut, à la fin des cycles d'évolution, « nettoyer » les gènes améliorés par un cycle de recombinaison avec un excès de gènes parentaux non mutés ou utiliser d'autres méthodes de réassemblage (voir encadré 1). Parmi les méthodes alternatives d'intérêt, on peut faire appel à des mécanismes de recombinaison *in vivo*, en particulier chez la levure de boulangerie [4]. Ce type de recombinaison implique des mécanismes complexes, en particulier la formation d'une structure en forme de « double aiguillage » (jonction Holiday), qui permet un échange de brins entre deux ADN double brin (figure 2). Ce processus, semblable à la recombinaison génétique durant la reproduction sexuée, n'est généralement pas mutagène et peut servir en même

Encadré 1

Générer la biodiversité au laboratoire

PCR sexuelle

Les gènes sont fragmentés aléatoirement par une nucléase. Les fragments servent réciproquement d'amorces et de matrices à une réaction de PCR sans amorces jusqu'à repolymérisation d'un gène complet. Les cycles de PCR permettent au StEP une élongation maximum à chaque cycle.

StEP (staggered extension process)

A partir d'une population de fragments de gènes, on réalise une PCR avec amorces dans laquelle les temps de polymérisation sont très courts, de façon à n'allonger que de quelques dizaines de nucléotides les amorces. A chaque cycle, les fragments en cours d'élongation sont dissociés, puis ré-hybridés aléatoirement sur une autre molécule de matrice jusqu'à reconstruction du gène.

L-shuffling™ (large shuffling)

Après digestion des molécules d'ADN double brin par des enzymes de restriction, les fragments obtenus sont dénaturés et ré-assemblés sur une matrice labile par plusieurs cycles de ligation². La matrice est ensuite détruite spécifiquement.

RACHITT (random chimeragenesis on transient template)

Cette méthode utilise à la fois la ligation et la polymérisation : à chaque cycle, l'un des brins de chaque ADN à recombinaison est fragmenté, et les divers fragments sont hybridés sur l'autre brin qui sert de matrice. Leurs extrémités sont digérées, puis une polymérase remplit les trous ainsi créés en allongeant les fragments qu'une ligase raboute en un brin continu.

CLERY (combinatorial library enhanced by recombination in yeast)

Les fragments de gènes sont partiellement ré-assemblés par PCR sexuelle, éventuellement suivie d'une PCR avec amorces. Le mélange est co-transformé chez la levure avec un vecteur donc les extrémités recouvrent les fragments issus du PCR. Les événements de recombinaison *in vivo* reconstruisent le gène et le clone dans le vecteur.

temps d'outil de clonage dans le système d'expression [5]. Un brevet actuel fait appel à une telle association de recombinaisons *in vivo* et *in vitro*. Une autre approche implique la technologie des puces à ADN pour corriger les défauts des processus de combinaison et consiste à établir dans un premier temps une « cartographie » des populations de structures mosaïques, puis à égaliser ces populations par des méthodes de tri robotique.

Sélectionner les enzymes présentant les fonctions et propriétés d'intérêts

A chaque cycle d'évolution, l'expérimentateur peut décider soit de tester individuellement un nombre plus ou moins élevé de variants (approche de criblage), soit de tester globalement l'intégralité de la population de variants afin d'en extraire une sous-population qui satisfait le critère de sélection choisi (approche de tamisage). Le criblage nécessite des méthodes de tri à haut débit, utilisant de la robotique, des systèmes fluidiques comme les trieurs de cellule ou plus récemment des nanosystèmes dits « labs on chip ». Ce type de criblage permet de rechercher des améliorations marginales ou d'adresser des fonctions complexes, mais est souvent coûteux et limité à l'analyse de petites populations de variants. Néanmoins, plusieurs succès ayant conduit à une industrialisation des enzymes améliorées ont été obtenus par cette voie. Dans le second cas, on peut explorer des banques de très grande taille, mais il faut faire appel à des propriétés tranchées et faciles à mettre en évidence, comme l'apparition d'une nouvelle capacité de fixation, ou à des sélections génétiques directes utilisant des systèmes rapporteurs.

Dans tous les cas, la sélection passe par l'expression des variants d'enzymes ou de protéines dans un système adapté au criblage ou à la sélection. On peut classer les systèmes d'expression d'une part selon la taille des populations qu'ils permettent d'analyser, d'autre part selon qu'ils sont plus adaptés à l'analyse d'activités enzymatiques ou à la mesure d'interactions ligand-protéine ou protéine-protéine.

Les systèmes d'expression les plus classiques font appel à des micro-organismes telle la bactérie *E. coli* ou la levure. Ces systèmes sont bien adaptés à l'expression d'activités enzymatiques soit intracellulaires, soit secrétées. La bactérie est particulièrement adaptée à l'expression d'enzymes solubles ne nécessitant pas d'environnement particulier, alors que la levure prend l'avantage pour les protéines membranaires ou la co-expression de complexes ou de systèmes multi-enzymatiques (figure 3). Dans les deux cas, la taille des banques exploitables est limitée à 10^3 - 10^4 pour la levure, 10^3 - 10^6 pour *E. coli*.

La méthode du *phage display* (voir encadré 2) a trouvé un très grand nombre d'applications pratiques car elle permet facilement l'analyse *in vitro* d'interactions (par exemple la sélection de variants d'anticorps). Elle présente l'avantage d'être applicable à de grandes populations, mais est en général peu adaptée à l'analyse de fonctions enzymatiques, même si des exemples récents démontrent qu'elle peut être applicable pour l'analyse de la thermostabilité d'enzymes. Pour l'analyse de très larges populations, la taille du système d'expression doit devenir « moléculaire » ; on a alors recours au *ribosome display* qui possède les mêmes potentialités que le *phage display*, tout en permettant, en théorie, l'analyse de populations extrêmement larges. Néanmoins, la méthode est très délicate à mettre en œuvre et actuellement difficilement applicable à l'analyse d'activités enzymatiques.

Quelles applications aujourd'hui ?

Le marché mondial des enzymes industrielles est estimé à un demi-milliard d'euros qui se concentre autour d'un nombre assez limité de domaines d'application : les détergents, la transformation de l'amidon, les industries textiles et papetières et l'agroalimentaire. En dépit des progrès pour la mise en œuvre de ces biocatalyseurs et de leur utilisation maintenant possible dans des milieux dits « non conventionnels » (solvants organiques, milieux concentrés), l'utilisation des enzymes reste encore marginale dans beaucoup de procédés industriels. L'espoir porté un moment sur l'utilisation d'enzymes originaires d'espèces extrémophiles ou sur la sélection de variants obtenus par mutagenèse aléatoire classique à certes permis d'accroître l'efficacité des enzymes industrielles d'environ 10 % par an, mais sans réel saut d'échelle. Dans certains cas favorables, des mutations « dirigées » ont pu conduire à des gains significatifs, comme dans le domaine de la stabilité des protéases vis-à-vis des agents oxydants présents dans les lessives.

En dépit d'un recul encore limité, un nombre significatif de succès peut être mis au compte de l'évolution dirigée dans les domaines de l'augmentation de la thermostabilité des enzymes, de l'amélioration des performances dans des environnements non naturels, ou de réaction aux interfaces (lessives), de l'affinité, de la spécificité ou de l'énantiosélectivité [6].

Un autre succès important de ces approches, même s'il ne concerne pas la catalyse, se situe dans l'amélioration de l'affinité et de la spécificité des anticorps avec en particulier plusieurs applications dans le domaine de la santé. On connaît en outre près d'une centaine de réactions catalysées par de tels anticorps (voir article de R. Ricoux *et al.*) dont certains sont commercialisés pour des applications en chimie fine. Ce domaine encore balbutiant offre néanmoins de nombreuses perspectives d'avenir dans le domaine de la conception à la demande de nouveaux catalyseurs.

Les acteurs du marché industriel

L'évolution dirigée constitue un enjeu stratégique pour le domaine de la biocatalyse industrielle. La société Maxigen a ainsi concédé une licence exclusive à la division Enzymes de la firme danoise Novo Nordisk devenue, fin 2000, Novozymes, leader mondial du marché des enzymes

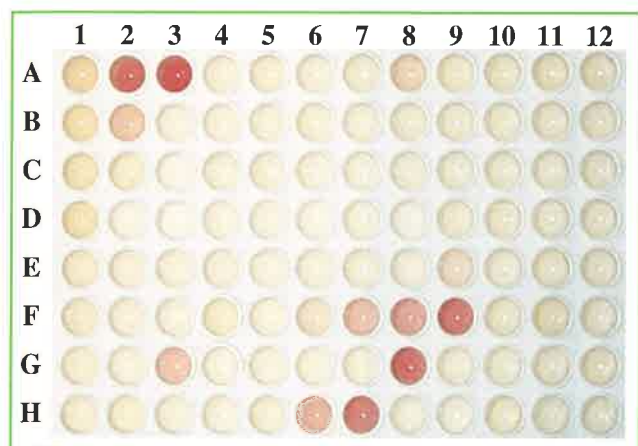


Figure 3 - Conversion du naphthalène en naphthol par des clones de levure exprimant une bibliothèque de P450 humains mosaïques.

Encadré 2

Les systèmes d'expression et de sélection

Bactéries, levures et cultures cellulaires (in vivo)

Un plasmide d'expression est transfecté dans l'hôte. Le gène est alors transcrit et traduit, puis la protéine résultante est éventuellement transportée et maturée par la machinerie intracellulaire. Moyennant l'ajout d'une séquence « signal » particulière, la protéine résultante peut être sécrétée dans le milieu de culture.

Phage display (in vivo)

Dans cette méthode, chaque variant du peptide ou de la protéine de départ est exposé à la surface d'un bactériophage filamenteux de type M13, par fusion avec une protéine de l'enveloppe du phage : le plus souvent, il s'agit de la protéine 3, présente sur la « tête » du phage, ou de la protéine 8 du manteau du phage. Le phage modifié est synthétisé, assemblé et sécrété après transfection de la bactérie *E. coli*.

Ribosome display (in vitro)

Le principe est de construire, par transcription et traduction *in vitro*, une banque de variants d'une protéine, en empêchant la dissociation du ribosome au terme de la traduction ; chaque molécule d'ARN messager demeure ainsi associée à la protéine qui lui correspond. Lorsque les protéines capables de se fixer sur la « cible » sont sélectionnées, c'est donc un complexe associant la protéine, son ARN messager et le ribosome qui est retenu.

Transcription et traduction couplées (in vitro)

La transcription et la traduction d'un gène sont effectuées à l'aide d'enzymes et d'extraits acellulaires dans des plaques à microtitrations. La détection des activités peut être faite directement dans les plaques. Cette approche est très souple mais nécessite une robotisation importante pour trier des banques.

industrielles, avec pratiquement 50 % de part de marché. Novozymes a déjà commercialisé deux enzymes obtenues par évolution moléculaire dirigée : une lipase et une protéase destinées au marché des détergents. Son concurrent direct Genencor International (États-Unis), qui contrôle environ 30 % du marché mondial des enzymes, aurait également mis sur le marché des protéases obtenues par ces approches. Genencor a signé récemment un accord avec Enchira Biotechnology qui a développé la méthode de brassage de gènes Rachitt[®] renforçant ainsi sa position. Bien que présentant un retard certain, l'Europe n'est pas en reste avec des entreprises telle la société allemande Direvo ou la société nîmoise Protéus. Cette dernière propose une méthode originale de génération de diversité, le *L-Shuffling*[®], qui peut être appliquée à des fragments d'ADN de grande taille et échappe aux brevets de Maxigen.

Quelles perspectives ?

L'amélioration des enzymes et des anticorps n'est pas le seul horizon de l'évolution dirigée. Faire émerger une « nouvelle » fonction reste extrêmement difficile si l'on veut créer une activité qui n'existe pas initialement, même à l'état de trace. Néanmoins, en faisant appel à une stratégie très sophistiquée, le groupe d'Alan Fersht à l'université de Cambridge (Royaume-Uni) a démontré qu'un tel objectif n'était pas unimaginable [7]. Un autre domaine d'intérêt majeur serait l'utilisation des méthodologies d'évolution pour faire l'inverse de la nature, créer des enzymes les plus génériques possibles qui soient capables de catalyser une réaction définie sur un substrat pouvant être quelconque en dehors du site de la réaction proprement dit. On pourrait ainsi imaginer une batterie d'enzymes utilisables pour réaliser très rapidement n'importe quel type de synthèse. D'autres groupes s'intéressent aussi à la sélection d'enzymes de fonctions nouvelles à partir de séquences

totale­ment aléatoires, un processus qui pourrait rendre compte de l'émergence de nouvelles fonctions au cours de l'évolution naturelle [8]. De nombreux domaines sont donc encore à découvrir autour de l'évolution dirigée et des méthodes combinatoires en général. Nous ne sommes pas au bout de nos surprises.

Notes

¹souffleur noir : source sous-marine d'eau à très haute température au niveau des failles volcaniques ou des rifs.

²ligation : la ligase est une enzyme catalysant la formation d'une liaison phosphodiester entre les 3'-hydroxy et 5'-phosphate adjacents d'un ADN double brin.

Références

- [1] Stemmer W.P.C., *Nature*, **1994**, 370, p. 389.
 [2] Stemmer W.P.C., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, États-Unis, 1994, 91, p. 10747.

- [3] Chang C.-C.J. *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 1999, 17, p. 793.
 [4] Mezard C. *et al.*, *Cell*, **1992**, 70, p. 659.
 [5] Abecassis V. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28(20), E88.
 [6] Robertson M., Ellington A., *Nat. Biotechnol.*, **2001**, 19, p. 650.
 [7] Altamirano M.M. *et al.*, *Nature*, **2000**, 403, p. 617.
 [8] Keefe A.D., Szostak J.W., *Nature*, **2001**, 410, p. 715.

Denis Pompon

est directeur de recherche CNRS au laboratoire d'ingénierie des protéines membranaires du CNRS de Gif-sur-Yvette*.



* Laboratoire d'ingénierie des protéines membranaires, Centre de génétique moléculaire du CNRS, 91190 Gif-sur-Yvette. Tél. : 01 69 82 36 80. Fax : 01 69 82 36 82. E-mail : pompon@cgm.cnrs-gif.fr

Pour en savoir plus

- Arnold F.H., *Nature*, **2001**, 409, p. 253.
- Arnold F.H. *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, **2001**, 26, p. 100.
- Bornscheuer U.T., Pohl M., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2001**, 5, p. 137.
- Sterner R., Liebl W., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **2001**, 36, p. 39.

Sites Internet

- Groupe de Frances Arnold, Caltech
www.che.caltech.edu/groups/fha/Enzyme/Enzyme.html
- Groupe d'Andreas Plückthun (Zurich)
<http://www.unizh.ch/~pluckth/>
- Protéus (Nîmes)
<http://www.proteus.fr/>



Découverte et optimisation de nouvelles enzymes pour la catalyse enzymatique industrielle

Fabrice Lefèvre, Gilles Ravot, Hong Khanh Nguyen, Delphine Lagarde, Laurent Fourage, Jean-Marie Sonet et Daniel Dupret

Summary

Screening and directed evolution of novel biocatalysts for industrial purposes

Biodiversity screening and directed evolution are two fruitful complementary approaches for the discovery and design of novel biocatalysts. Phenomics™ is a functional HTS technology designed and patented by Protéus for the screening of natural biodiversity as well as biodiversity generated by combinatorial biology. Phenomics™ is a function to gene structure approach which provides an alternative to genomics and proteomics. To generate novel variants of natural enzymes, a new technology for directed evolution, L-Shuffling™, has been designed and patented by Protéus. The thousands of new recombinants generated by L-Shuffling™ can be further screened for their biochemical characteristics using Phenomics™. The whole process of novel biocatalysts discovery and optimization has been automated using commercially available high throughput robotics.

Mots-clés Key-words

Biocatalyse, CLIPS-O™, biodiversité, Phenomics™, criblage, L-Shuffling™, évolution dirigée.

Biocatalysis, CLIPS-O™, biodiversity, Phenomics™, screening, L-Shuffling™, directed evolution.

Dans de nombreux secteurs industriels, l'utilisation des biocatalyseurs est en forte croissance. Les biocatalyseurs sont des « enzymes », protéines naturellement présentes dans tous les organismes vivants et qui sont dotées d'activités catalytiques. C'est grâce à ces activités catalytiques que des milliers de réactions biochimiques sont réalisées par les cellules vivantes pour leur métabolisme.

La biocatalyse en chimie fine

L'utilisation d'enzymes pour la synthèse de composés chimiques variés présente de nombreux avantages par rapport aux techniques de la synthèse organique. L'image « verte » de la bioconversion est un premier avantage. La spécificité chirale des enzymes constitue un deuxième avantage. Dans le domaine pharmaceutique en particulier, les résolutions énantiomériques enzymatiques et les synthèses enzymatiques de produits sont de plus en plus requises. Ce mouvement se fait sous la pression des autorités réglementaires qui souhaitent la mise sur le marché des produits énantiomériquement purs. Les produits biologiquement actifs étant de plus en plus complexes et présentant des centres chiraux de plus en plus nombreux, l'utilisation des voies enzymatiques présente des avantages économiques et techniques significatifs par rapport à la chimie traditionnelle.

Un exemple classique de cette tendance est l'acide 6-aminopenicillanique (6-APA), un intermédiaire important dans la production de nombreux antibiotiques. La synthèse chimique de ce composé nécessite 3 étapes mettant en œuvre des réactifs toxiques et nécessitant des conditions réactionnelles assez drastiques. La bioconversion s'effectue en une seule étape, dans des conditions réactionnelles

douces et sans autre réactif que des enzymes et leurs substrats. Il n'est donc pas surprenant que la bioconversion ait entièrement supplanté la synthèse chimique pour la synthèse du 6-APA et de ses dérivés [1-3].

Dans le domaine de la chimie fine, la production de nouveaux agents tensioactifs, de nouveaux émulsifiants ou de nouveaux dérivés des silicones sont des exemples d'applications concernant des secteurs aussi importants que les peintures et laques, les cosmétiques et l'électronique.

Nouvelles technologies de découverte et d'évolution de biocatalyseurs industriels

A ce jour, les propriétés intrinsèques des enzymes présentes sur le marché limitent leur utilisation à certains procédés de production industrielle. Les enzymes ne sont en effet actives que dans des plages de température ou de pH très réduites. Elles sont inactivées à haute température, en présence de solvants ou de concentrations salines inappropriées. Par ailleurs, les réactions chimiques industrielles mettent souvent en jeu des substrats très éloignés des substrats naturels transformés par les enzymes dans les cellules vivantes.

Le défi aujourd'hui consiste donc à découvrir des enzymes qui répondent très exactement aux contraintes techniques et économiques des procédés de biocatalyse industriels modernes : enzymes plus stables (résistantes à la température, aux solvants...), plus actives (gain de temps, rendement), plus sélectives (chiralité, pureté des produits, élimination des sous-produits), ou catalysant des réactions que les enzymes actuelles ne savent pas réaliser.

Cette démarche nouvelle, qui est celle de Protéus, consiste à développer « sur mesure » le biocatalyseur adapté à la fabrication d'un nouveau produit pour lequel aucun procédé enzymatique techniquement et économiquement utilisable n'existe sur le marché.

Protéus mène ses recherches en utilisant deux approches complémentaires : i) le criblage de la biodiversité naturelle ; et ii) l'évolution dirigée des enzymes. La synergie entre les différentes technologies de Protéus pour aboutir à la mise au point d'un nouveau produit est représentée par la figure 1.

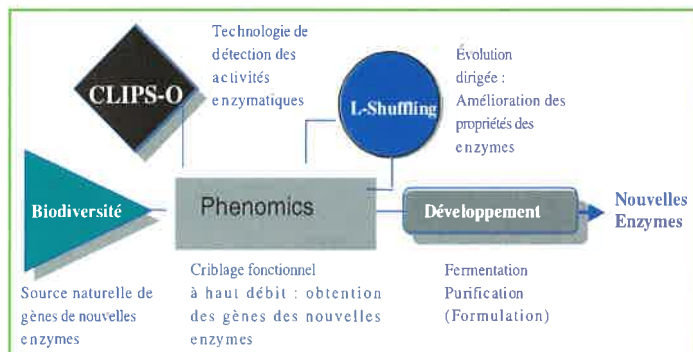


Figure 1 - Synergie entre les différentes technologies de Protéus pour aboutir à la mise au point d'un nouveau produit.

La biodiversité microbienne : un immense réservoir de nouvelles enzymes

Certains micro-organismes, dits « extrémophiles » ont colonisé des biotopes où ils ont su s'adapter à des conditions de vie extrêmement dures. Ils ont su par exemple s'adapter aux très hautes températures qui règnent dans les fosses océaniques à proximité des fumeurs sous-marins au niveau des zones d'accrétion. Inversement, d'autres micro-organismes se développent aux très basses températures régnant dans les zones polaires, ou en présence de concentrations salines très élevées, ou encore de conditions extrêmes de pH (voir article de Y. Gueguen et J. Dietrich).

Les caractéristiques originales des enzymes issues de micro-organismes extrémophiles en font des produits particulièrement intéressants pour de nombreuses applications. Par exemple, la stabilité et l'activité des enzymes produites par les micro-organismes issus d'environnements extrêmes permettent leur utilisation dans des domaines d'application où la faible résistance des enzymes mésophiles⁽¹⁾ interdisait jusqu'ici de seulement envisager l'utilisation de la biocatalyse.

Protéus a constitué une collection exclusive de plusieurs milliers de micro-organismes extrémophiles par l'intermédiaire de ses propres programmes d'isolement microbiologiques, ou par la mise en place d'accords de partenariats avec les meilleurs experts mondiaux de ces domaines. Les souches sont stockées et les collections maintenues viables dans les laboratoires de Protéus (tableau I).

A partir de ce matériel biologique original, Protéus recherche les biocatalyseurs et les activités intéressantes au moyen d'une nouvelle technologie de biologie moléculaire propriétaire appelée PhenomicsTM (2).

PhenomicsTM : un nouvel outil de découverte de biocatalyseurs

Pour le criblage de la biodiversité naturelle comme pour celui de la biodiversité artificielle produite par l'évolution

dirigée, il est nécessaire de disposer d'une technologie adaptée. Dans ce type de criblage, les approches génomiques et protéomiques ne sont pas adaptées.

L'approche protéomique n'autorise pas réellement le criblage à haut débit car elle est très difficilement automatisable. Elle ne permet pas non plus l'accès immédiat à l'information génétique correspondante indispensable pour pouvoir envisager l'utilisation industrielle des enzymes découvertes. L'approche génomique, en plus d'être longue et coûteuse, ne donne malheureusement pas les meilleures chances pour découvrir de nouveaux biocatalyseurs. La raison de cette limite réside dans le fait que l'identification des gènes codant pour les nouvelles biomolécules recherchées est faite par la recherche d'homologies de séquence avec des gènes codant pour des molécules déjà connues. En d'autres termes, ces recherches génomiques ne permettent de trouver que des éléments qui ressemblent à d'autres déjà connus dans l'art antérieur. Cette approche n'est évidemment pas la meilleure pour se donner des chances de découvrir des enzymes « originales ». De la même manière, elle ne permet pas de détecter ce qui est réellement nouveau. Cet aspect est d'autant plus important que la biodiversité à laquelle Protéus s'adresse est elle-même nouvelle et originale.

Pour réaliser ses programmes de recherche de nouvelles enzymes, Protéus a développé une technologie de criblage fonctionnel de la biodiversité. Cette technologie brevetée, baptisée PhenomicsTM, est la première qui réussisse à donner accès directement aux fonctions des protéines tout en gardant un accès facile et constant aux gènes correspondants. Elle permet de détecter des protéines actives, d'étudier leur activité sous une forme repliée ou solubilisée très proche de leur forme naturelle, tout en s'affranchissant des problèmes liés aux banques d'expression traditionnelles. L'approche PhenomicsTM est entièrement automatisée et permet le criblage à haut débit de la biodiversité naturelle, mais aussi de la biodiversité générée par évolution dirigée.

La première étape du procédé PhenomicsTM consiste à stocker le matériel génétique étudié (l'ADN génomique d'un micro-organisme extrémophile) dans des banques génomiques au moyen d'une famille de vecteurs spécifiquement développés, et appelés pBANK. Ces banques sont traitées par un « colony picker » qui permet de répartir chaque clone dans un puit de plaque de micro-titration. Chaque clone est ensuite traité individuellement. Des étapes successives de transcription *in vitro*, puis de traduction *in vitro*, permettent de s'affranchir de toute régulation cellulaire et de standardiser l'expression de toutes les protéines exprimables par le matériel génétique d'origine. L'absence de tout système vivant permet également de s'affranchir des problèmes de cytotoxicité.

Tableau I - Caractéristiques des différents micro-organismes extrémophiles de la collection de Protéus.

Type	Conditions optimales de développement
Thermophiles	Températures > 60 °C
Hyperthermophiles	Températures > 80 °C
Psychrophiles	Températures < 15 °C
Halophiles	Fortes concentrations salines (> 50 g/L)
Acidophiles	pH très bas (< 4)
Alcalophiles	pH très élevés (> 8)

Le système de traduction est adapté à l'origine phylogénétique du matériel génétique. Une gamme de réactifs de traduction *in vitro* universels spécifiques a été développée par Protéus. Un réactif clé, baptisé PheMix™, a été optimisé de telle façon que les protéines exprimées soient produites en solution, sous une forme repliée et active.

Au cours du criblage d'une enzyme, le procédé Phenomics™ permet de produire suffisamment de matériel protéique pour réaliser une caractérisation biochimique rapide des protéines détectées sans qu'il soit besoin de sous-cloner le gène dans un hôte d'expression. Si les caractéristiques de la protéine détectée sont intéressantes, le gène correspondant est immédiatement obtenu en repérant les coordonnées géographiques du hit positif et en se reportant à la plaque initiale contenant les gènes de la banque pBANK avant criblage.

Les gènes d'intérêt sont ensuite clonés dans des souches plus faciles à cultiver, permettant ainsi d'obtenir une expression suffisante de la nouvelle enzyme pour une production industrielle.

Nouvelles générations de substrats : technologie CLIPS-O™ (3)

Phenomics™ étant une technologie de criblage fonctionnel, la nature et la qualité du test fonctionnel utilisé (le test d'activité de l'enzyme recherchée) est un élément crucial pour le succès d'un criblage. Lors du criblage d'un nouveau biocatalyseur, le crible choisi est l'élément qui définit le type d'enzyme qui sera découverte.

Protéus et l'université de Berne (Suisse) ont décidé de collaborer pour utiliser et perfectionner une nouvelle technologie de substrats permettant la détection de nouvelles enzymes. Cette technologie, baptisée CLIPS-O™, permet de préparer des familles de substrats mieux adaptés aux exigences du criblage à haut débit. Les substrats CLIPS-O™ reproduisent de très près la structure chimique et l'état d'énergie des substrats industriels. Très stables, ils peuvent être mis en œuvre dans des conditions de température, de salinité, de pH très variées. Dans toutes ces conditions, cette technologie améliore de façon très significative le rapport signal sur bruit.

La figure 2 illustre le type d'amélioration du rapport signal/bruit obtenu avec un substrat CLIPS-O™ mis en œuvre dans un criblage Phenomics™ de lipases à température élevée.

L'évolution dirigée par L-Shuffling™ (4) : Darwin au secours de l'industrie

Suite au criblage de la biodiversité naturelle, les enzymes découvertes peuvent ne pas avoir exactement les caractéristiques requises dans le cahier des charges du procédé de catalyse industriel (il est possible par exemple de découvrir une époxyde hydrolase thermostable et thermoactive, mais n'ayant pas une résistance aux solvants suffisante pour effectuer certaines synthèses). Dans ce cas, l'enzyme trouvée peut être optimisée à l'aide d'une technique d'« évolution dirigée » appelée L-Shuffling™ afin d'améliorer ses propriétés.

L'évolution met en jeu trois mécanismes : l'apparition aléatoire de mutations sur les gènes, la recombinaison des gènes et la sélection au cours du temps des gènes qui confèrent les meilleures propriétés. Le terme « évolution dirigée » recouvre

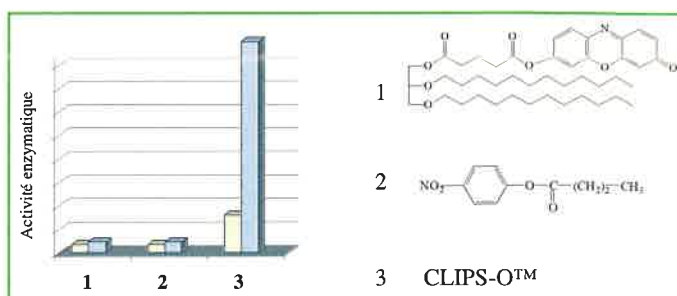


Figure 2 - Rapport signal/bruit obtenu avec un substrat CLIPS-O™ mis en œuvre dans un criblage Phenomics™ de lipases (1 µL de produit Phenomics™ par essai - activité testée à température élevée).

Les barres bleues représentent le signal et les barres jaunes le bruit de fond.

1 : Substrat classique disponible sur le marché 1,2-O-dilauryl-rac-glycéro-3-glutaric-resorufinester.

2 : Substrat classique disponible sur le marché p-nitrophénylbutyrate.

3 : Substrat propriétaire CLIPS-O™ lipase-spécifique

un ensemble de techniques de biologie moléculaire qui permet de recréer dans un tube à essai l'évolution naturelle accélérée, ramenant l'échelle du temps de quelques centaines ou milliers d'années à quelques heures.

L'évolution dirigée par L-Shuffling™ peut donc être comparée à une sorte d'« élevage moléculaire ». Le mécanisme de cette technologie peut être résumé de la façon suivante : des gènes parents sont croisés entre eux de façon aléatoire pour produire une nouvelle génération de gènes. Cette recombinaison *in vitro* aléatoire joue le même rôle que celui que joue la reproduction dans l'évolution naturelle. Le pool de gènes nouveaux produit par la recombinaison contiendra des gènes améliorés à différents niveaux. En appliquant une pression de sélection sur cette nouvelle génération de gènes-fils, on peut sélectionner ceux qui ont évolué dans le sens souhaité, les séparer des autres et les utiliser comme nouveaux gènes-parents pour préparer une deuxième génération de gènes-fils encore améliorés. Ce cycle de recombinaison/sélection peut être répété autant de fois que nécessaire. A chaque cycle d'évolution dirigée, les nouvelles combinaisons les plus intéressantes sont sélectionnées au moyen d'un test de criblage adapté au produit recherché. Génération après génération, les caractéristiques des gènes évoluent dans la direction souhaitée par l'« éleveur moléculaire ».

Avec la technologie d'évolution dirigée L-Shuffling™, le temps de génération de nouveaux gènes est réduit à quelques heures et chaque nouvelle génération contient des dizaines de milliers de gènes nouveaux. La vitesse et la puissance de cette technologie permettent aujourd'hui de préparer des molécules entièrement nouvelles dans des conditions économiques compatibles avec les exigences de la rentabilité industrielle.

La pression de sélection utilisée par le biologiste moléculaire pour l'évolution dirigée des enzymes peut être définie de façon entièrement arbitraire pour correspondre à des conditions qui n'auraient jamais été rencontrées dans l'environnement naturel de ces molécules. Les cycles d'évolution accélérée et dirigée aboutissent donc à des biocatalyseurs aux caractéristiques biochimiques modifiées ou complètement nouvelles. On peut, par exemple, faire ainsi apparaître ou augmenter des capacités de résistance aux solvants, ou à d'autres composés toxiques, améliorer l'énantiosélectivité, etc.

Complémentarité entre biodiversité et évolution dirigée

Les deux approches complémentaires de criblage de la biodiversité et d'évolution dirigée sont utilisées par Protéus dans ses programmes de R & D de nouveaux biocatalyseurs destinés à la catalyse enzymatique industrielle. Cette approche pragmatique utilise le fruit de l'évolution naturelle (criblage à très haut débit des enzymes de micro-organismes extrémophiles), et celui de l'évolution artificielle dirigée par le chercheur afin d'affiner les propriétés des enzymes.

Conclusion

Disposer de nouveaux biocatalyseurs plus efficaces, plus résistants, plus spécifiques, mieux adaptés aux applications et qui puissent faire l'objet d'une protection par des titres de propriété industrielle est devenu une arme décisive pour mettre sur le marché des produits plus compétitifs. Cette approche concerne un très grand nombre de secteurs industriels, notamment les produits de l'industrie pharmaceutique, de l'industrie chimique, du textile, de l'agroalimentaire, etc.

A l'avenir, l'utilisation de la bioconversion pour la synthèse de molécules d'intérêt économique sera soutenue par la découverte et la mise au point d'enzymes actives sur de nouveaux substrats de synthèse, capables de catalyser de nouvelles classes de réactions et résistantes à des

conditions variées d'utilisation, notamment à la présence de quantités importantes de solvants et aux fortes températures. Protéus possède les technologies et les ressources génétiques pour développer ces nouveaux biocatalyseurs.

Notes

Phenomics™, PheMix™, CLIPS-O™ et L-Shuffling™ sont des marques déposées de Protéus.

(1) Enzyme mésophile : enzyme fonctionnant dans une gamme de température de 20 à 40 °C.

(2) Phenomics™ est une technologie brevetée par Protéus (D. Dupret, J.-M. Masson, F. Lefèvre, WO009747, Procédé d'identification de séquences polynucléotidiques et/ou des protéines correspondantes à partir d'un échantillon d'acides nucléiques).

(3) CLIPS-O™ est une technologie brevetée par Protéus et l'université de Berne (J.-L. Reymond, D. Wahler, F. Badalassi, H.-K. Nguyen, WO192563, Méthode de libération d'un produit comprenant une oxydation chimique, méthode de détection dudit produit et leurs applications).

(4) Le L-Shuffling™ est une technologie brevetée par Protéus (D. Dupret, J.-M. Masson, F. Lefèvre, WO009679, Procédé de production *in vitro* de séquences polynucléotidiques recombinées, banques de séquences et séquences ainsi obtenues).

Références

- [1] Luengo J.M., Iriso J.L., Lopez-Nieto M.J., *J. Antibiot.*, **1986**, 39(12), p. 1754.
- [2] Martinez-Blanco H., Reglero A., Luengo J.M., *J. Antibiot.*, **1991**, 44(11), p. 1252.
- [3] Torres-Bacete J., Arroyo M., Torres-Guzman R., de La Mata I., Castillon M.P., Acebal C., *Biotechnol Appl Biochem*, **2000**, 32(3), p. 173.



F. Lefèvre



G. Ravot



H.K. Nguyen



D. Lagarde



L. Fourage



J.-M. Sonet

Fabrice Lefèvre est directeur R & D, **Gilles Ravot**, chef du groupe Microbiologie, **Hong Khanh Nguyen**, chef du Groupe Chimie, **Delphine Lagarde**, chef du groupe Biologie moléculaire, **Laurent Fourage**, chef du groupe Évolution dirigée, **Jean-Marie Sonet**, directeur Business development et **Daniel Dupret**, président directeur général de Protéus*.



D. Dupret

* Protéus SA, 70 allée Graham Bell, 30900 Nîmes.

Tél. : 04 66 70 64 64. Fax : 04 66 70 64 60.

E-mail : info@proteus.fr

www.proteus.fr

E-mails auteurs : flefevre@proteus.fr, gravot@proteus.fr, hknguyen@proteus.fr, lfourage@proteus.fr,

jmsonet@proteus.fr, ddupret@proteus.fr

Chimie fine et biocatalyse

L'apport des biotransformations

Robert Azerad

Summary

Biocatalysis and fine chemistry: the contribution of biotransformations

The considerable development of biocatalytic methods during the recent years and their potential in organic synthesis, due to their selectivity, versatility and simplified access to synthetic difficult reactions are exemplified through recent applications, such as the now classical hydrolytic resolution, the asymmetric formation of C-C bonds or the regio- and stereoselective functionalization of non-activated carbon atoms.

Mots-clés

Bioconversions, biotransformations, enzymes, résolution, synthèse asymétrique.

Key-words

Biocatalysis, biotransformations, enzymes, resolution, asymmetric synthesis.

Les applications de la biocatalyse ont connu ces dernières années un essor considérable, en même temps que le nombre d'activités enzymatiques et d'enzymes répertoriées (plus de 3 000) s'accroissait rapidement [1-8]. Des développements récents dans la modification et la modulation de ces activités, associés à des méthodes de plus en plus performantes de criblage et de sélection ont encore contribué à accroître le nombre et la diversité des enzymes obtenues de sources naturelles. Cependant, beaucoup d'idées préconçues au sujet des enzymes continuent encore à limiter l'utilisation des biocatalyseurs dans le domaine de la chimie : fréquemment, une voie enzymatique est considérée comme l'ultime recours et ne doit être tentée que lorsque tous les schémas de synthèse chimique possibles se révèlent irréalisables, en négligeant ainsi tout le potentiel de la biocatalyse.

Plusieurs avantages sont pourtant à mettre au compte des biocatalyseurs. D'abord leur efficacité qui se traduit par des « turn-overs » élevés et des accélérations de vitesse de réaction souvent supérieures à 10^8 , tout en fonctionnant à température et pression ambiantes. Ce dernier point constitue, avec leur fonctionnement dans l'eau comme solvant, un autre de leurs atouts, les désignant comme des acteurs privilégiés d'une chimie douce, économe en énergie. Toutes les réactions connues de la synthèse organique, à quelques exceptions près, ont leur contrepartie enzymatique. Une autre de leurs qualités, la sélectivité, représente, sous toutes ses formes (chimio-, régio-, et stéréosélectivité), une caractéristique remarquable et essentielle pour leur utilisation en synthèse organique, tout en limitant la formation de produits secondaires et en simplifiant les opérations de purification. Cela contribue aussi à classer les biocatalyseurs comme des acteurs importants d'une « chimie verte », respectueuse de l'environnement. Leur sélectivité, et particulièrement leur stéréosélectivité, représente à elle seule un atout essentiel dans une chimie fine de plus en plus sollicitée par la synthèse de molécules chirales, et où la précision réactionnelle

devient de plus en plus un facteur important de rentabilité et de productivité.

Nous reprendrons dans cette revue quelques exemples d'application des biocatalyseurs dans le domaine de la chimie fine, en essayant de montrer leur versatilité et leur potentiel, encore sous-employés, mais aussi leurs limitations et les raisons qui peuvent contribuer à limiter leur usage plus général en synthèse organique, en complément et parfois en concurrence avec les grandes réactions de la chimie organique conventionnelle.

Les formes d'application des biocatalyseurs

Les enzymes, sous forme de réactifs purs ou purifiés, ont paru dès le début comme un mode privilégié d'utilisation de la biocatalyse. Les plus utilisées sont rassemblées dans le *tableau I*. Ces biocatalyseurs peuvent présenter cependant quelques inconvénients parmi lesquels leur manque de stabilité et leur coût qui ont pu paraître rédhibitoires pour certaines applications. A ces inconvénients ont répondu les

Tableau I - Principales activités enzymatiques utilisées en synthèse organique.

Enzymes	Réactions catalysées
Estérases, lipases	Hydrolyse ou formation d'esters
Amidases (acylases, protéases)	Hydrolyse ou formation d'amides
Déshydrogénases	Oxydoréduction d'alcools et de cétones
Aldolases, transcétolases	Réactions d'aldolisation (création de liaisons C-C)
Oxydases (mono- et dioxygénases)	Réactions d'oxydation (époxydation, hydroxylation)
Peroxydases	Oxydation, hydroxylation, halohydratation
Époxydes hydrolases	Hydrolyse d'époxydes
Transaminases	Synthèses d'acides aminés et de liaisons C-N
Glycosyltransférases	Formation de liaisons glycosidiques
Oxynitrilases	Formation de cyanhydrines
Nitrilases et nitriles hydratases	Hydrolyse de nitriles
Isomérases	Isomérisations



Figure 1 - Cultures de microorganismes (champignons filamenteux) à l'échelle analytique (= screening =) ou en mini-farmenteur pour utilisation en bioconversion.

techniques d'immobilisation contribuant à la stabilisation des enzymes dans leurs conditions d'utilisation et leur récupération éventuelle pour réutilisation. D'autres formes de biocatalyseurs, les micro-organismes entiers par exemple (figure 1), considérés comme des sacs à enzymes, ont pu également être utilisés mais avec réticence, malgré leur coût peu élevé, et seulement dans les cas où l'enzyme purifiée était inaccessible, en raison de la possibilité d'existence de réactions non souhaitées. Les progrès de la biologie moléculaire permettent actuellement dans la plupart des cas de trancher ce dilemme, grâce au clonage sélectif de l'activité considérée et sa surexpression éventuelle dans un micro-organisme hôte bien choisi pour sa facilité de culture et sa neutralité vis-à-vis de la réaction considérée. On réunit ainsi les avantages précédemment évoqués dans une forme d'utilisation souple et pratique, dont le coût modéré ne nécessite pas une réutilisation. La recombinaison dans des souches génétiquement bien caractérisées facilite en outre des développements ultérieurs permettant la modification ou la modulation de l'activité enzymatique, via des techniques de mutagenèse ou d'évolution dirigée, conduisant ainsi à des enzymes mieux adaptées aux exigences industrielles. Un exemple significatif est celui des enzymes provenant de micro-organismes extrémophiles (thermophiles par exemple), impossibles à cultiver dans des conditions industrielles, mais dont les enzymes utiles ont pu être transférées et exprimées, avec leurs propriétés natives ou modifiées, dans des micro-organismes facilement cultivables.

Un autre avantage de l'utilisation des micro-organismes entiers réside dans l'intégration des fonctions d'utilisation et de régénération des coenzymes à l'intérieur de la cellule, rendant ainsi transparent ce couplage dans des conditions de fonctionnement souvent supérieures à celles d'un couplage d'enzymes artificiellement réalisé en solution (voir plus loin pour les réductions ou les hydroxylations).

L'une des caractéristiques des systèmes enzymatiques, leur fonctionnement en milieu aqueux, peut représenter un handicap pour le chimiste organicien, dont les molécules sont le plus souvent uniquement solubles en solvant organique. Un certain nombre d'enzymes peuvent en fait fonctionner en milieu organique, sans modification majeure de leurs propriétés de sélectivité, pourvu qu'un minimum de molécules d'eau (quelques centaines) indispensables au maintien de la structure protéique restent présentes. Ce fonctionnement en milieu non aqueux permet aussi la

déviations de l'activité enzymatique vers l'attaque de nucléophiles alternatifs, et donc l'obtention de réactions non observées en milieu aqueux.

Une autre des limitations des biocatalyseurs, celle-ci plus importante, réside dans la modestie des concentrations en substrats habituellement tolérées : alors que la réaction chimique fonctionne généralement au-dessus de concentrations molaires en substrats, de telles concentrations sont rarement atteintes dans l'utilisation d'un biocatalyseur, le plus généralement cantonné à des concentrations de 10 à 100 millimolaires.

La sélectivité des biocatalyseurs et ses applications

Une extrême sélectivité est l'une des caractéristiques principales et intrinsèques de l'activité enzymatique, tant qu'elle s'exerce sur l'un des substrats naturels vis-à-vis desquels elle a évolué. Un des aspects importants de la recherche en biocatalyse, mettant en jeu des méthodes élaborées de criblage et d'optimisation, est de déterminer dans quelle mesure on peut conserver au maximum ces propriétés de sélectivité lorsque l'on s'adresse à des substrats non naturels, souvent très différents. Le biocatalyseur idéal pour le chimiste serait celui qui présenterait le minimum de sélectivité de substrat, tout en conservant toutes ses propriétés de chimio-, régio- et stéréosélectivité.

Cette condition est rarement réalisée : seules les lipases, utilisées pour le dédoublement d'acides ou d'alcools dans des réactions d'hydrolyse, d'estérification ou de transestérification, sont capables d'accommoder une très large variété de familles de substrats dont les structures peuvent être très différentes (schéma 1). Pour cette raison, grâce à la disponibilité commerciale de nombreuses lipases et à la simplicité des réactions mises en jeu, ces réactions sont les plus

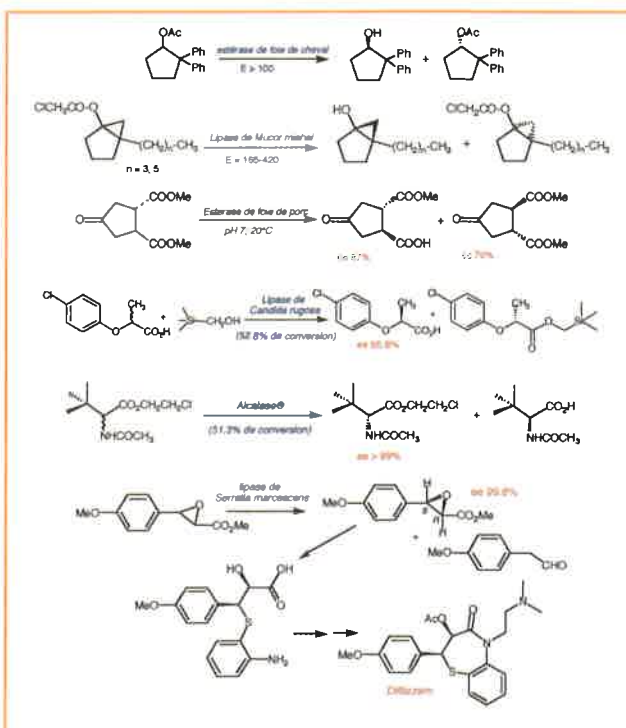


Schéma 1.

utilisées et sont déjà couramment entrées dans la pratique de la synthèse asymétrique [9], avec la possibilité d'optimiser facilement, en fonction des paramètres enzymatiques, le résultat d'un dédoublement cinétique.

Si le dédoublement reste la méthode de choix lorsque l'obtention de chacun des énantiomères est souhaitable (cas des auxiliaires chiraux par exemple), il est parfois préférable de réaliser la préparation exclusive d'un seul des énantiomères, avec un rendement si possible quantitatif par rapport au substrat racémique. Diverses techniques combinant une réaction d'isomérisation par voie chimique ou enzymatique du substrat avec la réaction de dédoublement (la résolution cinétique dynamique [10]) le permettent, dans un certain nombre de cas où la stéréochimie du substrat est manipulable dans des conditions compatibles avec la réaction de dédoublement (schéma 2).

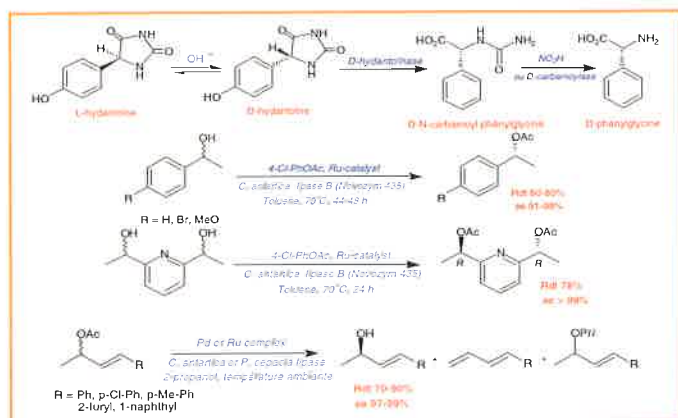


Schéma 2.

Un des exemples de réaction de dédoublement récemment développée est celle catalysée par les époxyde-hydrolases de micro-organismes. Cette réaction peut être utilisée à grande échelle, en concurrence avec les réactions maintenant classiques de Sharpless ou Jacobsen-Katzuki, tout en évitant l'emploi de catalyseurs métalliques coûteux, pour obtenir des époxydes énantiomères fonctionnalisés mono- ou polysubstitués, qui représentent des synthons ou des intermédiaires de synthèse polyvalents et recherchés. De plus, elle permet la génération de diols vicinaux de haute pureté optique, parfois avec un rendement quantitatif en un seul des diols possibles, dans des réactions mettant en œuvre une combinaison de réactions chimio-enzymatiques [11] ou la stéréosélectivité différente et énantioconvergente d'enzymes issues de souches différentes de micro-organismes [12], comme montré dans le schéma 3.

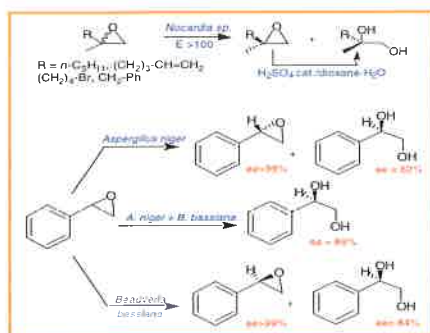


Schéma 3.

Une autre méthode d'accès à une configuration unique est la création directe d'un centre carboné asymétrique, possédant la stéréochimie souhaitée, en utilisant par exemple une hydrolase pour désymétriser un diester prochiral et le transformer en un synthon asymétrique potentiel [2]: de nombreux exemples de cette réaction simple et très efficace ont été décrits aussi bien pour la désymétrisation de diacides que pour celle de diols [5]. Quelques exemples en sont donnés dans le schéma 4. Le dernier d'entre eux participe à une stratégie de synthèse d'un agent antifongique à large spectre.

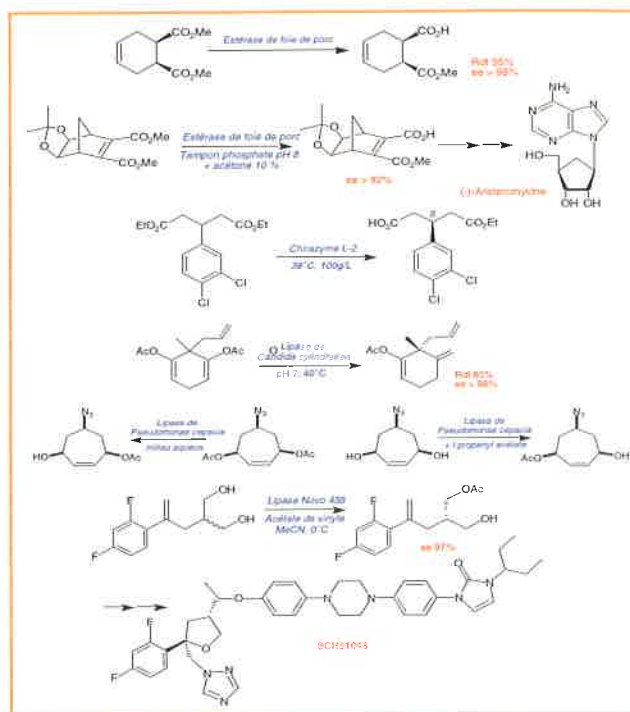


Schéma 4.

D'autres exemples de création de centres carbonés asymétriques sont fournis par la réduction de composés carbonyles, catalysée par des déshydrogénases. Le problème rencontré alors est celui de la fourniture économique des équivalents réducteurs, nécessitant généralement un coenzyme réduit (NADH ou NADPH), d'un coût élevé, et dont l'usage ne peut être que catalytique. Il faut alors coupler la réduction par ce coenzyme avec une réaction complémentaire assurant la régénération du coenzyme réduit. Bien que des alternatives chimiques ou électrochimiques aient été envisagées et parfois employées avec succès, la meilleure méthode de régénération reste une méthode enzymatique, utilisant une seconde enzyme et un co-substrat dont le produit est facilement éliminable, assurant la viabilité thermodynamique du système. Malgré des progrès récents obtenus grâce à des manipulations génétiques, permettant par exemple à une formate déshydrogénase recombinante bactérienne d'assurer la régénération du NADPH (le coenzyme le plus habituellement utilisé par les réductases) de manière aussi efficace que celle du NADH, il y a encore peu de réalisations industrielles correspondant à ces réactions; deux exemples en sont donnés dans le schéma 5.

Afin de pallier à ces contraintes inhérentes à l'utilisation d'enzymes pures ou purifiées, des micro-organismes entiers, et en particulier la levure de boulangerie

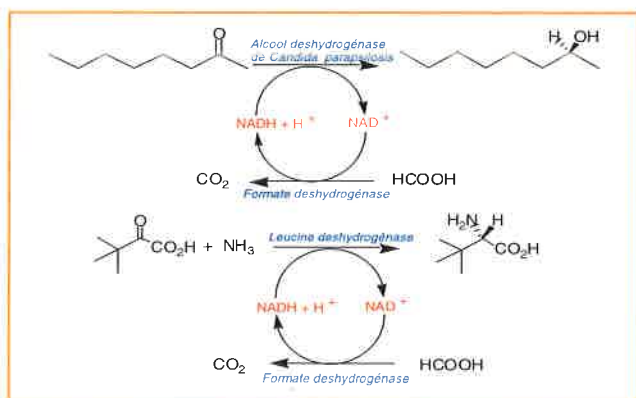


Schéma 5.

(*Saccharomyces cerevisiae*) sous sa forme compressée commerciale, peuvent assurer la bioréduction et la régénération du coenzyme d'une manière transparente à l'utilisateur, les équivalents réducteurs étant apportés par un substrat fermentescible tel que le saccharose. Cette méthode est couramment employée pour la réduction de cétones très diverses, simples ou fonctionnalisées, et permet la production d'alcools secondaires de configuration bien définie, pouvant être différente suivant le micro-organisme utilisé (bactérie, levure, ou champignon filamenteux) et souvent avec une stéréospécificité élevée. Un exemple significatif est celui des β-cétoesters cycliques racémiques (schéma 6) où la stéréospécificité de la réduction est combinée à l'énantioselectivité par rapport à un substrat facilement racémisable pour conduire à un dédoublement cinétique dynamique du substrat et à la production exclusive d'un seul des stéréoisomères possibles, différent suivant le micro-organisme utilisé [13-14]. On a là une contrepartie exacte, parfois complémentaire, de l'hydrogénation catalytique asymétrique des mêmes cétoesters. Un modèle opérationnel de « site actif » de la déshydrogénase de levure responsable de cette réaction a pu être construit pour rendre compte de l'ensemble des résultats observés (figure 2) et constituer ainsi un modèle prédictif. Certaines des déshydrogénases responsables de ces réductions ont été récemment clonées et surexprimées chez *E. coli* [15] et permettent donc une utilisation sélective, tout en profitant pleinement des avantages apportés par la régénération endogène des coenzymes en cellule entière. Une autre manière de tirer parti du potentiel enzymatique des cellules entières de micro-organismes est la « stéréoinversion » [10, 16], une réaction encore mal expliquée, mettant probablement en jeu le fonctionnement simultané de plusieurs oxydoréductases pour produire soit la déracémisation

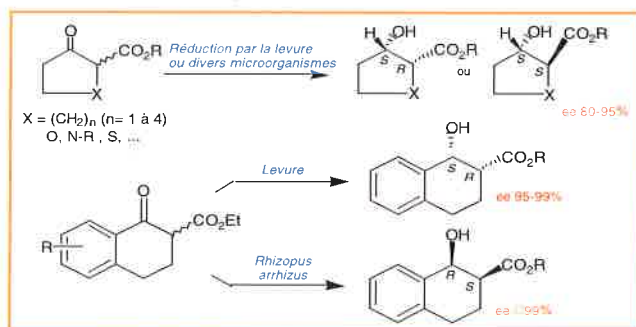


Schéma 6.

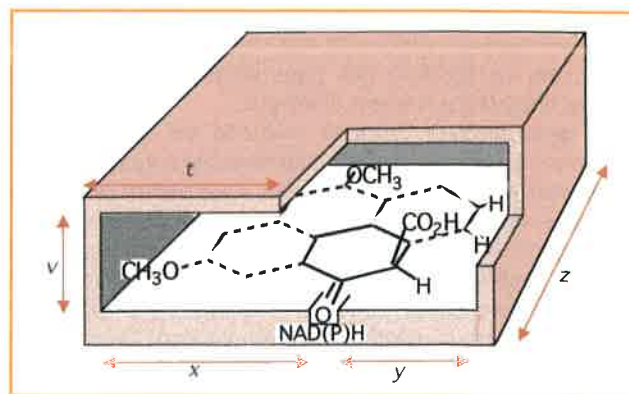


Figure 2 - Modèle schématisique prédictif élaboré pour la réduction stéréospécifique des tétralones carboxyesters par la levure de boulangerie [14].

La projection d'une molécule composite, correspondant à différents substrats β-cétoesters mono- et bicycliques a été visualisée dans le modèle, défini par les distances suivantes, correspondant aux limites van der Waals des atomes du substrat : $y = 5,5$, $x \geq 8,5$, $y = 5$, $z \geq 9,5$, et $7,5 < t < 8,5$ Å.

complète d'un alcool secondaire, soit l'interconversion d'un énantiomère en l'énantiomère opposé comme illustré dans les exemples du schéma 7.

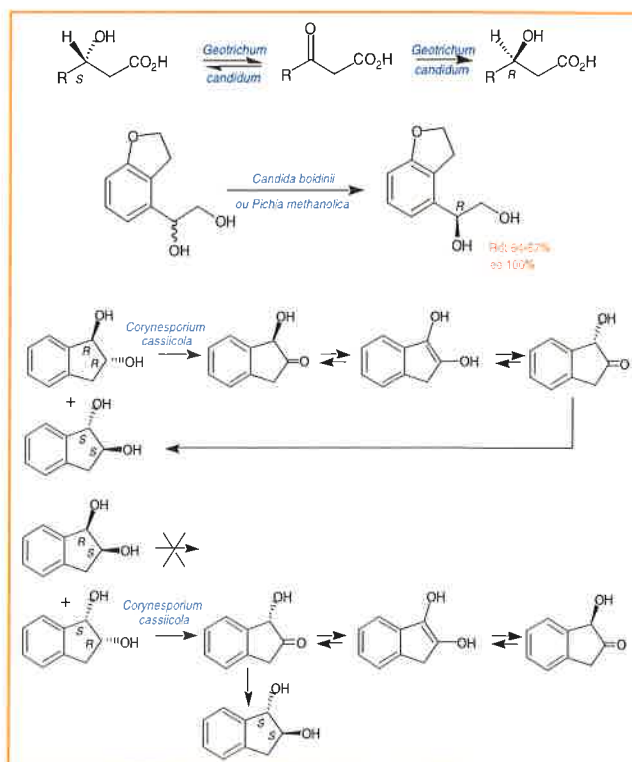


Schéma 7.

En matière de régiosélectivité et de sélectivité de groupe fonctionnel, de nombreuses applications ont été décrites parmi lesquelles certaines conduisant à des réactions de désymétrisation, déjà évoquées plus haut. On citera aussi des réactions visant à la protection ou la déprotection sélective d'aminoacides en vue de la synthèse peptidique (schéma 8), éventuellement associées à un dédoublement dans le cas d'aminoacides non naturels racémiques (exemple des dérivés d'acide glutamique). Le second exemple illustre la synthèse enzymatique de l'aspartame,

Les réactions difficiles de la synthèse organique

Nous avons déjà évoqué plus haut l'intérêt des biocatalyseurs dans les réactions de protection-déprotection. Des méthodes spécifiques pour la mise en œuvre de groupes protecteurs alternatifs, éliminables en conditions enzymatiques douces et orthogonales par rapport aux méthodes classiques, ont été développées [18], y compris pour la synthèse supportée [19]. Une autre des caractéristiques des réactions biocatalysées est de rendre souvent inutiles de telles protections, qui contribuent à alourdir considérablement les stratégies de synthèse, particulièrement dans le domaine de la synthèse des peptides ou celle de sucres. Un bon exemple est celui de la synthèse d'oligosaccharides ou de glycoconjugués dans lesquels l'utilisation raisonnée de glycosidases, de transglycosidases ou de glycosyltransférases peut permettre des synthèses directement à partir des unités de sucres nus ou activés, sans aucune nécessité de protection sélective (schéma 10), y compris avec de nombreux analogues non naturels. Les glycosidases (ou les transglycosidases) catalysent des réactions équilibrées et montrent moins de régiosélectivité que les glycosyltransférases qui, par ailleurs, exigent un donneur de glycosyle sous la forme d'un nucléotidyl-sucre, dont on peut envisager la régénération par l'intermédiaire de systèmes enzymatiques couplés.

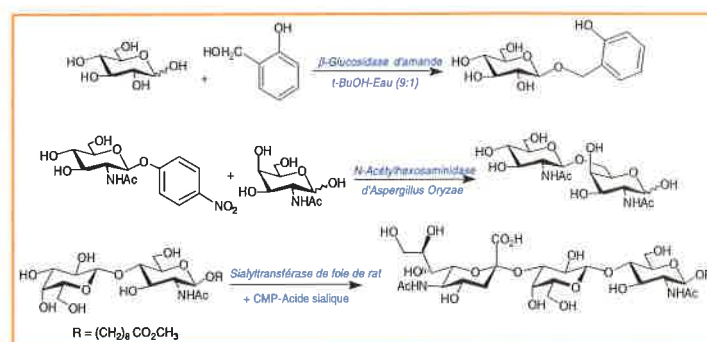


Schéma 10.

Les réactions d'oxygénation, particulièrement quand elles s'adressent à des molécules ne contenant que des carbones non activés, constituent une des réactions les plus difficiles de la synthèse organique, surtout si on souhaite les effectuer avec un maximum de régio- et de stéréosélectivité. Les mono- et dioxygénases réalisent ces réactions d'une manière très générale et très efficace. Les mono-oxygénases, des enzymes de détoxification, fonctionnalisent les molécules organiques pour les rendre plus hydrophiles ; communes chez les micro-organismes comme chez les organismes supérieurs, elles effectuent l'introduction d'un seul des atomes de la molécule d'oxygène dans des réactions d'époxydation, d'hydroxylation, de N- ou S-oxydation ainsi que des réactions de Baeyer-Villiger, le plus souvent avec une bonne régio- et énantiosélectivité [20-21]. Les réactions du schéma 11 illustrent quelques unes de ces réactions, généralement réalisées à l'aide de micro-organismes variés, parfois recombinants, afin de bénéficier de l'ensemble de la machinerie enzymatique nécessaire au fonctionnement de ces enzymes.

Les dioxygénases, qui incorporent à un substrat aromatique ou insaturé les deux atomes de la molécule d'oxygène, sont

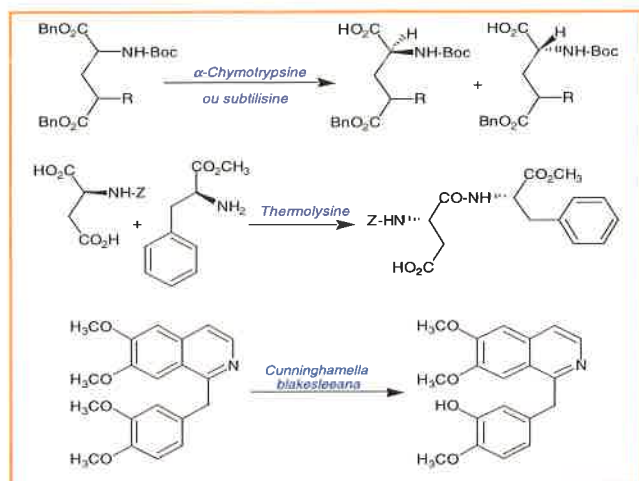


Schéma 8.

dans laquelle la régiosélectivité de la thermolysine rend inutile la protection sélective de l'un des carboxyles de l'aspartate. D'autres exemples de régiosélectivité se rencontrent dans des réactions mettant en jeu une mono-oxygénase comme la déméthylation sélective de la papavérine.

On ne peut terminer ce tour d'horizon sur la sélectivité des biocatalyseurs sans évoquer leur potentiel dans la création asymétrique de liaisons carbone-carbone. Des réactions déjà anciennes telles que celle des oxynitrilases permettent l'accès à des cyanhydrines de configurations opposées, précieux intermédiaires de synthèse, en utilisant des enzymes d'origines végétales différentes, clonées et surexprimées dans divers micro-organismes. Ces enzymes acceptent comme substrats une grande variété d'aldéhydes et de cétones comme illustré dans les quelques exemples du schéma 9. Des techniques de contrôle du pH, ou de réaction en solvant organique et en transhydrocyanation, ont été développées pour déplacer l'équilibre vers la formation quantitative de cyanhydrine ou éviter l'utilisation de HCN [17]. D'autres exemples aussi significatifs de création asymétrique de liaison C-C seront évoqués dans l'article suivant (L. Hecquet *et al.*).

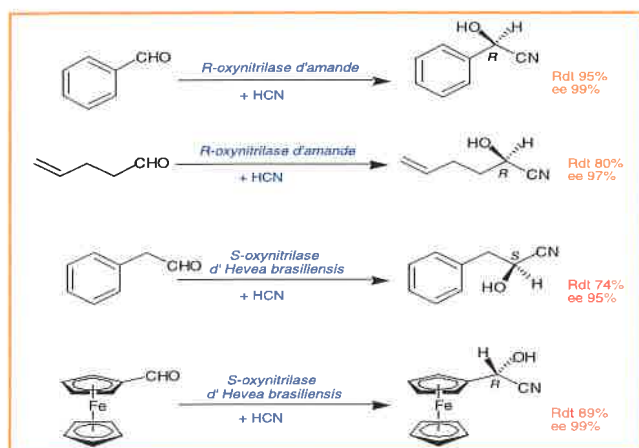


Schéma 9.

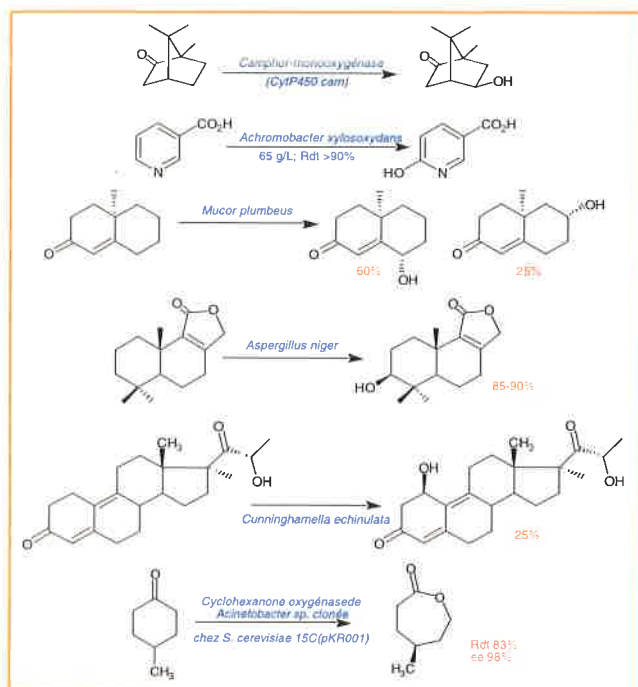


Schéma 11.

également des biocatalyseurs présents chez beaucoup de micro-organismes et d'un grand intérêt dans la production de synthons dihydroxylés asymétriques [22] comme décrit dans le schéma 12. Enfin, d'autres métalloprotéines, les peroxydases, laccases et chloroperoxydases, sont également utilisables dans diverses réactions d'oxydation comparables aux précédentes.

L'ensemble des réactions ainsi évoquées, et particulièrement les plus élaborées d'entre elles, comme celles des monoxygénases par exemple, en raison de leur versatilité et de la variété des produits obtenus grâce à la biodiversité enzymatique et microbienne, ont introduit l'idée d'une « chimie biocombinatoire », complémentaire de la chimie combinatoire, en mettant en jeu des réactions unitaires nouvelles ou connues sur des substrats complexes, naturels ou synthétiques [20, 23-24], en vue d'accroître la diversité moléculaire accessible à l'expérimentation dans les domaines de la pharmacie et de l'agrochimie.

Nous avons ainsi brossé à grands traits un panorama simplifié de la biocatalyse telle qu'elle est actuellement pratiquée, souvent avec un grand succès, comme partie intégrante des méthodes de la synthèse organique. Nous avons pour cela dû laisser de côté des pans entiers d'une discipline jeune, en plein développement, aussi bien sous ses aspects chimiques que dans ses approches plus

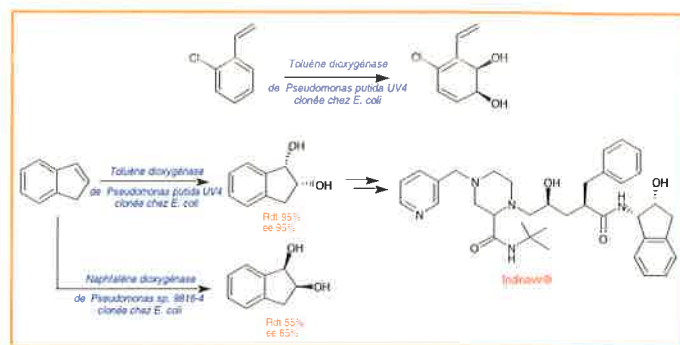


Schéma 12.

biologiques, les plus prometteuses, celles qui permettent pour l'avenir d'envisager la « fabrication » sur mesure des enzymes souhaitées, par la simple manipulation d'enzymes existantes.

Références

- [1] Wong C.-H., Whitesides G.W., *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry, Tetrahedron Org. Chem. Series*, vol. 12, J.E. Baldwin, P.D. Magnus éd., Elsevier, Oxford, 1994.
- [2] Azerad R., *Bull. Soc. Chim.*, 1995, 132, p. 17.
- [3] Drauz K., Waldmann H., *Enzyme catalysis in organic synthesis. A comprehensive handbook*, VCH, Weinheim, 1995.
- [4] Faber K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1997.
- [5] Johnson C.R., *Acc. Chem. Res.*, 1998, 31, p. 333.
- [6] Fessner W.-D., *Biocatalysis - From Discovery to Applications, Topics in Current Chemistry*, vol. 200, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1999.
- [7] Patel R., *Stereoselective Biocatalysis*, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [8] Griengl H., *Biocatalysis*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2000.
- [9] Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J., *Hydrolases in Organic Synthesis. Regio- and Stereoselective Transformations*, Wiley-VCH, Weinheim-New York, 1999.
- [10] Azerad R., Buisson D., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, 11, p. 565.
- [11] Kroutil W., Faber K., *Stereoselective Biocatalysis*, R. Patel, éd., Marcel Dekker, New York, 2000, p. 205.
- [12] Archelas A., Furstoss R., *Biocatalysis-From Discovery to Applications*, W.-D. Fessner, éd., Springer-Verlag, Berlin, 1999, p. 159.
- [13] Azerad R., Buisson D., *Microbial reagents in Organic Synthesis, NATO Advanced Research Workshop*, S. Servi, éd., Kluwer Acad. Pub., Dordrecht, 1992, p. 421.
- [14] Abalain C., Buisson D., Azerad R., *Tetrahedron: Asymmetry*, 1996, 7, p. 2983.
- [15] Rodriguez S., Schroeder K.T., Kayser M.M., Stewart J.D., *J. Org. Chem.*, 2000, 65, p. 2586.
- [16] Carnell A.J., *Adv. Biochem Engin/Biotechnol (Biotransformations)*, K. Faber, éd., Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1999, p. 58.
- [17] Schmidt M., Griengl H., *Biocatalysis. From discovery to applications*, W.-D. Fessner, éd., Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2000, p. 193.
- [18] Kadereit D., Kuhlman J., Waldmann H., *ChemBioChem*, 2000, 1, p. 144.
- [19] Reents R., Jeyaraj D.A., Waldmann H., *Adv. Synth. Catal.*, 2001, 343, p. 501.
- [20] Azerad R., *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol. (Biotransformations)*, K. Faber, T. Scheper, éd., Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1999, p. 169.
- [21] Holland H.L., Weber H.K., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, 11, p. 547.
- [22] Hudlicky T., Gonzalez D., Gibson D.T., *Aldrichimica Acta*, 1999, 32, p. 35.
- [23] Krstenansky J.L., Khmel'nitsky Y., *Biorg. Med. Chem.*, 1999, 7, p. 2157.
- [24] Azerad R., *Stereoselective Biocatalysis*, R. Patel, éd., Marcel Dekker, New York, 2000, p. 153.



Robert Azerad

est directeur de recherche CNRS au Laboratoire de chimie et biochimie pharmacologiques et toxicologiques de l'université René Descartes*.

* Laboratoire de chimie et biochimie pharmacologiques et toxicologiques, UMR 8601, Université René Descartes-Paris V, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris.
Tél. : 01 42 86 21 71/21 70. Fax : 01 42 86 83 87.
E-mail : azerad@biomedicale.univ-paris5.fr
<http://www.biomedicale.univ-paris5.fr/umr8601/>

Les enzymes pour la formation stéréospécifique de la liaison carbone-carbone

Laurence Hecquet, Colette Demuyne et Jean Bolte

Summary

Enzymes in the stereospecific formation of carbone-carbone bound

The high regio- and stereoselectivity and catalytic efficiency make enzymes especially useful for the synthesis of complex, highly functionalized molecules. This paper presents the main families of enzymes (aldolases, transferases or TPP ligases) used for the synthesis of monosaccharide analogues and related structures.

Mots-clés

Enzymes, aldolases, transcétolase, décarboxylases, déshydrogénases, synthèses chimio-enzymatiques, monosaccharides.

Key-words

Enzymes, aldolases, transketolase, decarboxylases, dehydrogenases, chemo-enzymatic synthesis, monosaccharides.

Le contrôle de la configuration des centres asymétriques créés lors de la synthèse des molécules est un objectif majeur en chimie organique. Parmi les avantages souvent cités des enzymes par rapport à d'autres catalyseurs (régiosélectivité, conditions douces de réaction...), la stéréospécificité est la qualité principale qui les fera rechercher lors de la création des liaisons carbone-carbone. Toutes les enzymes qui interviennent lors de la biosynthèse des produits naturels sont susceptibles d'être utilisables. Cependant, à ce jour, seul un petit nombre d'entre elles a fait l'objet d'applications.

Pour être utilisable en synthèse organique, une enzyme doit répondre à certains critères : elle doit présenter une grande spécificité dans la réaction qu'elle catalyse, mais accepter un grand nombre de substrats ; il vaut mieux qu'elle ne dépende pas d'un coenzyme difficile à fournir, tel que le phosphoénolpyruvate (PEP), l'adénosine triphosphate (ATP), ou l'acétyl-coenzyme A ; mais surtout, il faut qu'elle soit accessible en grande quantité. La difficulté à remplir ces conditions a retardé l'étude de beaucoup d'enzymes *a priori* intéressantes, notamment celles qui interviennent dans le métabolisme secondaire pour la biosynthèse des terpènes, stéroïdes, alcaloïdes et certains antibiotiques. Dans les toutes dernières années cependant, grâce à la banalisation des techniques de biologie moléculaire, de nouvelles enzymes apparaissent dans les synthèses : le clonage d'un gène permet d'accéder à l'enzyme en abondance, et les techniques de mutagenèse permettent d'étendre son champ d'application ou d'augmenter sa stabilité, y compris en présence de solvants organiques.

C'est dans la chimie des sucres, où la multifonctionnalité des molécules constitue un défi majeur, que les enzymes ont été le plus utilisées pour la formation de liaisons C-C. Elles catalysent des réactions d'addition nucléophile sur des aldéhydes. Ce sont souvent des aldolases, appartenant à la classe des lyases, des transférases ou des ligases à pyrophosphate de thiamine. Dans cette mini revue, destinée

à sensibiliser les chimistes organiciens à l'intérêt des enzymes en synthèse, nous ne parlerons que de ces enzymes [1].

Les DHAP aldolases [1]

Les aldolases catalysent l'addition d'une cétone (le donneur), ici le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) sur un aldéhyde (l'accepteur). On classe les aldolases en deux groupes selon leur mécanisme d'action. Les aldolases de classe I, trouvées principalement chez les animaux et les plantes, activent le donneur en formant un intermédiaire covalent du type base de Schiff. Les aldolases de classe II contiennent dans le site actif un ion Zn^{++} qui va faciliter la formation d'un énolate sur le donneur (figure 1).

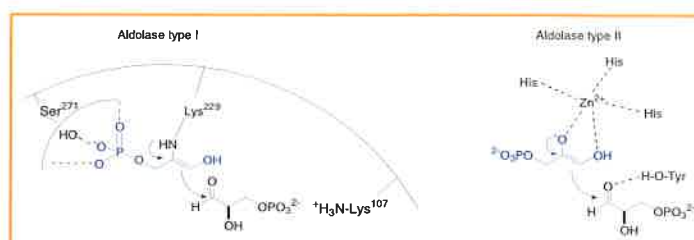


Figure 1 - Mécanisme d'action des aldolases de type I et II.

La DHAP aldolase la plus étudiée est la fructose-1,6-diphosphate aldolase (FDP aldolase). Elle intervient dans la glycolyse, où elle scinde le fructose diphosphate en deux unités à trois carbones, le dihydroxyacétone phosphate et le glycéraldéhyde phosphate, dans une réaction équilibrée. *In vitro*, l'équilibre est déplacé dans le sens de la condensation et l'enzyme contrôle la formation de la liaison C₃-C₄, avec la stéréochimie 3*S*,4*R*. Trois autres stéréoisomères sont susceptibles de se former lors de cette condensation, et

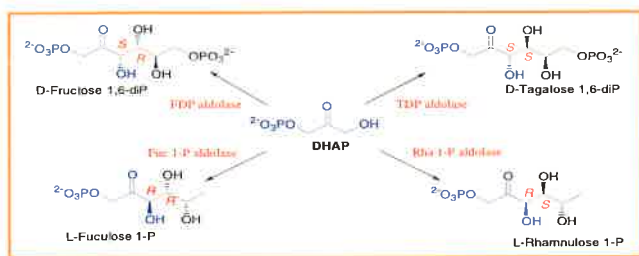


Figure 2 - Stéréospécificité des DHAP aldolases.

il existe une aldolase spécifique pour chaque configuration (figure 2).

La FDP aldolase commerciale est extraite du muscle de lapin et est souvent appelée RAMA (pour rabbit muscle aldolase) à l'instigation de G.M. Whitesides qui a signé en 1983, avec C.-H. Wong, les premiers articles démontrant l'intérêt synthétique de cette enzyme [2]. Ils ont montré que, si elle était relativement spécifique du substrat donneur, n'acceptant que de proches analogues du DHAP, elle acceptait en revanche de nombreux aldéhydes comme accepteurs.

Depuis lors, de très nombreux travaux ont été publiés sur la synthèse de composés plus ou moins liés aux sucres, où une réaction enzymatique (catalysée par la RAMA) constitue l'étape clef qui détermine la stéréochimie (figure 3).

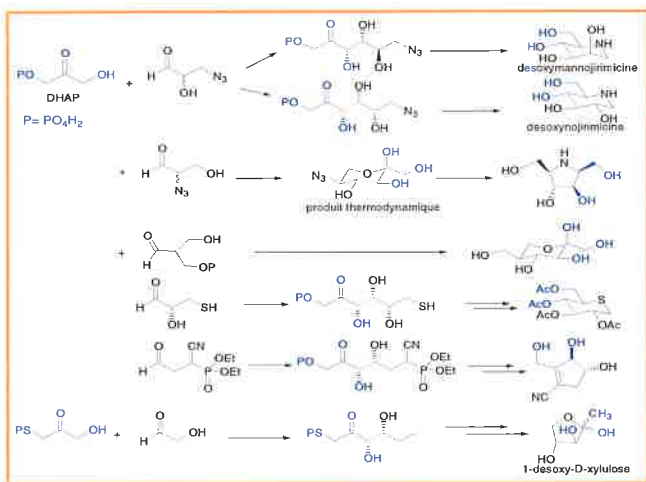


Figure 3 - Synthèses catalysées par la FDP aldolase.

D'autres FDP aldolases d'origine végétale ou microbienne ont été également proposées. La plus prometteuse est extraite de *Streptomyces carnosus* (voir encadré 1). Deux autres DHAP aldolases, la rhamnULOse-1-phosphate et la fucose-1-phosphate aldolase ont aussi fait l'objet de travaux. Ces aldolases d'origine microbienne sont difficiles à produire à partir des souches sauvages, de sorte que leur utilisation n'a vraiment commencé qu'après qu'elles aient été clonées et surexprimées.

Pour utiliser ces enzymes, il faut disposer du DHAP. Or ce composé, très instable, doit être préparé au laboratoire au moment de son utilisation. Depuis la synthèse originale de Colbran en 1967, différentes améliorations ont été proposées. Nous avons nous-mêmes proposé une méthode à partir de la dibromoacétone. Il est aussi possible d'accéder au DHAP par une méthode enzymatique où le L-glycérol phosphate est oxydé en DHAP par la glycérOL phosphate oxydase.

Encadré 1

La fructose-1,6-bisphosphate aldolase du muscle de lapin (RAMA pour « rabbit muscle aldolase ») et celle de *Streptomyces carnosus*

De très nombreuses synthèses ont été réalisées avec la RAMA. Cependant, la relative instabilité de cette enzyme et son intolérance à l'ajout de co-solvants organiques s'opposent à son utilisation pour des applications à grande échelle. Dans cet objectif, l'enzyme de choix pourrait être l'aldolase de *Streptomyces carnosus*. Bien que d'origine bactérienne, cette enzyme est une aldolase de classe I, comme la RAMA. Elle présente des caractéristiques voisines de cette dernière en termes de stéréospécificité et de spécificité de substrat, mais montre une exceptionnelle stabilité dans les conditions habituelles de synthèse. Le gène de la fructose-1,6-bisphosphate aldolase de *S. carnosus* a été cloné dans *Escherichia coli*. La souche recombinante surexprime l'aldolase d'un facteur 50 par rapport à *S. carnosus*. L'aldolase représente alors 25 % des protéines totales. Dans ces conditions, l'enzyme est facilement purifiée et un fermenteur de 10 litres permet de produire environ 30 000 unités, soit la quantité suffisante pour transformer 14,6 kg de fructose-1,6-bisphosphate par jour. (Zannetti M.T., Walter C., Knorst M., Fessner W.-D., *Chem. Eur. J.*, 1999, 5, p. 1882).

Quelques exemples de composés obtenus grâce à une DHAP aldolase sont présentés dans la figure 4. Parmi eux, on trouve de nombreux iminocyclitols, recherchés comme inhibiteurs de glycosidases ou glycosyltransférases, enzymes impliquées dans diverses pathologies. Ces travaux ont été initiés par F. Effenberger et C.-H. Wong qui, en 1990 et 1991 respectivement, ont publié les premiers articles sur la synthèse de la déoxynojirimycine et la déoxymannojirimycine, montrant que les DHAP aldolases offraient une des voies d'accès les plus efficaces vers ce type de composés.

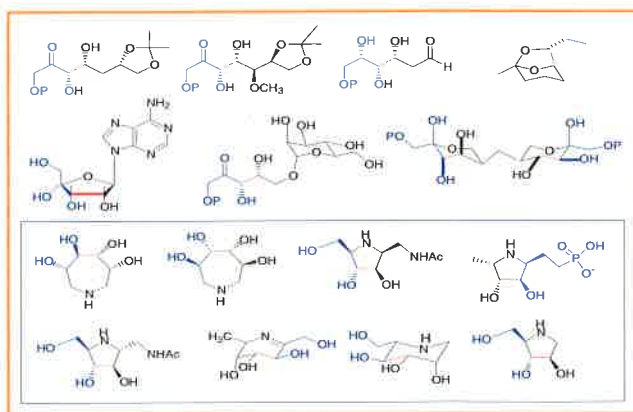


Figure 4 - Composés obtenus par utilisation d'une DHAP aldolase. Sont indiquées en bleu la sous-structure provenant du DHAP et en rouge, la liaison formée enzymatiquement.

Les pyruvate aldolases [3]

Les pyruvate aldolases (figure 5) ont été utilisées pour la synthèse d'α-cétoacides du type acide 2-oxo-3-déoxysulonique (heptulosonique, DAH ; octulosonique, KDO ; nonulosonique, KDN ; ou acide N-acétylneuraminique, acide sialique). Ces enzymes fonctionnent *in vivo* dans le sens de la dégradation, alors que les phosphoenolpyruvate aldolases (classe des ligases) qui conduisent aux mêmes composés sont impliquées dans leur biosynthèse. Présentant une

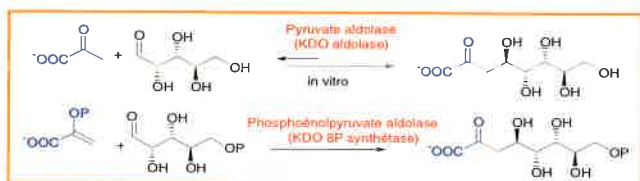


Figure 5 - Réactions d'aldolisation mettant en jeu le pyruvate.

spécificité de substrat plus étroite, ces dernières sont moins utilisées.

La N-acétylneuraminique acide aldolase (acide sialique aldolase), commerciale, a été la première étudiée. Comme la plupart des aldolases, elle est très spécifique pour le substrat donneur (ici le pyruvate) et accepte un assez grand nombre d'aldéhydes. La première synthèse enzymatique de l'acide sialique a été réalisée par S. David et C. Augé en 1984. D'autres synthèses ainsi que celles d'analogues ont été publiées [4] (figure 6). Curieusement, la stéréospécificité de cette enzyme dépend du substrat aldéhydique : lorsque celui-ci présente en C3 la configuration S du substrat naturel, l'attaque du carbonyle se fait sur la face *si*, conduisant à un nouveau centre asymétrique de configuration S ; alors que dans le cas inverse, l'attaque se fait sur la face *re*.

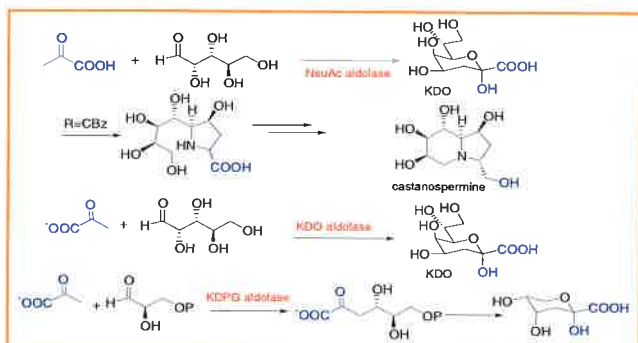


Figure 6 - Réactions catalysées par les pyruvate aldolases.

La KDO aldolase conduit à des acides ulosoniques de configuration 4*R*, par réaction avec son substrat naturel, le D-arabinose, mais aussi le D-ribose, le D-xylose, le D-lyxose, le L-arabinose (figure 6). Des cellules entières d'*Aspergillus terreus* ont été aussi utilisées à des fins préparatives. La KDPG aldolase qui possède la même stéréospécificité pour la création du nouveau centre asymétrique en C4 a également été proposée en synthèse organique.

Les enzymes à pyrophosphate de thiamine [9]

Les enzymes à pyrophosphate de thiamine (ThDP), telles que les α -cétoacide décarboxylases, la première sous-unité (E1) des complexes α -cétoacide déshydrogénase, les transcétolases, l'acétolactate synthase, catalysent à la fois la coupure et la formation de liaisons C-C.

Dans le sens de la condensation, ces réactions sont l'équivalent biologique des réactions de couplage d'aldéhydes catalysées par les sels de thiazolium. Le carbanion issu de la déprotonation du ThDP s'additionne sur le groupe carbonyle d'un α -cétoacide (décarboxylases, transcétolase), ou d'un cétoal (transcétolase). Le carbanion formé après coupure de la liaison C-C peut se protoner (ce

qui conduira à un aldéhyde (réaction de décarboxylation), être transféré sur une autre sous-unité (ce qui conduira ultérieurement à un acide - cas des complexes α -cétoacide déshydrogénase), ou s'additionner à un aldéhyde pour conduire à un cétoal (ce qui est la réaction recherchée) (figure 7).

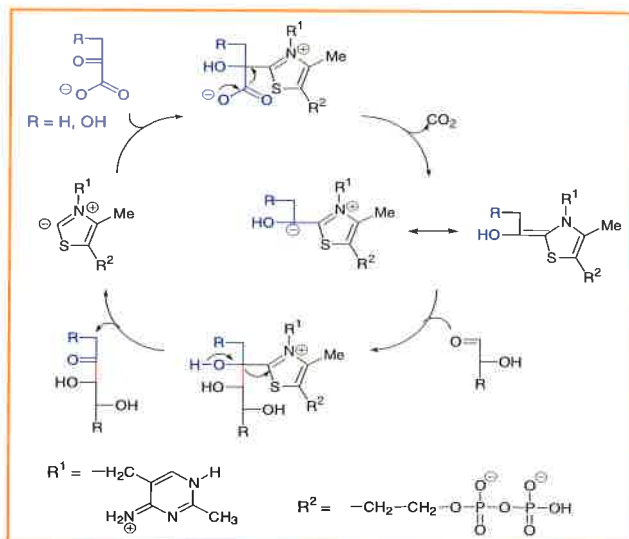


Figure 7 - Réaction catalysée par les enzymes à pyrophosphate de thiamine.

Il est intéressant de remarquer que pour les décarboxylases, la protonation du cétoal est la réaction biologique « normale », et la formation du cétoal apparaît comme une réaction parasite (elles sont donc classées parmi les lyases puis qu'il y a rupture d'une liaison C-C) ; alors que pour la transcétolase, bien qu'elle accepte comme substrat un α -cétoacide qui est décarboxylé (l'hydroxy-pyruvate), la rupture de la liaison C-C est suivie de la formation d'une nouvelle liaison C-C de sorte qu'elle est classée comme une transférase.

La transcétolase (TK)

Cette enzyme a fait l'objet de nombreuses applications au cours des quinze dernières années. Bien que son activité vis-à-vis de substrats non naturels (aldoses non phosphorylés) ait été indiquée dès 1955, nous avons proposé les premiers son utilisation pour la synthèse à l'échelle préparative de cétoles et analogues [7]. Nous avons souvent utilisé pour les synthèses l'enzyme extraite d'épinards, facile à isoler. L'enzyme de levure a aussi été utilisée, nous avons commencé à la produire au laboratoire après qu'elle ait été surexprimée. La transcétolase de *E. coli* a été également surexprimée et utilisée pour des applications synthétiques. La transcétolase catalyse le transfert d'un groupement hydroxyacétyle, provenant soit de l'hydroxypyruvate, soit d'un cétole, sur un α -hydroxyaldéhyde de configuration 2*R* (*in vivo* l'érythrose-4-phosphate), et conduit à des cétoles présentant la configuration 3*S*,4*R* qui est celle du fructose. Bien qu'elle conduise à des composés de même stéréochimie que la FDP aldolase, la transcétolase offre une alternative intéressante : pour accéder à un cétole donné à *n* carbones, la FDP aldolase demandera un aldéhyde à (*n*-3) carbones, et la TK un substrat à (*n*-2). En fonction de la facilité d'accès à ces aldéhydes et de l'activité des enzymes vis-à-vis de ces substrats particuliers, l'une ou l'autre des solutions sera préférée [8] (figure 8).

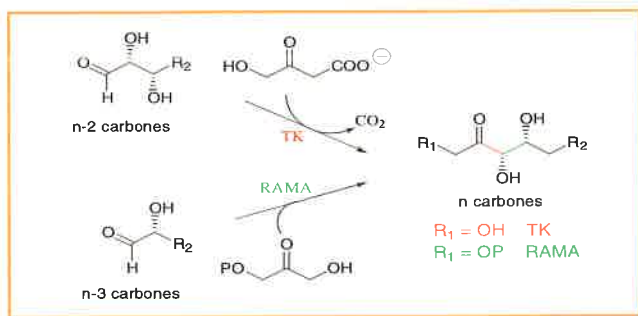


Figure 8 - Complémentarité de la transcétolase et de la fructose-1,6-diphosphate aldolase.

Quelques synthèses réalisées grâce à la TK sont reportées dans la figure 9. Pour ces synthèses, l'hydroxypyruvate est presque toujours utilisé de préférence à un cétose puisque la réaction devient alors irréversible. L'enzyme est énantiosélective vis-à-vis de l' α -hydroxyaldéhyde accepteur qui peut donc être fourni sous forme racémique et subir un dédoublement cinétique.

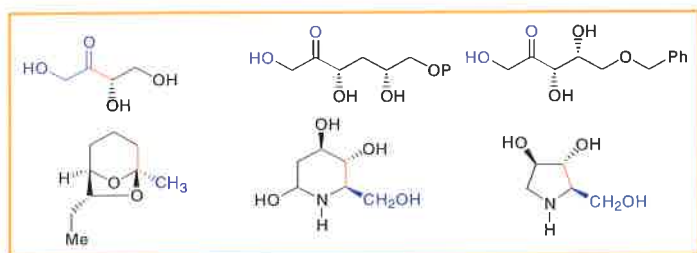


Figure 9 - Quelques exemples de composés synthétisés grâce à la transcétolase (TK).

Les α -cétoacides décarboxylases et déshydrogénases [6b]

La pyruvate décarboxylase a été l'enzyme la plus étudiée du point de vue synthétique. La formation de (R)-phénylacétylcarbinol à partir de benzaldéhyde et de glucose en présence de levure est une des plus anciennes réactions de bioconversion appliquées dans l'industrie, en l'occurrence pour la synthèse de l'éphédrine (figure 10). Cette réaction est en fait due au transfert d'un groupement acétyle, provenant de pyruvate produit au cours de la fermentation, sur le benzaldéhyde, réaction catalysée par la pyruvate décarboxylase. De nombreux travaux visant à augmenter la production de phénylacétylcarbinol ont été publiés (voir encadré 2). D'autres aldéhydes aromatiques que le benzaldéhyde sont également substrats dans cette réaction

Explorer la biodiversité pour trouver de nouveaux catalyseurs

Le développement des méthodes de criblage pour trouver de nouveaux micro-organismes, la banalisation des techniques de biologie moléculaire qui facilitent la production d'enzymes peu (ou pas) exprimées chez certains organismes, ou présentant une faible activité spécifique, ainsi que les avancées sur la connaissance du génome de différentes espèces vont permettre à de nouvelles enzymes d'émerger comme catalyseurs utiles en synthèse organique.

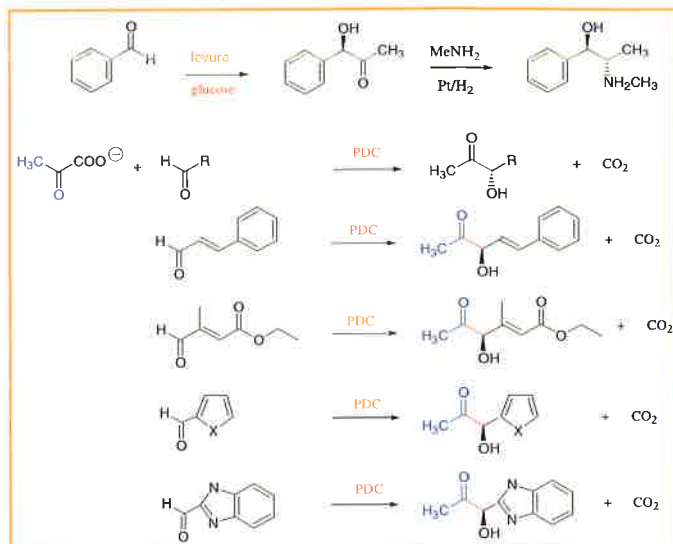


Figure 10 - Exemples de réactions catalysées par la pyruvate décarboxylase.

Encadré 2

L'amélioration de la synthèse du (R)-phénylacétylcarbinol, précurseur de l'éphédrine, par mutagenèse dirigée de la pyruvate décarboxylase (PDC) de *Zymomonas mobilis*

La levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*) a été largement utilisée pour catalyser cette réaction. Cependant, la présence d'autres enzymes, et notamment d'alcool déshydrogénases dans la levure, conduit à la formation de sous-produits indésirables. L'utilisation de PDC purifiée présente donc un avantage. La PDC a été isolée de nombreuses sources : levures, champignons, bactéries ou plantes. L'enzyme de *Zymomonas mobilis* offre beaucoup d'avantages en termes de stabilité et d'activité. Cependant, elle est moins performante que celle de *S. cerevisiae* pour l'activité ligase. Une étude comparée des structures des deux enzymes a montré que le site 392 est occupé par une alanine dans la PDC de *S. cerevisiae* et par un tryptophane dans celle de *Z. mobilis*. La mutation du résidu tryptophane 392 par une alanine ou une isoleucine augmente d'un facteur 4 l'activité carboligase, sans diminuer l'activité catalytique de l'enzyme ni sa stabilité. (Idin H., Siebert P., Mesch K, Pohl. M., *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1385, p. 307).

Deux exemples très récents de la littérature nous paraissent représentatifs (figure 11).

Il y a quelques années, les groupes de M. Rohmer et H. Sahm ont montré que le 1-désoxyxylulose-5-phosphate

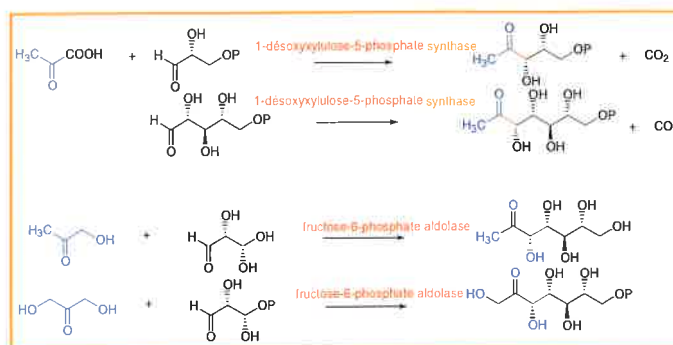
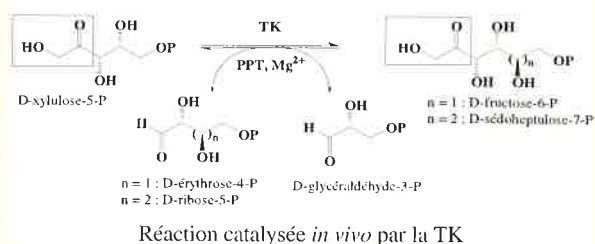
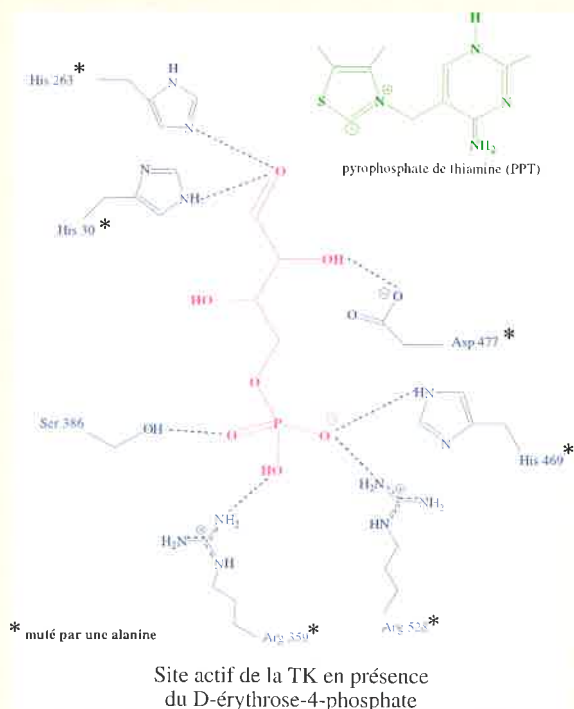


Figure 11 - Nouvelles possibilités offertes par les enzymes, désoxyxylulose phosphate synthase et fructose-6-phosphate aldolase.

Encadré 3

Mutagénèse dirigée sur la transcétolase : étude du site actif



La TK a été co-cristallisée avec un substrat accepteur, le D-érythrose-4-phosphate. Les données cristallographiques et les études réalisées par mutagénèse dirigée ont permis d'établir des interactions entre le site actif et ce substrat. Les constantes cinétiques ont été déterminées en présence de l'enzyme sauvage et des enzymes mutées par une alanine dans les positions indiquées*. Dans le cas de l'Asp 477, les études indiquent que cet acide aminé contrôle l'énantiosélectivité vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés (R). De plus, les résidus qui interagissent avec le groupement phosphate confèrent au site actif une certaine flexibilité : les substrats à 2 ou 3 carbones seront stabilisés par la Ser 386 et l'His 469, les substrats à 4 carbones ou plus par les résidus Arg 359 et surtout Arg 528.

(Nilsson U., Hecquet L., Gefflaut T., Guérard C., Schneider G., *FEBS Lett.*, **1998**, 424, p. 49 ; Hecquet L., Demuyneck C., Schneider G., Bolte J., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2001**, 11, p. 207).

était le précurseur de l'isopentényl pyrophosphate chez plusieurs organismes qui n'utilisaient donc pas la voie de l'acide mévalonique [9]. En étudiant cette nouvelle voie, G.A. Sprenger et son équipe ont détecté chez *E. coli* une nouvelle enzyme qui catalyse la formation de 1-désoxy-cétoses (dont le 1-désoxyxylulose-5-phosphate), à partir du pyruvate et d'un aldose. Cette synthétase est une enzyme à thiamine pyrophosphate et suit un mécanisme identique à celui de la transcétolase [10].

Plus récemment, la même équipe a repéré dans le génome de *E. coli* une séquence non exprimée et présentant une importante analogie avec le gène de la transaldolase. Ayant cloné et exprimé ce gène, ils ont mis en évidence une nouvelle activité enzymatique, de type fructose-6-phosphate aldolase, qui permet la condensation réversible de la dihydroxyacétone sur le glycéraldéhyde-3-phosphate. L'étude de cette enzyme est en cours, elle pourrait devenir un sérieux concurrent de la FDP aldolase [11].

Augmenter la spécificité de substrat d'une enzyme par mutagénèse [12]

L'établissement de la structure cristalline d'une enzyme permet de connaître tous les acides aminés présents dans le site actif, et donc d'avancer une hypothèse sur leur rôle dans la formation du complexe enzyme-substrat et dans la réaction elle-même. Le remplacement par mutagénèse dirigée d'un résidu particulier par un autre est maintenant devenu une opération quasi routinière en biologie moléculaire. Il est alors possible par cette technique de tenter de modifier la nature de la réaction catalysée, la stéréospécificité de la réaction, ou la spécificité du substrat.

La transcétolase de levure, avec laquelle nous travaillons, a été cristallisée et sa structure déterminée par G. Schneider et

coll. Dans cette structure, il apparaît que le résidu Asp 477 pouvait être lié au groupe hydroxyle en position 2 de l'aldéhyde accepteur et donc être responsable de l'énantiosélectivité de l'enzyme pour les substrats de configuration 2R (encadré 3). La suppression de cette interaction pouvait alors permettre à l'enzyme d'accepter aussi des substrats de configuration 2S et donc de catalyser la synthèse de cétoses de configuration 3S,4S (configuration du tagatose). La mutation de l'Asp 477 en Ala a été réalisée, et a confirmé notre hypothèse. L'enzyme a effectivement perdu son énantiosélectivité, mais son efficacité a été diminuée d'un facteur 100, ce qui limite beaucoup son intérêt pour des applications synthétiques.

Une telle perte d'activité est très souvent observée lors des expériences de mutagénèse dirigée. La raison est que la mutation, si elle a bien la conséquence recherchée, entraîne aussi d'autres modifications difficiles à prévoir et qui ont un effet négatif sur la catalyse. En fait, la plupart des modifications qui entraînent une amélioration de l'efficacité de l'enzyme dans une application particulière ont été obtenues par mutagénèse aléatoire par la méthode dite d'évolution dirigée [12]. Dans cette technique, une mutagénèse aléatoire concernant 1 ou 2 nucléotides est effectuée *in vitro* sur le gène de l'enzyme. Les gènes mutés étant introduits dans des cellules de *E. coli*, on obtient une banque de clones qui vont exprimer la protéine modifiée. On effectue sur cette banque un criblage qui permet de retenir la souche qui exprime l'enzyme présentant l'activité enzymatique recherchée. Ce mutant va être soumis à un nouveau cycle de mutation, et ainsi de suite jusqu'à obtenir une activité enzymatique satisfaisante.

Cette méthode est performante si l'on dispose d'un crible efficace pour sélectionner les clones recherchés parmi plusieurs dizaines de milliers qui sont obtenus à

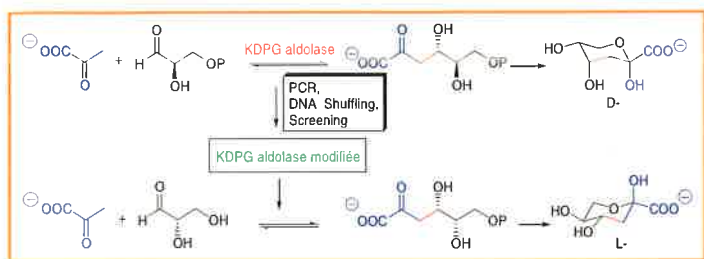


Figure 12 – Inversion de l'énantiosélectivité de la KDPG aldolase par évolution dirigée.

chaque génération. Elle a été récemment appliquée à une pyruvate aldolase [13], la 2-oxo-3-déoxy-D-phosphogluconate aldolase (KDPG aldolase) qui est très spécifique du D-glyceraldéhyde phosphate et, après mutation, accepte le L-glyceraldéhyde, conduisant ainsi à des sucres de la série L (figure 12).

Conclusion

Au cours des 20 dernières années, les enzymes sont apparues comme l'un des outils incontournables de la synthèse organique pour l'obtention de molécules chirales, et des résultats très importants ont été acquis pour la formation des liaisons carbone-carbone. Les chimistes ont su exploiter la stéréospécificité des enzymes qui leur étaient accessibles et se sont ingéniés à élargir leur champ d'application en proposant de nouveaux analogues de leurs

substrats naturels. Les avancées les plus spectaculaires ont été liées, non pas tant aux progrès de la biologie moléculaire, qu'à la prise en compte par nos laboratoires des concepts et des techniques développés par cette discipline. On peut penser que de cette interdisciplinarité naîtront des applications nouvelles, non seulement au laboratoire, mais aussi pour des applications industrielles.

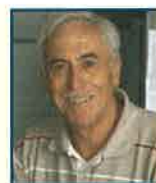
Références

- [1] Revues sur la formation enzymatique de liaisons C-C : a) Machajewski T.D., Wong C.-H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, p. 1352 ; b) Wymer N., Toone E.J., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, *39*, p. 1352.
- [2] Wong C.-H., Whitesides G.M., *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, p. 3199.
- [3] Revue sur les pyruvates aldolases : Augé C., Gautheron-Le Narvor C., *Preparative Carbohydrate Chemistry*, S. Hanessian éd., Dekker New York, **1997**, p. 469.
- [4] Fitz W., Schwark J.R., Wong C.-H., *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, p. 3663 et références citées.
- [5] Henderson D.P., Cotterill I.C., Shelton M.C., Toone E.J., *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, p. 906.
- [6] Revues sur les enzymes à pyrophosphate de thiamine : a) Sprenger G.A., Pohl M., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **1999**, p. 145 ; b) Iding H., Siebert P., Mesch K., Pohl M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, *1385*, p. 307.
- [7] Bolte J., Demuynck C., Samaki H., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, p. 5085.
- [8] André C., Demuynck C., Gefflaut T., Guérard C., Hecquet L., Lemaire M., Bolte J., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **1998**, *5*, p. 113.
- [9] Rohmer M., Seemann M., Horbach S., Bringer-Meyer S., Sahm H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, p. 2564.
- [10] Taylor S.V., Vu L.D., Begley T.P., Schörken U., Grolle S., Sprenger G.A., Bringer-Meyer S., Sahm H., *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, p. 2375.
- [11] Schürmann M., Sprenger G.A., *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, p. 11055.
- [12] Revues sur la mutagenèse et l'évolution dirigée des enzymes : a) Arnold F.E., *Acc. Chem. Res.*, **1998**, *31*, p. 125 ; b) Bornschener V.T., Pohl M., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2001**, *5*, p. 137.
- [13] Fong S., Machajewski T.D., Mak C.C., Wong C.-H., *Chem. Biol.*, **2000**, *7*, p. 873.



L. Hecquet

Laurence Hecquet, Colette Demuynck et Jean Bolte sont professeurs au Laboratoire Synthèse et étude de systèmes à intérêt biologique*.



J. Bolte



C. Demuynck

* Laboratoire Synthèse et étude de systèmes à intérêt biologique, Université Blaise Pascal-CNRS (UMR 6504), 63177 Aubière Cedex.
Tél. : 04 73 40 71 28. Fax : 04 73 40 77 17.
E-mail : jbolte@chisg1.univ-bpclermont.fr

La biocatalyse solide/gaz

Vers une réalité industrielle

Sylvain Lamare, Karine Roule-Woiry, Isabelle Goubet, Thierry Maugard et Marie Dominique Legoy

Summary

Solid/gas biocatalysis: towards industrial application

Solid/gas biocatalysis appears today as a promising technology for the development of new industrial processes. The use of enzymes or whole cells at the solid/gas interface allows: an important minimization of energetic costs compared to the concurrent liquid processes, a very important reduction of volume during the downstream processes, an important stability of biological catalysts and a very high productivity for minimal plant size.

These advantages result from the ability to control precisely all the thermodynamic parameters influencing the kinetics of the reactions performed, but also the stability of the biocatalysts working in a continuous way at temperatures far higher from the temperatures encountered in nature.

Today, solid/gas biocatalysis is reaching the industrial level for a first application, the production of natural flavoring esters. Nevertheless, others applications are already under development and concern the field of fine chemicals or depollution activities involving isolated enzymes or whole cells.

Mots-clés

Solide/gaz, biocatalyse, procédé, enzyme, cellule.

Key-words

Solid/gas, biocatalysis, process, enzyme, cell.

La nature offre très peu d'exemples de transformations enzymatiques mettant en jeu des substrats gazeux. Citons par exemple l'hydrogénase, dont le substrat naturel est l'hydrogène gazeux. Cette enzyme qui réalise la conversion du p-H₂ en o-H₂ fut étudiée par Yagi et coll. en 1969 [1].

Cependant, au cours des 15 dernières années, l'utilisation de la biocatalyse solide/gaz (enzymes isolées ou cellules mortes) pour le développement d'applications biotechnologiques a connu un engouement et fait l'objet de plusieurs publications [2-6]. Les principaux travaux concernent l'utilisation de lipases ou d'estérases pour la modification ou la synthèse d'esters [7-9], ainsi que l'utilisation d'alcool oxydases ou d'alcool déshydrogénases pour des réactions d'oxydations ou d'oxydo-réduction [10-12].

Des applications relatives à la dépollution d'effluents gazeux ont aussi été développées, telles que la dégradation du trichloréthylène [13] ou l'élimination de phénols [14].

Alors que la faisabilité technique concernant l'utilisation d'un catalyseur biologique à l'interface solide/gaz a été démontrée avec succès, ces recherches sont restées dans leur très grande majorité au stade de développement au laboratoire. Aujourd'hui, la biocatalyse solide/gaz connaît un nouvel essor, avec le développement d'un procédé au stade préindustriel permettant d'envisager une application importante de cette technologie dans les secteurs de l'aromatique, de la cosmétique, de la chimie fine et de la dépollution.

La catalyse solide/gaz présente des avantages technologiques importants

Le développement de la biocatalyse en milieu « non conventionnel » a étendu d'une façon très importante le

champ d'applications des enzymes et des cellules entraînant, en parallèle, le développement de nouveaux bioprocédés. Les systèmes utilisant des biocatalyseurs dans des milieux très concentrés, en présence ou non de solvants organiques, l'utilisation des fluides supercritiques ou la biotransformation des phases gazeuses ont permis de s'affranchir de problèmes relatifs aux milieux aqueux comme la solubilité des composés apolaires ou la modification des contraintes thermodynamiques, tout en accroissant significativement les caractères de stabilité des catalyseurs, dans la majorité des cas, par un contrôle de la solvatation des biocatalyseurs [15].

Cependant, le caractère multiphasique de la plupart de ces milieux constitue souvent un frein à la productivité de ces systèmes, en raison des contraintes diffusionnelles existant entre des phases liquides et solides de polarités différentes. Concernant la biocatalyse solide/gaz, bon nombre de ces problèmes peuvent être évités et les principaux avantages de cette technologie peuvent être résumés ainsi :

- La phase solide étant constituée par le biocatalyseur, les étapes de fixation ou d'immobilisation ne s'avèrent pas indispensables. La récupération du catalyseur est aussi beaucoup plus aisée, qu'il s'agisse de réaction menée en « cuvée » ou en réacteur continu.
- Comparativement à un système solide/liquide, les transferts de masse sont très importants en raison de la diffusion très élevée et de la très faible viscosité des phases gazeuses.
- La phase gazeuse étant composée des substrats et produits purs et d'un gaz vecteur, l'utilisation de tout autre composé (tel que solvant pour pallier d'éventuels problèmes de solubilité) devient alors caduque. Les traitements en aval lors de la récupération du produit sont simplifiés et la quantité de sous-produits est minimisée. De plus, l'utilisation

des substrats purs évite tout risque de toxicité ou de contamination des produits par une tierce molécule.

- L'utilisation de la catalyse solide/gaz est synonyme de température plus importante d'où il résulte une diminution des risques de contamination microbienne des réacteurs.

- Enfin, le dimensionnement à plus grande échelle est largement facilité pour ce type de procédé faisant appel à une phase circulante gazeuse.

Mais l'avantage majeur de ce système tient au fait que l'activité thermodynamique de chaque composé présent dans la phase gazeuse peut être contrôlée de façon indépendante. Ce contrôle thermodynamique permet non seulement une maîtrise des cinétiques réactionnelles, mais représente aussi un facteur clé dans la stabilisation des activités catalytiques biologiques au sein de ces systèmes [9].

Une première application à l'échelle industrielle : la synthèse d'esters naturels à propriété d'arôme

Les esters constituent une classe importante dans les composés à propriété d'arôme. Les esters linéaires sont dans leur grande majorité responsables des notes florales et fruitées et sont utilisés de façon importante en agroalimentaire et en parfumerie. De nombreuses molécules d'intérêt économique comme les esters d'acides acétique, propionique, butyrique et iso-butyrique sont très facilement produits par synthèse chimique, dès lors que le caractère naturel de la molécule n'est pas recherché. Le cas des substances aromatisantes naturelles est alors différent puisque leur obtention est très souvent le fruit de procédés d'extraction (dépendant de variations saisonnières, climatiques et/ou géographiques) ou le résultat de procédés de fermentation dans lesquels la récupération des produits constitue souvent le point critique.

Un procédé biotechnologique enzymatique offre alors une alternative intéressante pour la production de ces molécules naturelles s'il permet de minimiser les coûts en se rapprochant de ceux d'un procédé de chimie industrielle.

Le principe de fonctionnement d'un système solide/gaz, schématisé *figure 1*, est relativement simple.

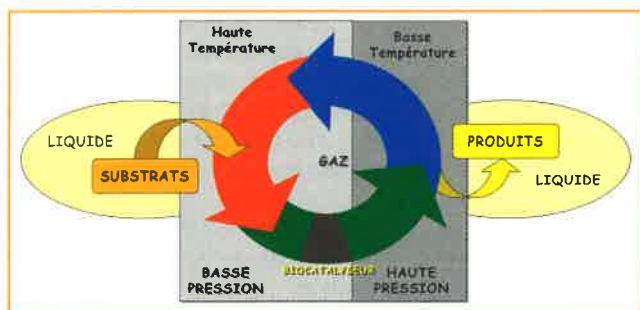


Figure 1 - Schéma de principe de fonctionnement d'un réacteur solide/gaz.

Un ballast de gaz neutre (azote) mis en rotation passe par une zone en dépression à haute température, traverse un réacteur de type lit fixe avant de rentrer dans une zone à haute pression et à basse température. La température et la dépression servent à créer le gaz à transformer sur le lit

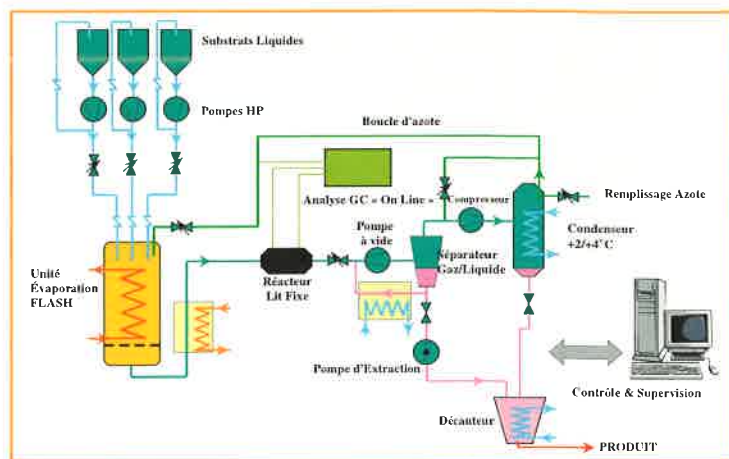


Figure 2 - Représentation schématique de l'installation solide/gaz de taille pré-industrielle.

Tableau I - Spécifications techniques de l'unité pré-industrielle de catalyse solide/gaz.

Gamme de pression absolue en fonctionnement	10 matm à 1,3 atm
Puissance maximale de l'unité « flash » (chaud)	13 kW
Puissance maximale de condensation (froid)	20 kW
Charge catalytique admissible	0,5 à 6 kg de Novozym 435
Débit gazeux maximum	100 m ³ /h à P _a = 10 matm
	200 m ³ /h à P _a > 30 matm
Plage du contrôle en température	30 - 120 °C
Charge en azote en fonctionnement	0,700 m ³
Charge organique admissible de la phase gazeuse	80 % (W/W)
Temps de séjour moyen en réacteur	0,1 à 0,3 seconde
Productivité (production ester)	2 à 5 kg/h de produit pur

catalytique en réalisant la vaporisation des molécules à traiter dans la boucle d'azote circulante. A cette fin, des molécules liquides substrats sont injectées à ce niveau et mélangées au gaz vecteur. Une fois créé, le gaz est alors remis en température avant son introduction dans le réacteur proprement dit. En sortie de réacteur, le gaz contenant les produits est comprimé et refroidi afin de récupérer les produits par condensation. Enfin, l'azote épuré est recyclé et réintroduit en tête de procédé.

C'est donc sur ce concept qu'un procédé continu d'estérification en phase solide/gaz a été développé et breveté [16] pour son application à la production d'esters naturels par estérification directe d'acides et d'alcools naturels catalysée par la lipase industrielle immobilisée (lipase B de *Candida antarctica*), développée par Novo Nordisk sous le nom de Novozym 435.

Les spécifications techniques de l'installation réalisée (*figure 2*) sont présentées dans le *tableau I*. Cette installation représente un changement d'échelle d'un facteur 1 000 par rapport à l'installation de type laboratoire (*figure 3*), et tous les paramètres opératoires ont pu être reproduits aisément à cette échelle tels que les vitesses linéaires de gaz, les pertes de charges sur le lit catalytique et les conditions opératoires (pression, température et débits). Cette relative facilité de changement d'échelle a permis de développer une stratégie pour une optimisation rapide des différentes réactions d'estérification ciblées (*figure 4*), et leur transfert du laboratoire à l'échelle pré-industrielle. A titre d'exemple des



Figure 3 - Réacteur solide/gaz de laboratoire.

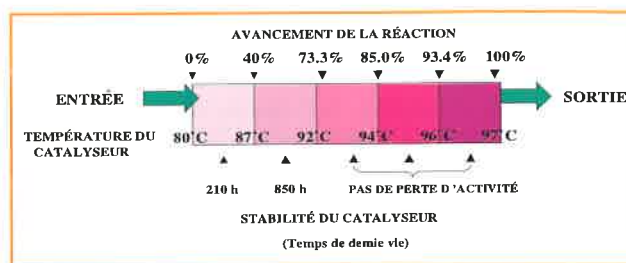


Figure 5 - Évolution de la stabilité du catalyseur et de sa température sur 5 tranches identiques de catalyseur d'un réacteur lors de la production de propionate d'alkyle. La productivité est fixée à 2 kg/h.

Des études plus poussées ont été effectuées et le comportement du lit catalytique a été modélisé pour les différentes réactions afin de contrôler les paramètres cinétiques et la stabilité du procédé (figure 5).

Aujourd'hui, une vingtaine de synthèses d'esters naturels (C_5 à C_{11}) ont été optimisées et transférées au stade préindustriel pour les acides de C_1 à C_4 , et pour une gamme d'alcools allant de C_1 à C_7 . Les productivités atteintes sont comprises entre 2 et 3 kg d'esters/h x kg de catalyseur, à l'exception d'une classe d'esters dont la vitesse sur l'alcool nécessite deux fois plus de catalyseur.

Le contrôle thermodynamique de tous les paramètres de réaction offert par la technologie solide/gaz (activités des substrats et produits, contrôle de l'hydratation du catalyseur), la méthodologie de développement choisie, et la facilité des opérations de « scaling up » ont alors permis la définition et le démarrage d'un procédé économiquement viable pour la production d'esters naturels à propriété d'arômes.

Vers d'autres applications de la technologie

Si la production d'esters naturels est le premier exemple de l'application à grande échelle de la biocatalyse solide/gaz, de nombreux autres champs d'applications sont aujourd'hui étudiés avec un développement envisageable à court ou moyen terme.

Les lipases offrent un potentiel d'applications important puisqu'elles sont en effet capables de réaliser aussi bien des réactions d'estérification (trans-estérification, acidolyse ou alcoololyse) que d'hydrolyse. De plus, leur spécificité et/ou sélectivité peut être mise à profit dans la production de molécules à haute valeur ajoutée (acylation stéréospécifique ou résolution de mélanges racémiques, d'esters ou d'alcools à chaîne courte à modérément longue). Leur utilisation aisée en catalyse solide/gaz offre donc un champ d'applications potentiellement important.

La biocatalyse solide/gaz ne reste cependant pas synonyme d'utilisation d'enzymes isolées et purifiées. La mise en œuvre de cellules entières en catalyse solide/gaz présente un intérêt particulier, d'une part par l'abaissement des coûts relatifs au catalyseur, d'autre part par la possibilité de coupler plusieurs systèmes enzymatiques en cascade pour des procédés nécessitant plusieurs étapes (cas de la dépollution d'effluents gazeux par exemple).

Le prochain challenge concerne donc la mise en œuvre de cellules entières en catalyse solide/gaz pour n'utiliser qu'une activité enzymatique ciblée ou pour permettre une cascade de réactions.



Figure 4 - Méthodologie d'optimisation rapide des synthèses ciblées pour leur transfert au stade pré-industriel.

performances observées à cette échelle, un taux de conversion en ligne supérieur à 95 % peut être obtenu aisément pour un niveau de productivité fixé à 2 kg/h d'ester et un temps de séjour inférieur à la demi-seconde.

On peut noter l'influence du caractère exothermique de la réaction sur les paramètres thermodynamiques (légère baisse du taux de conversion couplée à l'augmentation de la température de sortie), puisqu'une différence de plus de 15 degrés existe entre les températures d'entrée et de sortie. Lorsqu'un mélange partiellement converti est utilisé en alimentation (64 % de conversion dans cet exemple), alors la différence de température chute brusquement pour se stabiliser à environ 1/3 de la valeur précédente. L'influence thermodynamique est alors visible, et la conversion finale redevient légèrement supérieure (95 %) conformément aux calculs de point d'équilibre.

L'optimisation finale du procédé a donc consisté à prendre en compte le paramètre exothermique de la réaction pour adapter les paramètres opératoires, afin de garantir la stabilité en fonctionnement du catalyseur.

L'utilisation de cellules pour des étapes monoenzymatiques

Une catégorie d'enzymes, les alcools déshydrogénases, présente un intérêt particulier puisqu'elles sont non seulement capables de catalyser des réactions d'oxydoréduction d'alcools primaires ou secondaires avec des spécificités plus ou moins importantes selon leur origine, mais peuvent aussi permettre l'obtention d'énantiomères optiquement purs lors de la réduction de cétones. Elles présentent cependant un inconvénient majeur qui est l'utilisation d'un cofacteur nicotinamide relativement coûteux. Ainsi, l'utilisation de cellules entières utilisées comme sac à enzymes et contenant le cofacteur α -t-elle retenu l'attention des chercheurs souhaitant une régénération *in situ* du cofacteur. Cependant, les systèmes développés ont tous été confrontés au problème de lavage du cofacteur par la phase liquide conduisant à l'arrêt des systèmes catalytiques mis en œuvre.

L'utilisation de la catalyse solide/gaz peut alors apporter une réponse à ce problème, puisque l'entraînement du cofacteur par un gaz circulant est quasi impossible à cause de sa pression de saturation quasi nulle. En 2001, Maugard et coll. ont ainsi pu montrer que la réduction d'aldéhydes en alcools primaires par de la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* pouvait être réalisée en catalyse solide/gaz, avec une régénération efficace du cofacteur (figure 6).

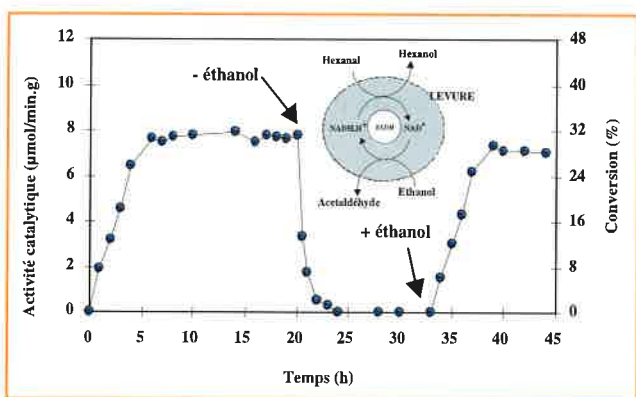


Figure 6 - Mise en évidence de l'efficacité de la régénération du cofacteur en présence d'un co-substrat (éthanol) lors de la réduction d'hexanal catalysée par la levure de boulangerie. La température est de 65 °C, l'activité de l'hexanal est de 0,05, celle de l'éthanol de 0,1 et celle de l'eau de 0,57.

Mais l'oxydation peut aussi s'affranchir de la présence du cofacteur par l'utilisation d'alcools oxydases. L'oxydation d'alcools primaires par des cellules de *Pischia pastoris* a ainsi été réalisée en catalyse solide/gaz [4-5], en association avec d'autres activités enzymatiques (catalase ou peroxydase), permettant un accroissement de stabilité du catalyseur par l'élimination des espèces activées de l'oxygène produites au cours de la réaction.

Ces travaux ont cependant mis en évidence un effet important de la matrice cellulaire dans laquelle est emprisonnée l'enzyme, qui modifie complètement les conditions d'hydratation nécessaires à l'expression de l'activité catalytique recherchée. L'optimisation de ces systèmes doit donc passer maintenant par une meilleure compréhension des effets dus aux macro- et micro-environnements de l'enzyme exprimant l'activité souhaitée.

Plusieurs étapes en cascade peuvent se succéder dans une cellule en catalyse solide/gaz

La possibilité de mener au sein d'une même cellule une cascade de réactions offre un débouché important à la technologie solide/gaz dans le champ des activités de dépollution, et plus particulièrement dans le traitement des effluents gazeux. Suite aux travaux de Hou en 1984, utilisant la méthane monooxygénase d'une bactérie méthanotrophe (*Methylosinus sp* CRL 31) pour la production d'époxydes [17], des tests de dégradation du trichloréthylène par *Methylosinus trichosporium* ont été effectués. Si l'action de la méthane monooxygénase est la seule à s'exprimer, la catalyse donne lieu à la formation soit d'époxyde puis de dichloroacétate, soit d'hydrate de chloral. L'action simultanée de déshydrogénases ou d'autres monooxygénases en cascade permet par contre de dégrader complètement le trichloréthylène, soit en intermédiaires métaboliques, soit en CO_2 et HCl dans le cas d'une dégradation complète (figure 7).

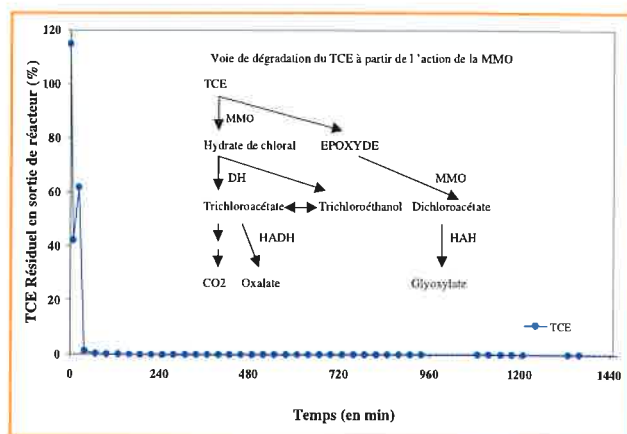


Figure 7 - Élimination de trichloréthylène en catalyse solide/gaz par des cellules lyophilisées de *M. trichosporium*. Un réacteur de 49 mg de cellules lyophilisées est alimenté avec un gaz dont les caractéristiques sont les suivantes : température = 40 °C, $a_{\text{H}_2\text{O}}$ = 0,7, a_{TCE} = 0,1, $a_{\text{méthanol}}$ = 0,1. Débit total = 500 µmoles/min.

Les capacités des cellules lyophilisées de *M. trichosporium* ont alors été testées en catalyse solide/gaz, et la totalité du trichloréthylène présent dans le gaz d'alimentation est éliminée en continu pendant les 24 heures de test. Aucun produit de l'action de la méthane monooxygénase (époxyde ou hydrate de chloral) n'a pu être jusqu'à présent mis en évidence dans le gaz de sortie, traduisant une possible réutilisation par un second (ou plusieurs) système(s) enzymatique(s).

Compte tenu du champ de molécules à éliminer, la réalisation de cascades enzymatiques apparaît vitale pour le développement de biofiltres, et les exemples se multiplient avec l'élimination d'alkanes ou d'organochlorés par des bactéries méthanotrophes, ou l'élimination des phénols par des souches de *Pseudomonas*. Cependant, alors que la faisabilité a été démontrée, l'optimisation et le développement de ces procédés au niveau industriel restent à faire.

On le voit par ces quelques exemples, la biocatalyse solide/gaz permet la mise en œuvre de nombreuses activités enzymatiques très variées, et permet de multiples applications. Cependant, il est important de noter que la technologie ne reste compatible qu'avec des produits

et substrats de masse molaire relativement modérée, c'est-à-dire présentant une volatilité assez importante.

Certaines applications ne nécessitent pas nécessairement l'expression de l'activité catalytique

En marge des applications potentielles de synthèse ou de transformation, l'utilisation de la technologie solide/gaz ouvre le champ au développement d'une nouvelle génération de biocapteurs. Un biocapteur est défini par une partie biologique constituant l'organe de détection, et un transmetteur. S'ils ont été majoritairement étudiés sur des milieux liquides ou semi solides, quelques exemples sont cependant donnés dans la littérature sur des milieux gazeux [8]. La détection du formaldéhyde par une formaldéhyde déshydrogénase recouvrant un cristal piézo-électrique a pu être réalisée avec une sensibilité allant de 1 à 100 ppm. Les détections de pesticides en utilisant l'acétylcholinestérase pour la détection d'un organophosphoré, ou la butyrylcholinestérase pour la détection du malathion ont aussi été réalisées au niveau du ppb. Enfin, des biocapteurs très spécifiques ont été développés en utilisant des anticorps dirigés contre le parathion, ou encore la benzoyle écognine pour la détection de la cocaïne. Comme en témoignent ces exemples, l'adsorption spécifique permettant la réalisation de biocapteurs est possible et de nouvelles applications comme le développement de filtres sélectifs régénérables ou le développement de techniques analytiques telles que la chromatographie d'affinité en phase gazeuse sont envisageables.

Conclusion

Ces systèmes allient performance et productivité importante tout en offrant une relative simplicité de mise en œuvre. La capacité d'un contrôle thermodynamique précis sur chaque constituant du gaz permet une maîtrise aussi bien des paramètres cinétiques que de la stabilité en fonctionnement des catalyseurs biologiques. Pour preuve, il devient possible dans ces systèmes d'utiliser un catalyseur biologique à des températures bien supérieures à celles du monde du vivant malgré la présence d'eau sous forme de vapeur. De plus, les phénomènes de diffusion étant considérablement minimisés, ces réacteurs sont capables de fonctionner avec des temps de séjour 100 à 1 000 fois plus faibles que ceux traditionnellement utilisés dans les procédés liquides à taux de conversion identique.

D'autres améliorations sont encore en développement pour la production de molécules à haute valeur ajoutée. L'utilisation de la stéréospécificité ou de la stéréosélectivité, soit des lipases pour la résolution de mélanges racémiques, soit des alcools déshydrogénases pour la production d'alcools chiraux à partir des cétones correspondantes, doit

permettre d'autres développements à caractère industriel et commercial de la technologie. Enfin, le développement de nouveaux outils d'analyse ou de détection/prévention doit pouvoir tirer parti de ces recherches et connaître de nouvelles réalisations technologiques.

Remerciements

Ce travail a bénéficié des aides de l'ANVAR Poitou-Charentes, du Conseil Régional Poitou-Charentes, de la Communauté d'Agglomérations de La Rochelle et de l'Union Européenne, dans le cadre d'un projet de démonstration BIO CT4 98-0390.

Références

- [1] Yagi T., Tsuda M., Mori Y., Inokuchi H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, *91*, p. 2801.
- [2] Pulvin S., Legoy M.D., Lortie R., Pensa M., Thomas D., *Biotechnol. Lett.*, **1986**, *8*, *11*, p. 783.
- [3] Pulvin S., Parvaresh F., Thomas D., Legoy M.D., *Ann. NY Acad. Sci.*, **1988**, *545*, p. 434.
- [4] Barzana E., Klibanov A., Karel M., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **1987**, *15*, p. 25.
- [5] Barzana E., Klibanov A., Karel M., *Biotechnol. Bioeng.*, **1989**, *34*, p. 1178.
- [6] Duff S., Murray W., *Process Biochemistry*, **1990**, p. 40.
- [7] Parvaresh F., Robert H., Thomas D., Legoy M.D., *Biotechnol. Bioeng.*, **1992**, *39*, p. 467.
- [8] Lamare S., Legoy M.D., *Trends in Biotechnol.*, **1993**, *11*, *10*(117), p. 413.
- [9] Lamare S., Legoy M.D., *Biotechnol. Bioeng.*, **1997**, *57*, p. 1.
- [10] Kim C., Rhee S.-K., *Biotechnol. Lett.*, **1992**, *14*, p. 1059.
- [11] Yang F.X., Russell A.J., *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, *49*, p. 700.
- [12] Maugard T., Lamare S., Legoy M.D., *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, *73*, p. 164.
- [13] Uchiyama H., Oguri K., Yagi O., Kokufuta E., *Biotechnol. Lett.*, **1992**, *14*, p. 619.
- [14] Zilli M., Converti A., Lodi A., Del Borghi M., Ferraiolo G., *Biotechnol. Bioeng.*, **1992**, *41*, p. 693.
- [15] Lamare S., Legoy M.D., *L'Act. Chim.*, **1995**, juin-juillet, p. 33.
- [16] Lamare S., Legoy M.D., International Patent, **1999**, WO 99/04894.
- [17] Hou C., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1984**, *19*, p. 1.



S. Lamare



I. Goubet

Sylvain Lamare, Isabelle Goubet et Thierry Maugard sont maîtres de conférences au Laboratoire de génie protéique*, que dirige **Marie Dominique Legoy. Karine Roule-Woiry** y a effectué sa thèse.



T. Maugard



M.D. Legoy

* Laboratoire de génie protéique et cellulaire, Université de La Rochelle, bâtiment M. Curie, avenue M. Crépeau, 17042 La Rochelle Cedex 1.
Tél. : 05 46 45 82 75.
Fax : 05 46 45 82 47.
E-mail : slamare@univ-lr.fr

Biocatalyse industrielle

Claude Bensoussan

Summary

Industrial biocatalysis

A significant number of industrial processes for the synthesis of fine chemicals, pharmaceutical and agrochemical intermediates utilizes biocatalytic steps. The combination of new molecular biology techniques and process engineering have led to new industrial biocatalysts. We present some examples which are in use in chemical companies.

**Mots-clés
Key-words**

**Biocatalyse, industrie, chimie fine, intermédiaire chiral, synthèse asymétrique.
Biocatalysis, industry, fine chemistry, chiral intermediate, asymmetric synthesis.**

Même si les biochimistes et les microbiologistes ont toujours pensé que la biocatalyse constituerait un domaine d'application prometteur pour la synthèse chimique, les procédés industriels mettant en œuvre des enzymes ou des micro-organismes restaient peu nombreux. Des idées préconçues et un manque de connaissances des enzymes ont fortement contribué à limiter l'utilisation de la biocatalyse dans l'industrie chimique [1]. Trop souvent appliquée en dernier recours alors que toutes les voies chimiques avaient échoué, la biocatalyse était considérée par les chimistes organiciens comme une méthode peu viable.

Ce temps est révolu, principalement grâce aux progrès réalisés ces dernières années en biologie moléculaire. La production d'une enzyme « industrielle », en termes de qualité, quantité et prix, ne constitue plus un problème. Les techniques de biologie moléculaire, l'ingénierie des voies métaboliques et l'évolution moléculaire dirigée ont ouvert la voie à l'utilisation d'enzymes présentant de nouvelles caractéristiques en termes de spécificité de substrat, de sélectivité, de « turnover », de stabilité thermique et de résistance aux solvants [2]. Des systèmes de criblage « haut débit » intelligents ont été conçus [3-4] et des systèmes d'expression efficaces ont été développés pour la production de biocatalyseurs en quantité suffisante pour une application industrielle.

Cet ensemble relayé par une abondante littérature renforce cette envolée et produit un effet « booster » [5-8]. L'industrie chimique voit dans l'utilisation de la biocatalyse un double intérêt : la possibilité d'amélioration de voies de synthèse existantes et l'accès à de nouveaux produits. Si les promesses de la biocatalyse pour la chimie résident majoritairement dans l'accès à des structures moléculaires jusqu'alors difficilement accessibles, l'utilisation de matières premières moins coûteuses et la mise en application de meilleurs procédés restent attractives.

Nous présentons dans cet article des exemples d'applications industrielles de procédés de biocatalyse décrits par quelques sociétés chimiques. Nous avons délibérément soustrait de ces exemples les produits de

commodité chimique pour nous focaliser sur la production de synthons chiraux. Deux exceptions cependant, les productions d'acrylamide et de fructose qui constituent à elles seules, en termes de volume, les productions les plus importantes. Le lecteur souhaitant obtenir plus de renseignements concernant l'accès aux produits de commodités chimiques par biocatalyse, trouvera de nombreuses références dans l'article de Danner et Braun [9].

Exemples de procédés industriels mettant en œuvre la biocatalyse

Les produits de commodité chimique

Production d'acrylamide

La production industrielle d'acrylamide catalysée par une nitrile hydratase (NIH) est réalisée par la société Nitto à l'échelle de 30 000 t/an [10]. Cette production représente à ce jour « le grand exemple » de mise en œuvre d'une enzyme (figure 1a). DuPont a utilisé une approche similaire pour la production de 5-cyanovaléramide, un précurseur d'herbicide [11]. L'hydratation régiosélective de l'adiponitrile en 5-cyanovaléramide catalysée par la NIH de *Pseudomonas chlororaphis* (figure 1a), s'est révélée être un excellent moyen de substitution de la voie chimique dans laquelle l'hydratation était peu sélective et conduisait à l'apparition

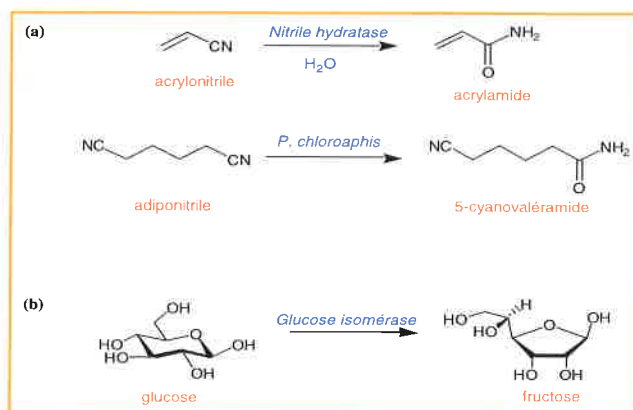


Figure 1 - Produits de commodité chimique obtenus par biocatalyse. (a) acrylamide et 5-cyanovaléramide ; (b) fructose.

Abréviations

NIH : nitrile hydratase

6-APA : acide 6-aminopénicillanique

7-ADCA : acide 7-amino désacétoxy céphalosporanique

de nombreux sous-produits. Cette NIH, une fois immobilisée, a permis de générer, après plus de 50 batch successifs, 12 tonnes de 5-cyanovaléramide avec un rendement de 93 % et une sélectivité de 96 %.

Production du fructose

L'isomérisation du glucose en fructose catalysée par la glucose isomérase est largement utilisée par de nombreuses sociétés sucrières (figure 1b). Le volume total de production de fructose par ce procédé biocatalytique est supérieur à 1 million de t/an et est à ce titre l'exemple phare de la biocatalyse industrielle [12].

Les produits pour la chimie fine

Nous avons extrait de la littérature quelques grands procédés industriels de biocatalyse décrits par des compagnies chimiques, notamment BASF, DSM, Lonza et Zeneca, pour l'accès à des « building blocks » chiraux.

Procédés BASF

Ce groupe a depuis longtemps développé une compétence dans le domaine des biotechnologies, en particulier dans celui de la production d'alcools, d'amines et d'acides hydroxy-carboxyliques chiraux (figure 2a-c).

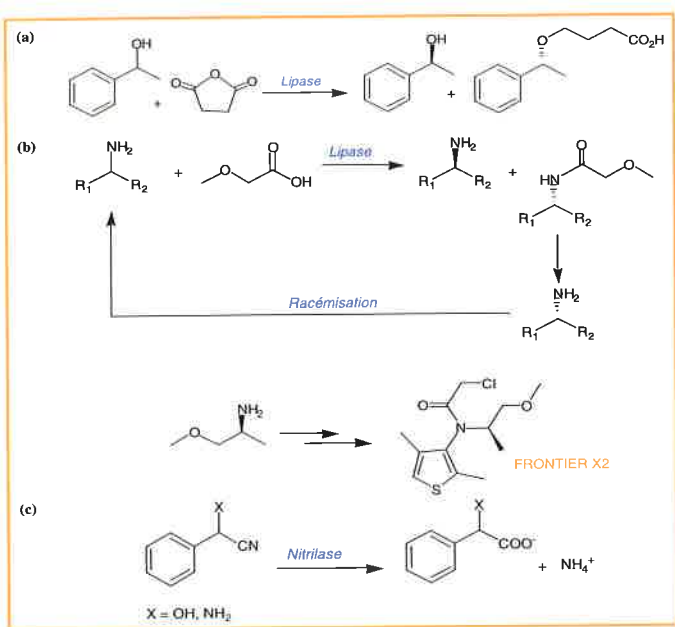


Figure 2 - Procédés BASF mettant en jeu des lipases pour la synthèse. (a) d'alcools énantiomériquement purs ; (b) d'amines chirales ; (c) d'acides hydroxy-carboxyliques.

Résolution d'alcools et d'amines racémiques

La résolution d'alcools et d'amines racémiques par des lipases constitue un axe fort de développement chez BASF puisque la production des composés chiraux correspondants s'établit à plusieurs t/an. L'idée d'utiliser des lipases pour l'obtention de ces composés découle de la connaissance du mécanisme réactionnel de ces enzymes. En effet, les lipases étaient jusqu'alors utilisées pour catalyser l'hydrolyse d'esters d'acides gras. Dans un premier temps, il y a attaque nucléophile du carbonyle de la liaison ester par l'hydroxyle de la sérine, conduisant à la formation d'une acyl-enzyme. L'hydrolyse de cette dernière conduit à

l'acide gras correspondant avec régénération de l'enzyme. Dès qu'il a été démontré que les lipases étaient actives en présence de solvants organiques [13], on a envisagé de remplacer l'eau par d'autres nucléophiles comme des alcools ou des amines. En mettant à profit ces réactions, BASF a eu accès à un large spectre d'alcools et d'amines chirales. Cette voie est utilisée pour la production de la (S)-méthoxypropylamine qui entre dans la composition de l'herbicide Frontier X2 (figure 2b). Une installation industrielle a été construite en 2000 autour de cette application, dont les capacités en 2001 étaient de l'ordre de 2 000 t/an.

Production d'acides α-hydroxy-carboxyliques et d'acides α-amino-carboxyliques

Ces composés résultent de l'hydrolyse d'un nitrile α-substitué par une nitrilase (figure 2c). La production des acides α-hydroxy-carboxyliques est « mécanistiquement » intéressante puisque la racémisation des cyanhydrines en milieu aqueux permet de bioconvertir, par résolution cinétique dynamique, 100 % du substrat de départ en un seul énantiomère. Plusieurs tonnes d'acide mandélique et de ses dérivés ont été ainsi produites.

Procédés DSM

Dès les années 70, DSM s'est forgée une image de société chimique utilisant la biocatalyse, la biotransformation et la fermentation pour la production d'intermédiaires chimiques. La résolution enzymatique de D,L-phénylglycinamide en D-phénylglycine et L-phénylglycine par la leucine aminopeptidase et la L-α-aminoacylase de *Pseudomonas putida* constitue le premier exemple industriel chez DSM [14]. Elle s'est ensuite illustrée dans la production d'aspartame et de dérivés hémi-synthétiques de pénicillines et de céphalosporines.

Production d'aspartame

La production d'aspartame à l'échelle de plusieurs tonnes par voie enzymatique est réalisée à ce jour par Holland Sweetener Company, une « joint-venture » entre Tosoh et DSM. Le couplage du carbobenzyloxy-L-aspartate (Z1) et du D-phénylalanine méthyl ester est catalysé par la thermolysine (figure 3a). Le D-phénylalanine méthyl ester restant est racémisé puis recyclé.

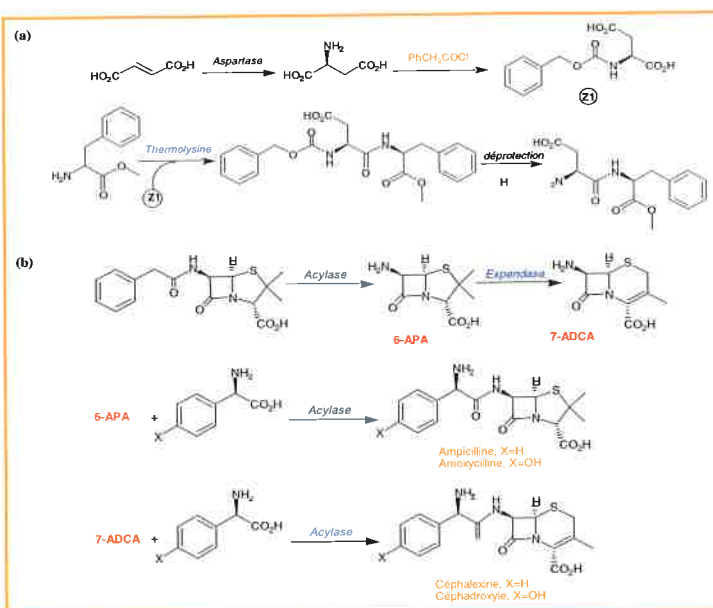


Figure 3 - Procédés appliqués chez DSM. (a) étape biocatalytique pour la production d'aspartame ; (b) production de pénicillines et de céphalosporines hémi-synthétiques.

- Production de pénicillines et de céphalosporines hémisynthétiques

Les pénicillines sont des produits d'origine naturelle obtenus par fermentation. L'utilisation d'acylase puis d'expandase avec la pénicilline comme substrat permet l'accès à deux synthons clés : l'acide 6-aminopénicillanique (6-APA) et l'acide 7-amino-désacétoxycéphalosporanique (7-ADCA) (figure 3b). Ces motifs constituent le point de départ de toute une série de pénicillines et de céphalosporines hémisynthétiques après couplage avec la D-phénylglycine ou la D-p-hydroxyphénylglycine catalysée par une acylase (figure 3b) [15]. L'ampicilline, l'amoxicilline, la céphalexine et la céphadroxyde, dont les productions annuelles avoisinent les 2 000 t/an, sont produites par ce procédé enzymatique.

Procédés Lonza

Une des grandes spécialités de Lonza est la production par voie enzymatique de composés azotés, notamment d'hétérocycles azotés, difficilement modifiables par voie chimique.

- Production d'acide hydroxynicotinique

L'utilisation de la Niacine hydroxylase sur la Niacine permet d'avoir accès à l'acide 6-hydroxynicotinique. Ce « building block » est le motif clé d'un ensemble de nouveaux insecticides produits à l'échelle de plusieurs t/an (figure 4a).

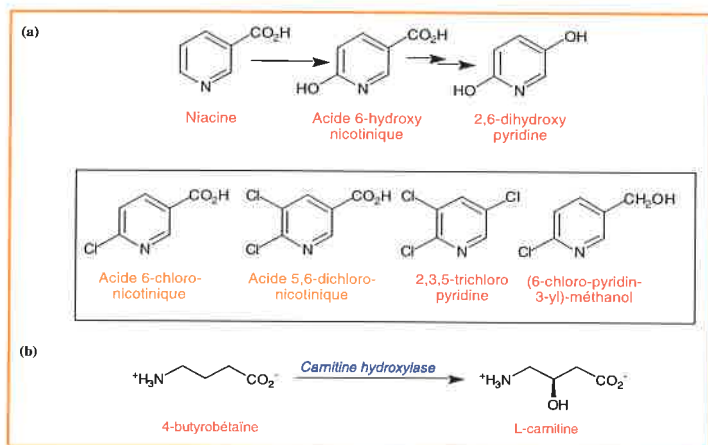


Figure 4 - Procédés appliqués chez Lonza. (a) production d'acide 6-hydroxynicotinique catalysé par *Achromobacter xylosoxidans* LK1 ; (b) production de la L-carnitine.

- Production de L-carnitine

La L-carnitine présente de nombreuses propriétés médicales et nutritionnelles alors que la forme D ne présente, à ce jour, aucune activité décrite. La préparation chimique de cette molécule, à partir du mélange d'épichlorhydrine racémique et d'acide tartrique, aboutissait à l'obtention de la D,L-carnitine avec un faible rendement. Le doublement par recristallisation en présence d'un sel chiral constituait un handicap car il grevait lourdement le coût du procédé. L'accès à la L-carnitine par voie enzymatique, à partir d'un substrat achiral peu coûteux, est devenu très vite la voie industrielle retenue. Deux voies d'accès sont envisageables : l'hydroxylation assymétrique de la 4-butyrobétaine (figure 4b), ou l'hydratation assymétrique de la crotonobétaine. A ce jour, l'expression de la carnitine hydroxylase dans *Escherichia coli* permet de produire, par hydroxylation assymétrique de la 4-butyrobétaine, 300 t/an de L-carnitine [16].

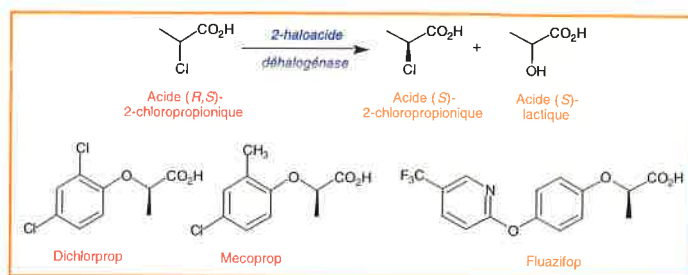


Figure 5 - Procédés appliqués chez Zeneca. Production d'herbicides optiquement actifs à partir d'acide (S)-chloropropionique optiquement pur.

Procédé Zeneca

En développant la voie d'accès enzymatique au (S)-chloropropionique, Zeneca s'est doté d'un arbre-produit très attractif à la base de nombreux herbicides actuellement sur le marché (figure 5).

- Production d'acide (S)-chloropropionique

L'hydrolyse énantiosélective de l'acide 2-chloropropionique racémique par une déshalogénase permet d'obtenir l'acide (S)-chloropropionique énantiomériquement pur (figure 5). Cette déshalogénase surexprimée chez *Escherichia coli* permet, par un procédé « fed-batch », de synthétiser plus de 2000 t/an d'acide (S)-chloropropionique [17].

Conclusions

Au vu des exemples non exhaustifs présentés dans cet article, nous constatons que le développement de procédés mixtes chimie/biocatalyse constitue l'un des enjeux économiques forts du moment. L'impasse sur une approche « bio » pourrait, à terme, être lourde de conséquence. La plupart des compagnies chimiques ont aujourd'hui dans leur axe de recherche et développement, en interne ou en externe, des équipes de biologistes moléculaires, de microbiologistes et de biochimistes, dédiées à l'étude des voies de synthèse de nouveaux composés. Rhodia a su saisir cette opportunité en associant étroitement un département de biocatalyse et un département de chimie de catalyse asymétrique dans la production d'intermédiaires pharmaceutiques ou agrochimiques à forte valeur ajoutée. Ces nouvelles approches stratégiques influent fortement sur l'orientation des secteurs industriels. Ceux-ci s'adaptent en modifiant ou en renforçant leurs installations afin d'accueillir ces nouveaux procédés qui donnent accès à des réactions chimiques difficiles, voire impossibles à réaliser par une chimie conventionnelle.

Références

- [1] Rozzell J.D., Commercial scale biocatalysis: Myths and realities, *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, p. 2253.
- [2] Arnold F.H., Volkov A.A., Directed evolution of biocatalysts, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1999**, 3, p. 54.
- [3] Marrs B., Delagrave S., Murphy D., Novel approaches for discovering industrial enzymes, *Curr. Opin. Microbiol.*, **1999**, 2(3), p. 241.
- [4] Preisig C., Byng G., Applications of mass spectrometry in screening for new biocatalysts, *J. Mol. Cat.*, **2001**, 11(4-6), p. 733.
- [5] Dordick J.S., *Biocatalysts for industry*, Plenum press, New York, **1991**.
- [6] Faber K., *Biotransformations in organic chemistry*, Springer, **1997**.
- [7] Roberts S.M. et al., *Biocatalysis for fine chemical synthesis*, W. Sons, **1999**.
- [8] Wandrey C., Liese A., Kihumbu D., Industrial Biocatalysis: past, present, and future, *Org. Process. Res. Dev.*, **2000**, 4, p. 286.
- [9] Danner H., Braun R., Biotechnology for the production of commodity chemicals from biomass, *Chem. Soc. Rev.*, **1999**, 28, p. 395.

- [10] Nagasawa T., Nitrile hydratase. Its application for the industrial production of acrylamide, *Kikan Kagaku Sosetsu*, **1995**, *24*, p. 180.
- [11] Hann E.C. *et al.*, 5-cyanovaléramide production using immobilized *Pseudomonas Chlororaphis* B23, *Biorg. Med. Chem.*, **1999**, *7*, p. 2239.
- [12] Jensen V.J., Rugh S., Industrial scale production and application of immobilized glucose isomerase, *Methods Enzymol.*, **1987**, *136*, p. 356.
- [13] Klibanov A.M., Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents, *Acc. Chem. Res.*, **1990**, *23*, p. 114.
- [14] Boesten W.H.J., Meyer-Hoffman L.R.M., Enzyme production with L-alpha-aminoacylamidase activity, *Novo*, GB 1577087, **1977**.
- [15] Bruggink A., Roos E.C., De Vrom E., Penicillin acylase in the industrial production of b-lactam antibiotics, *Org. Proces. Res. Dev.*, **1998**, *2*, p. 128.
- [16] Hoeks F. *et al.*, Process integration for the production of fine biochemicals illustrated with the biotransformation of gamma butyrobetaine into L-carnitine, *J. Biochem. Eng. J.*, **1996**, *61*, p. 53.
- [17] Taylor S.C., (S) 2-chloropropionic acid developments in its industrial manufacture, *Chirality in industry II*, A. Collins, G.N. Scheldrake, J. Crosby éd., Wiley & Sons, **1987**.



Claude Bensoussan

a dirigé le service Biocatalyse (Groupe Expertise et développement pharmaceutique) de Rhodia Recherches*. Il a quitté cette fonction fin juillet 2002 pour créer la société Enzymomics** dans le domaine de la biocatalyse.

* Rhodia Recherches, Centre de Recherches de Lyon, 85 rue des Frères Perret, 69192 Saint-Fons.

** Enzymomics, Hall 3-Gilbert Durand, 135 avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex 4.

E-mail : Claude.Bensoussan@wanadoo.fr

Exemples de composés produits à l'échelle industrielle par biocatalyse

Compagnie	Production	Tonnes/an
Ajinomoto Co.	dihydroxyphénylalanine	250
AMINO GmbH	acide malique	2 000
BASF	(R)-phényléthylamine	> 100
Chemferm	pénicillines hémisynthétiques	2 000
Degussa-Hüls AG	L-aminoacides	200
Dr Vig Medicaments	7-ADCA	300
DSM	aspartame	> 2 000
DuPont	5-cyanovaléramide	10
Gist-Brocades/Novo-Nordisk	fructose	> 250 000
Hoechst Marion	acide 7 amino céphalosporanique	200
Kanegafuchi	D-p-hydroxyphénylglycine	200
Krebs Biochemicals Ltd.	phénylacétylcarbinol	120
Lonza AG	vitamine B3	3 000
Monsanto	acides aminés	> 10
Nitto Chemical Industry	acrylamide	> 30 000
Tanabe Seiyaku Co.	acide malique	450
Toray Industries	lysine	4 000
Zeneca	acide (S)-2-chloropropionique	2 000

La biodégradation des polluants organiques

Métabolisme, estimation des risques, dépollution et biodétection

Jamal Ouazzani

Summary

Biodegradation of organic pollutants. Metabolism, risk assessment, bioremediation and biodetection

The presence of toxic organic pollutants in soils and aquifers contribute to the development of highly resistant microorganisms. This resistance is the consequence of partial or total degradation of the pollutant by enzymes. Elucidation of enzymatic mechanisms and identification of the metabolites help to predict the impact of the pollution on public health and environment, and the urgency of prevention and remediation processes. Based on a representative and accurate example, this paper describes both fundamental and applied benefits in investigating microbial degradation of organic pollutants.

Mots-clés

Biodégradation, polluants organiques, cytotoxicité, micro-organismes, trinitrotoluène.

Key-words

Biodegradation, organic pollutants, cytotoxicity, microorganisms, trinitrotoluene.

La pollution chimique que connaît actuellement la planète n'est pas le seul fait des xénobiotiques, substances non naturelles produites principalement par les industries chimiques (pesticides, détergents, colorants, explosifs...). Elle est aussi et surtout le résultat de l'accumulation, du déplacement et de la transformation de produits naturels d'origine géologique (hydrocarbures...) ou anthropogénique (ordures, lisier, boues de stations d'épuration, produits d'incinération...). Deux types de risques sont à déplorer, les risques environnementaux et les risques pour la santé publique. La notion de risque socio-économique est apparue récemment et reflète l'incidence d'une pollution sur le développement, voire la survie, d'une région ou d'une activité. Dans la majorité des cas, la pollution recouvre ces différents risques.

La biodégradation est le facteur naturel majeur d'élimination et de recyclage des déchets organiques. Il se distingue de la bioconversion par le nombre généralement important de réactions mises en jeu (figure 1). Certains polluants résistent cependant à la biodégradation et persistent avec des temps de demi-vie qui peuvent atteindre un demi-siècle ou plus. Ces produits qualifiés de récalcitrants sont généralement des xénobiotiques, mais certains produits naturels le sont également (lignine). Cette résistance à la biodégradation est due soit à une cytotoxicité accrue du polluant qui finit par stériliser le milieu contaminé, soit à une structure chimique inaccessible aux attaques enzymatiques. La biodégradation, en tant que procédé de décontamination, vise à mettre au point des méthodes microbiologiques utilisables en milieu ouvert, et transposables à une échelle pouvant atteindre des milliers de m³ d'effluents ou des centaines de tonnes de sols contaminés. Ces contraintes excluent de manière générale l'utilisation d'enzymes purifiées en biodépollution et justifient l'utilisation d'organismes vivants, principalement

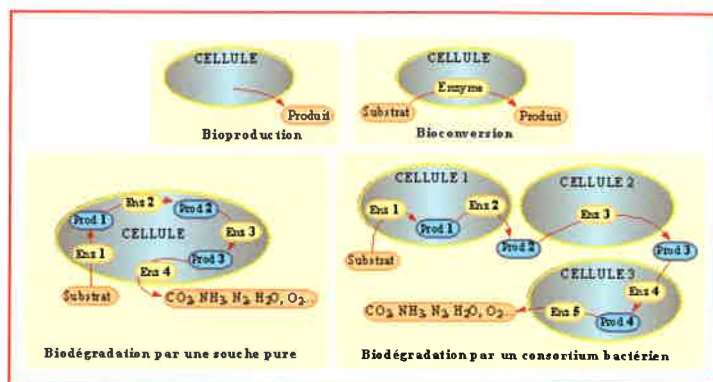


Figure 1 - L'objectif final de la biodégradation est de transformer des substrats organiques en produits minéraux, en faisant intervenir plusieurs enzymes exprimées soit par un micro-organisme unique, soit par un groupe de micro-organismes (consortium).

des micro-organismes. La deuxième raison qui exige l'utilisation d'organismes vivants est la prédominance en biodégradation de réactions d'oxydoréduction nécessitant la régénération permanente de cofacteurs, qui ne peut être assurée de manière économiquement viable qu'*in vivo*. Quelques exemples d'utilisation de préparations enzymatiques, principalement des hydrolases, sont cependant rapportés pour la biodégradation de graisses.

La pression de sélection, imposée dans le milieu contaminé par le polluant, laisse émerger quelques micro-organismes (*Phanerochaete*, *Pseudomonas*, *Bacillus*...) dotés d'enzymes extrêmement efficaces pour la dégradation des substances organiques récalcitrantes. Cette capacité d'adaptation, vitale pour le micro-organisme, répond à deux besoins fondamentaux. Le premier, qui se rencontre chez tous les

êtres vivants, consiste à échapper à la cytotoxicité du polluant en le transformant en dérivés moins toxiques. Nous pouvons citer comme exemples la N-acétylation des amines et hydroxylamines aromatiques, la dénitrification de nitro-aromatiques et toutes les réactions d'oxydation qui visent à faciliter l'élimination des xénobiotiques. Ces réactions de protection se retrouvent aussi chez les mammifères et l'Homme en particulier. Le deuxième besoin vital, spécifique aux micro-organismes, s'exprime dans des conditions nutritives limitantes, et le polluant sert comme source nutritive ou énergétique (source de carbone, d'azote ou de soufre). Citons ainsi l'utilisation de l'atrazine par certains micro-organismes comme source de carbone et d'azote (figure 2), et l'utilisation du dibenzothiophène comme source de soufre et de carbone (voir l'article de J.-P. Vandecasteele *et al*). Ces deux molécules sont hautement récalcitrantes, mais en absence de sources nutritives plus simples, les micro-organismes finissent par détourner des enzymes du métabolisme pour les dégrader. En cas d'exposition prolongée, les enzymes de ces micro-organismes évoluent jusqu'à devenir spécifiques de tel ou tel polluant. Ces adaptations, développées au cours de l'évolution du micro-organisme, peuvent être améliorées par des techniques de pression de sélection et, lorsque les législations le permettront, par des techniques de génie génétique. En effet, l'intervention des micro-organismes en milieu ouvert interdit jusqu'à présent l'utilisation d'espèces génétiquement modifiées (OGM). Ceci n'exclut pas les études de laboratoires et quelques essais pilotes réalisés en milieu confiné [1].

La meilleure manière d'aborder un domaine aussi vaste que la biodégradation est de le traiter au travers d'un exemple. Ce dernier doit donner une idée générale de l'intérêt et des limites de la biodégradation des polluants. Il doit aussi

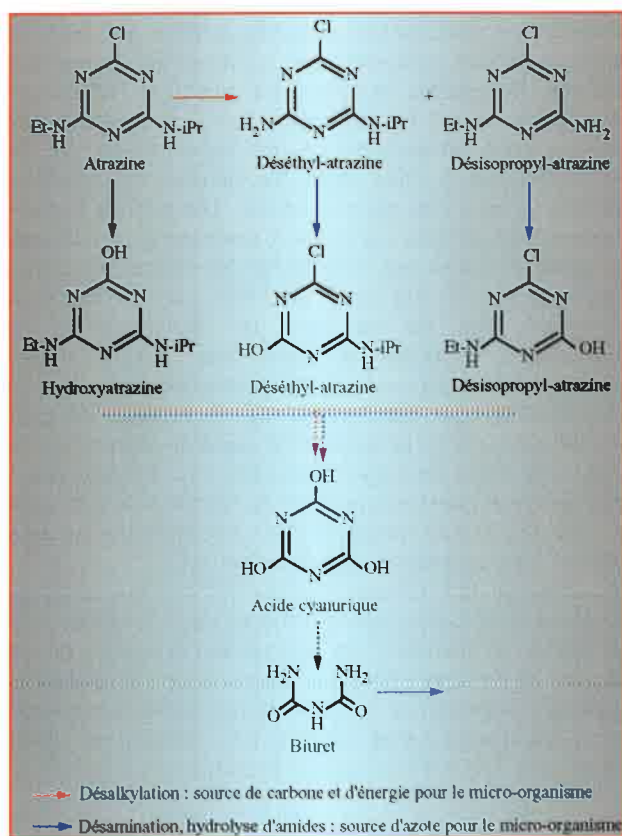


Figure 2 - Utilisation du pesticide atrazine comme source nutritive par les micro-organismes.

révéler les retombées et les bénéfices fondamentaux et appliqués. L'une des molécules qui permet d'aborder tous ces aspects est le 2,4,6-trinitrotoluène ou TNT. Ce produit fait partie d'une famille particulière de polluants, les produits énergétiques ou explosifs. Dans cette famille, le TNT est de loin le plus récalcitrant et constitue depuis des décennies un défi pour les chercheurs qui œuvrent dans le domaine de la biodégradation.

Les explosifs font partie d'une superfamille moléculaire à haut risque pour l'environnement et la santé publique, les nitro-aromatiques. Dans cette famille, on retrouve des pesticides, des colorants et des produits pharmaceutiques. Comme les métabolites principaux formés dans l'environnement sont les produits de nitroréduction, les nitro-aromatiques rejoignent sur le plan toxicologique les amines aromatiques. En effet, ils conduisent tous deux aux hydroxylamines, les nitro par réduction et les amines par N-oxydation. Comme la nitroréduction est bien plus répandue que la N-oxydation des amines, les nitro-aromatiques sont potentiellement plus toxiques que les amines aromatiques.

La nitroréduction est une réaction universelle qu'on retrouve chez tous les êtres vivants. Elle se déroule aussi bien en aérobie qu'en anaérobie (ce qui n'est pas le cas de la N-oxydation d'amines primaires), et empreinte une deuxième voie cytotoxique qui implique des espèces activées de l'oxygène (figure 3).

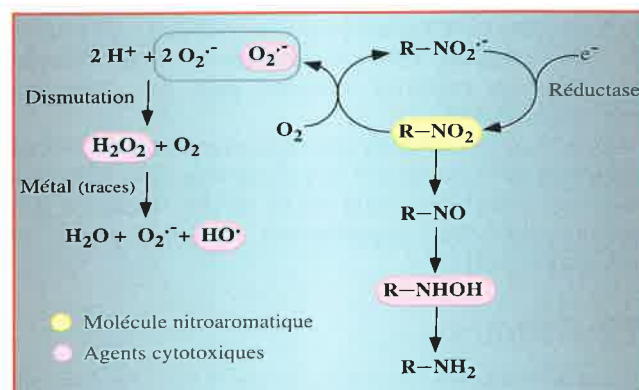


Figure 3 - Les nitroréductases engendrent une cytotoxicité au travers de deux voies :

- 1) La voie productive conduit à la formation d'amines primaires avec la production d'hydroxylamines intermédiaires.
- 2) Le cycle futile est observé en présence d'oxygène et conduit à des espèces activées cytotoxiques.

Les premières hydroxylamines stables qui ont été caractérisées sont celles qui proviennent de la nitroréduction du TNT. Elles ont été isolées dans les urines de lapin auxquels le TNT a été administré, et ont fait depuis l'objet d'études toxicologiques exhaustives.

L'étude de la biodégradation des nitro-aromatiques permet d'élaborer des stratégies de dépollution des sols ou des eaux contaminées. Ces procédés sont basés soit sur l'exploitation des micro-organismes déjà présents dans le milieu contaminé, soit sur l'introduction de micro-organismes efficaces. L'autre intérêt dans l'étude de la biodégradation du TNT est la conception de « renifleurs enzymatiques » (biocapteurs) qui permettront de détecter en milieu ouvert, les quantités infimes de TNT qui s'échappent de colis suspects ou des mines antipersonnelles. Ces renifleurs enzymatiques pourront se substituer au

système olfactif canin, seul capable de détecter de manière fiable et en milieu ouvert, la présence de ces produits.

Cytotoxicité

Le terme polluant désigne toute molécule toxique pour la faune et la flore ayant des répercussions sur l'environnement et la santé publique. Le TNT et ses métabolites sont toxiques pour l'Homme et les mammifères en général, pour les invertébrés, poissons, micro-organismes, algues etc. [2]. La toxicité du TNT, comme celle de l'ensemble des nitro-aromatiques, reste associée à leur métabolisation et à la réaction de nitroréduction en particulier (figure 3). Cette réaction se caractérise par deux voies : une voie productive qui conduit à partir du nitro à l'amine correspondante en passant par des intermédiaires nitroso et hydroxylamine. La deuxième voie, appelée « cycle futile », est catalysée par les nitroréductases en présence d'oxygène. Il s'agit d'un va-et-vient permanent entre la forme nitro et le radical anion. Ce cycle futile génère directement des anions superoxydes dont la dismutation conduit au peroxyde d'hydrogène qui, en présence de traces de métal, évolue en radical hydroxyle. L'ensemble entraîne les dommages classiques attribués d'une part aux hydroxylamines et d'autre part aux espèces activées de l'oxygène. Ces entités, extrêmement réactives chimiquement, vont interagir avec des molécules biologiques (protéines, ADN...) et provoquer une détresse respiratoire, un stress oxydant et des lésions au niveau de l'ADN, qui expliquent le caractère cancérigène de ces molécules. Elles peuvent aussi inhiber l'activité de différentes protéines induisant ainsi des désordres physiologiques [16].

La toxicité du TNT vis-à-vis des micro-organismes lui permet d'éradiquer la flore des sols qu'il contamine. Ceci, conjugué avec une stabilité chimique élevée et une résistance aux facteurs abiotiques (rayonnement, chaleur), assure la persistance du TNT.

Récalcitrance

Le terme molécule récalcitrante concerne tout composé qui résiste aux attaques enzymatiques et qui, par conséquent, n'est pas biodégradable. Ce n'est pas exactement le cas du TNT qui est transformé par les micro-organismes en différents métabolites. Le problème est que les métabolites ne sont pas forcément moins cytotoxiques ou plus biodégradables que le TNT, et que le squelette aromatique qui porte les groupements actifs ne subit quasiment pas de minéralisation (rupture du cycle aromatique et transformation de ses carbones en CO_2). La difficulté à minéraliser le TNT vient d'une part de sa cytotoxicité et d'autre part de sa structure. En effet, le nombre et la disposition des groupements nitro revêtent une importance capitale. Les groupes nitro par leur haut degré d'oxydation, leur nature électrophile (effet électronique) et leur disposition alternée sur le cycle aromatique (effet stérique) empêchent l'attaque enzymatique de ce dernier. Des analogues du TNT mono- ou dinitrés sont par contre facilement biodégradables et minéralisables (figure 4).

Association avec les composants du sol

Comme beaucoup de polluants qui contaminent les sols, le TNT et ses métabolites réduits s'associent de manière

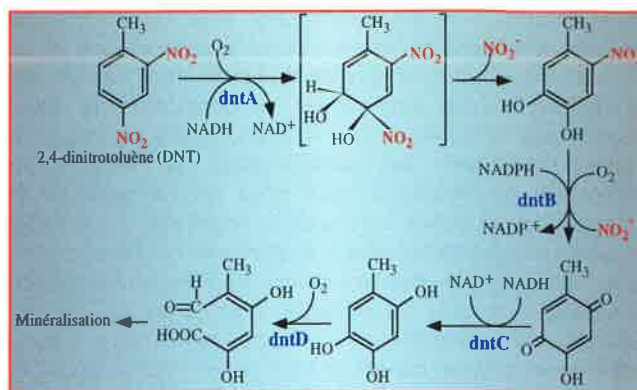


Figure 4 - Minéralisation du 2,4-dinitrotoluène par la bactérie *Pseudomonas DNT*. Les oxydations successives sont catalysées par différentes dioxygénases.

réversible ou irréversible avec les composants minéraux et organiques du sol (acides humiques, argiles). Cette part non négligeable du polluant ne peut être éliminée qu'après sa mobilisation du sol par des traitements chimiques divers (lessivage, extraction...). La phytoremédiation (utilisation des plantes en dépollution) permet dans certains cas de mobiliser les contaminants au niveau de la rhizosphère et de les rendre accessibles aux attaques microbiennes (voir l'article de J.-L. Morel).

Multiplicité des voies métaboliques

Selon le micro-organisme étudié et les enzymes qu'il exprime, selon les conditions aérobies ou anaérobies dans lesquelles sont menées les expériences et selon l'addition de co-substrats et autres additifs, les voies de dégradation des polluants sont extrêmement diversifiées. D'autres différences apparaissent lorsqu'on utilise des souches pures ou des mélanges de souches, actives par exemple dans un compost ou une boue activée. Le TNT n'échappe pas à cette règle. En aérobies, les réactions principales sont des nitroréductions. Les amines formées subissent ensuite des acylations ou participent à la formation de dimères. Dans ces conditions, les micro-organismes n'arrivent pas à tirer profit du TNT car on n'observe quasiment pas de réactions de dénitrification ni de déamination, capables de libérer des sources d'azote pour le micro-organisme. On n'observe pas non plus de minéralisation qui témoignerait de la rupture du cycle aromatique, source potentielle de carbone pour le micro-organisme. Pour les autres molécules nitro-aromatiques, la minéralisation passe toujours par la formation d'analogues du catéchol, seuls capables d'être minéralisés par les voies ortho et méta de dégradation du catéchol [3].

En anaérobies, la biodégradation du TNT implique aussi des réactions de nitroréduction, qui aboutissent à la formation de dérivés di- et triamines. La dégradation ultérieure de ces dérivés, et principalement leur déamination, fait l'objet de quelques controverses. Il n'en reste pas moins que certains micro-organismes, anaérobies stricts, utilisent en milieu minimum le TNT comme source de carbone et d'azote.

Réactions enzymatiques particulières

La dénitrification du TNT et la déamination de ses dérivés réduits sont sans doute les deux réactions qui permettent de

transformer le TNT en dérivés biodégradables. Malheureusement, ce sont les deux réactions limitantes les plus controversées et les moins documentées, aussi bien en ce qui concerne les enzymes impliquées que les mécanismes mis en jeu.

Dénitration microbiologique du TNT

Spain et Knackmuss ont montré que *Rhodococcus sp.* et *Mycobacterium sp.* convertissent le TNT en « dihydrure de Meisenheimer » [4], mais ils n'ont pas observé de dénitrification (figure 5). Par contre, Shea et coll. ont montré que *Pseudomonas savatoni* était capable de dénitrifier le TNT, en mettant en évidence la formation du 2,4-DNT et la production de nitrites [5]. Dans tous les cas, la minéralisation du cycle aromatique du TNT restait négligeable. Nous avons sélectionné au laboratoire le champignon filamenteux *Penicillium LCM* [15], qui présente des capacités exceptionnelles à dégrader le TNT. En absence d'une source de carbone dans le milieu d'incubation (glucose), cette souche catalyse en aérobie la dénitrification du TNT, mais pas sa minéralisation. Par contre, en présence de glucose, *Penicillium LCM* minéralise plus de 70 % du TNT, présent en solution aqueuse à concentration saturante de 100 mg/L [15].

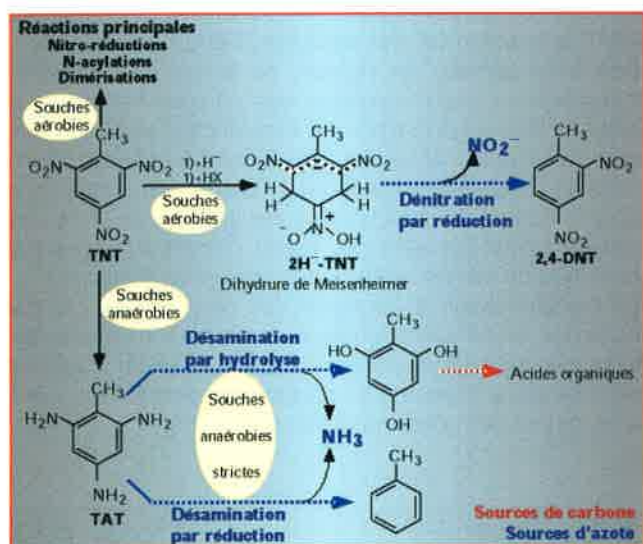


Figure 5 - Dénitration et déamination du TNT.

Les flèches bleues indiquent les voies qui constituent des sources d'azote pour le micro-organisme, les flèches rouges indiquent les voies qui constituent des sources de carbone.

Contrairement au cas du TNT, où les enzymes responsables de la dénitrification n'ont pas été étudiées, la dénitrification du 2,4-dinitrotoluène a été complètement élucidée. Les différentes voies métaboliques qui aboutissent à la minéralisation de la molécule ainsi que les enzymes impliquées ont été identifiées (figure 4) [7].

Déamination microbiologique des métabolites réduits du TNT

En aérobie, les dérivés mono- et diaminés du TNT ne subissent pas de déamination. Ils se dimérisent ou

s'accumulent dans le milieu. Par contre, en anaérobie stricte, les trois groupements nitro peuvent être réduits, le triaminotoluène TAT formé peut subir une déamination réductive. La formation de para-crésol et du toluène sont rapportés comme des intermédiaires de la dégradation du TAT par différents micro-organismes anaérobies stricts (figure 5).

Phytoremédiation et TNT

La phytoremédiation consiste à cultiver des plantes sur des sites contaminés par différents polluants organiques ou minéraux. Ces plantes aquatiques ou terrestres doivent résister au polluant et permettre son accumulation avec ou sans biotransformation (voir l'article de J.-L. Morel). La phytoremédiation peut être utilisée seule ou en association avec des micro-organismes.

Des travaux récents menés sur un site de production de munitions à l'Iowa (États-Unis) ont montré que des plantes aquatiques (cornifle nageante, elodée...) arrivaient à réduire la concentration du TNT dans des eaux contaminées. Aucune trace de TNT n'a été retrouvée dans les différents tissus de la plante et aucune minéralisation n'a été observée ; cependant, des produits de monoréduction ont été identifiés [8].

L'idée qui fait actuellement son chemin est de pouvoir coupler l'efficacité des végétaux à accumuler les polluants organiques, et la capacité des micro-organismes à les dégrader. Ceci a été tenté dans le cas des explosifs en introduisant un gène bactérien codant pour la pentaérythritol tétranitrate réductase dans des plants de tabac [9]. Le tabac transgénique obtenu se développe sur des milieux contenant la trinitroglycérine TNG (1 mM) ou de faibles concentrations de TNT (0,05 mM), alors que le tabac sauvage en est incapable. Le tabac transgénique transforme plus rapidement que le sauvage la trinitroglycérine en dérivés mono- et dinitrés. Par contre, les produits de transformation du TNT n'ont pas encore été identifiés. La méfiance reste de rigueur pour ces différentes expériences, car il faut que de tels systèmes dégradent totalement l'explosif pour éviter l'accumulation dans les plantes des intermédiaires métaboliques, plus cytotoxiques que le polluant d'origine.

Utilisation de méthodes couplées, chimie propre-microbiologie

La biodégradation d'un polluant se trouve parfois compromise par une première étape de transformation inopérante (déhalogénéation, déméthylation, dénitrification...). Plusieurs chercheurs ont tenté de lever ce blocage en associant à la biodégradation des méthodes chimiques propres, regroupées sous le nom de « procédés d'oxydations avancés » (photolyse, Fenton, peroxyde d'hydrogène...). Nous avons exploré au laboratoire cette possibilité dans le cas de l'atrazine pour laquelle la photolyse permet la déshalogénéation et la déalkylation, mais pas la minéralisation de l'acide cyanurique obtenu. Les micro-organismes sont par contre capables de minéraliser l'acide cyanurique (figure 2). Une approche similaire a été adoptée dans le cas du TNT et a montré en milieu naturel la complémentarité entre les facteurs abiotiques (rayonnement, acidité des sols...) et la biodégradation [10].

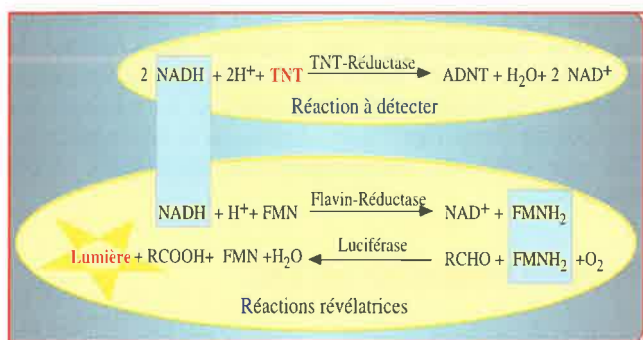


Figure 6 - Un biocapteur basé sur la nitroréduction du TNT a été élaboré.

Il associe à une réaction enzymatique spécifique une réaction révélatrice. En absence de TNT, le système émet une lumière basale ; par contre, en présence de TNT, on assiste à une extinction de cette lumière émise qui est proportionnelle à la concentration de TNT.

Utilisation des biotechnologies pour augmenter l'efficacité de la biodégradation

La mise en œuvre de micro-organismes génétiquement modifiés, destinés à la dépollution en milieu ouvert, est actuellement interdite [1]. Cependant, plusieurs études de laboratoire cherchent à améliorer les performances de micro-organismes en biodégradation. Deux voies sont explorées actuellement : la première vise à compléter le chemin métabolique d'un micro-organisme pour aboutir à l'élimination du polluant considéré, la seconde vise à concevoir des micro-organismes exprimant les familles d'enzymes les plus impliquées dans les biodégradations.

Ainsi, pour le TNT, Ramos et coll. ont utilisé une souche de *Pseudomonas* capable d'utiliser le TNT comme source d'azote pour croître mais pas comme source de carbone [11]. Ils ont introduit dans cette souche un plasmide codant pour la toluène-dioxygénase, enzyme qui minéralise le toluène et qui rappelle les enzymes de dégradation du catéchol [3]. Le micro-organisme hybride obtenu utilise, dans un milieu de culture pauvre, le TNT comme source d'azote et de carbone. En présence d'autres sources de carbone plus faciles à assimiler, le TNT n'est plus minéralisé. Dans la deuxième démarche, le but n'est pas d'améliorer le micro-organisme, mais plutôt d'améliorer les enzymes en augmentant l'éventail de leurs substrats ou leur efficacité catalytique. Ces recherches sont basées sur des biotechnologies comme le DNA-shuffling ou les échanges de domaines entre enzymes ; ces différentes techniques doivent encore faire leurs preuves [12].

Utilisation des enzymes comme biocapteurs pour détecter le TNT

L'utilisation de biocapteurs est généralement basée sur une reconnaissance de type antigène-anticorps ou de type enzymatique. L'utilisation de micro-organismes rapporteurs est moins utilisée, mais peut constituer une alternative de choix pour les applications de terrain. L'objectif est d'atteindre la plus grande sensibilité de détection et la plus grande spécificité de reconnaissance. En ce qui concerne les

explosifs, les trois techniques ont été envisagées et méritent d'être améliorées. L'un des défis est de pouvoir utiliser ces biocapteurs pour délimiter des zones contaminées ou pour repérer l'emplacement de mines antipersonnelles. Ce problème est extrêmement sensible car plus de 110 millions de ces mines sont disséminées dans 68 pays, et 100 autres millions stockés dans une centaine de pays.

Les biocapteurs enzymatiques peuvent être exploités *in vivo* ou *in vitro*. L'avantage de l'utilisation *in vivo* est de pouvoir repérer directement le micro-organisme rapporteur. Ce micro-organisme capable de convertir le polluant recherché va associer à la réaction de biotransformation une réaction de révélation qui aboutira à un repérage précis des zones contaminées ou des emplacements de mines (figure 6) [13].

Bénéfices fondamentaux et appliqués de telles études

Les polluants organiques les plus récalcitrants ont été conçus avec deux contraintes majeures, un maximum d'efficacité et un maximum de stabilité. Ceci a conduit à des structures chimiques simples mais extrêmement résistantes à la dégradation. La cytotoxicité des polluants, et par conséquent le risque qui pourrait découler de leur ingestion, est souvent révélée par l'étude des enzymes qui les transforment et par la structure de leurs métabolites [14]. Le TNT a été l'une des premières molécules qui a révélé la cytotoxicité liée à la réaction de nitroréduction. Cette connaissance a permis de prévenir les risques, en encadrant l'utilisation industrielle et pharmaceutique des nitro-aromatiques. La cytotoxicité liée à la réaction de nitroréduction a été exploitée aussi sur le plan thérapeutique, en ciblant les cellules anoxiques (peu oxygénées) telles que celles des tumeurs solides où la réaction de nitroréduction est très active. Plusieurs dérivés nitrés ont ainsi été testés comme antitumoraux potentiels ou comme outils de thérapie génique (figure 7).

La biodégradation a largement fait ses preuves comme technique de réhabilitation de sites contaminés principalement par les hydrocarbures. Pour les explosifs, plusieurs expériences sont en cours exploitant des procédés tels que ceux mis au point dans notre laboratoire [15].

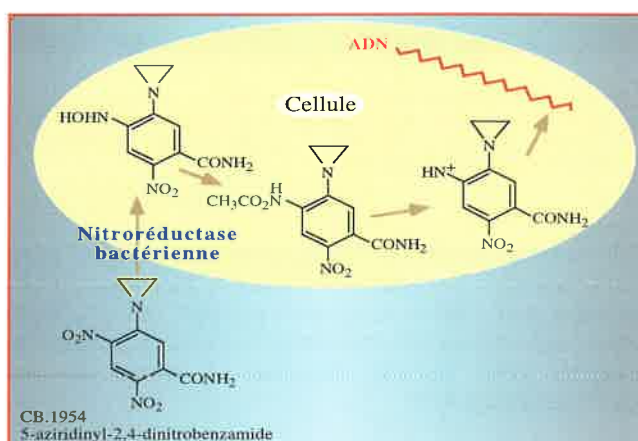


Figure 7 - Activation du CB,1954 par nitroréduction.

Dans le cas de cellules cancéreuses insensibles au CB,1954, l'introduction du gène d'une nitroréductase bactérienne permet de réduire le groupement nitro et d'activer le CB,1954. La combinaison entre le caractère bi-alkylant du produit de nitroréduction, et de la cytotoxicité de l'hydroxylamine intermédiaire aboutit à la mort de la cellule cancéreuse.

Références

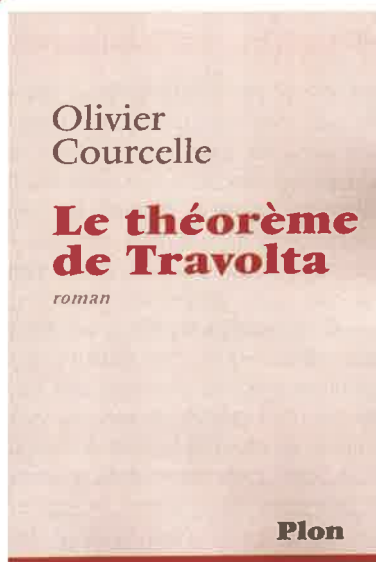
- [1] Saylor G.S., Ripp S., Field Application of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2000**, *11*, p. 286.
- [2] Perchermeier M.M., Kiefer F., Wiebel F.J., Toxicity of monocyclic and polycyclic nitroaromatic compounds in a panel of mammalian test cell lines, *Toxicol. Lett.*, **1994**, *72*, p. 53 ; Lotufo G.R., Farrar J.D., Inouye L.S., Bridges T.S., Ringelberg D.B., Toxicity of sediment-associated nitroaromatic and cyclonitramine compounds to benthic invertebrates, *Environ. Toxicol. Chem.*, **2001**, *20*, p. 1762.
- [3] Broderick J.B., Catechol dioxygenases, *Essays in biochemistry*, **1999**, *34*, p. 173.
- [4] Vorbeck C., Lenke H., Fisher P., Spain J.C., Knackmuss H.J., Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1998**, *64*, p. 246.
- [5] Martin J.L., Comfort S.D., Shea P.J., Kokjohn T.A., Drijber R.A., *Can. J. Microbiol.*, **1997**, *43*, p. 447.
- [6] Anusevicius Z., Sarlauskas J., Nivinskas H., Segura-Aguilar J., Cenas N., *FEBS. Lett.*, **1998**, *436*, p. 144.
- [7] Suen W.C., Spain J.C., Cloning and characterisation of *Pseudomonas* sp. Strain DNT genes for 2,4-dinitrotoluene degradation, *J. Bacteriol.*, **1994**, *175*, p. 1831.
- [8] Best E.P., Sprecher S.L., Larson S.L., Fredrickson H.L., Bader D.F., Environmental behaviour of explosives in groundwater from the Milan Army Ammunition Plant in aquatic and wetland plant treatments, *Chemosphere*, **1999**, *39*, p. 2057.
- [9] French C.E., Rosser S.J., Davies G.J., Nicklin S., Bruce N.C. Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase, *Nature Biotechnol.*, **1999**, *17*, p. 491.
- [10] Hwang H.M., Slaughter L.F., Cook S.M., Cui H., Photochemical and microbial degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in a freshwater environment, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **2000**, *65*, p. 228.
- [11] Duque E., Haidour A., Godoy F., Ramos J.L., Construction of a pseudomonas hybrid strain that mineralizes 2,4,6-trinitrotoluene, *J. Bacteriol.*, **1993**, *175*, p. 2278.
- [12] Furukawa K., Engineering dioxygenases for efficient degradation of environmental pollutants, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2000**, *11*, p. 244.
- [13] Egghart H.C., The meradcom *in vitro* biosensor program. *Report Mercadom- 2364*, order n° AD-A127766 US, **1983**, *83(17)*, p. 4188 ; Fliermans C.B., Lopez-De-Victoria G., Microbial mine detection system (NMDS), *S.P.I.E.*, **1998**, *3392*, p. 462.
- [14] Le Campion L., Delaforge M., Noël J.-P., Ouazzani J., Metabolism of ¹⁴C-labelled 5-nitro-1,2,4-triazole-3-one (NTO): comparison between rat liver microsomes and bacterial metabolic pathways, *J. Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **1998**, *5*, p. 395.
- [15] Ouazzani J., Le Campion L., *Microbial process for nitroaromatics remediation*, **1999**, PCT/FR99/02314.
- [16] Gross P., Biologic activity of hydroxylamine: a review, *Crit. Rev. Toxicol.*, **1985**, *14*, p. 87.



Jamal Ouazzani

est chargé de recherche à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles*.

* Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR 2301 CNRS, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex.
Tél. : 01 69 82 30 60. Fax : 01 69 07 72 47.
E-mail : jamal.ouazzani@icsn.cnrs-gif.fr



Le théorème de Travolta
Olivier Courcelle
Éditions Plon, août 2002, 310 pages, 18 €

Le Congrès international des mathématiciens de Genève est la grand-messe des mathématiciens. Attirés par ces paillettes fractales et géométriques, trois jeunes ratés du théorème pétris de névroses décident d'y faire un tour. Le premier, Jean-Jacques, pour s'y faire des copains et acheter un Rousseau en plastique à sa maman prof de français. Le deuxième, Faroud (de Marrakech), pour faire enrager son jumeau Mourad et exposer un bref quart d'heure le minable poster qu'il a bricolé à partir de sa lamentable thèse. Le troisième, Uriel Muller, obscur gratte-papier dans une sous-gazette locale, pour rencontrer enfin des types plus moches que lui (les mathématiciens) et préparer son futur best-seller : *Le Guide pratique des mathématiciens*.

Un hasard malicieux veut que ces trois paumés s'acoquinent, unissant leurs poisses respectives...

Dans la droite ligne de David Lodge, une satire désopilante du milieu improbable des mathématiciens – par un ex-mathématicien...

La microbiologie des produits pétroliers et ses applications

Jean-Paul Vandecasteele, Frédéric Monot et Daniel Ballerini

Summary

Applications of the petroleum products microbiology

Because of the use on a massive scale of petroleum products, hydrocarbons constitute the most frequent organic pollutants of soils. At a polluted site, natural attenuation is the process by which the pollutants are removed by the joint action of dispersion and biodegradation. Only biodegradation can ensure complete *in situ* removal by mineralization of pollutants. For this reason, both aerobic and anaerobic degradation of hydrocarbons and related products constitute research fields in full expansion. Actually, the remarkable microbial capacities for hydrocarbon conversion can lead to applications in bioconversion that are besides the scope of pollutant degradation, such as microbial desulfurization of petroleum products.

In addition to biodesulfurization, the points discussed involve the aerobic biodegradation of gasoline (over 200 hydrocarbons) and of ethers such as methyl *tert*-butyl ether (MTBE) that are presently important constituents of gasoline, as well as the anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. The discussion also includes soil bioremediation.

Mots-clés

Biodégradation, sols pollués, hydrocarbures, MTBE, biodésulfuration.

Key-words

Biodegradation, polluted soils, hydrocarbons, MTBE, biodesulfurization.

La pollution des milieux terrestres et aquatiques constitue un problème environnemental majeur parce que, du fait de l'échelle massive à laquelle elle intervient, son impact sur la santé humaine et sur la biosphère est devenu très préoccupant. Les hydrocarbures sont les polluants organiques les plus fréquents, ce qui est compréhensible étant donné les quantités énormes utilisées de par le monde, en particulier pour la production d'énergie (production mondiale de pétrole de 3,4 Gt en 1999).

La connaissance du devenir des polluants dans l'environnement est indispensable pour évaluer l'acceptabilité des produits industriels vis-à-vis de l'environnement. Elle l'est aussi pour apprécier les perspectives de restauration des sites pollués. Les processus physico-chimiques, de transfert en particulier, et la biodégradation sont les composantes qui gouvernent ce devenir. Nous traiterons ici du cas des pollutions terrestres par les produits pétroliers.

Les actions à entreprendre lors d'une pollution peuvent être très variées selon la nature du polluant et l'ensemble des caractéristiques du site considéré. C'est pourquoi les études préalables de diagnostic et de risque sont essentielles. Les options qui en ressortent peuvent être une surveillance du site, lorsque les conditions sont réunies pour que l'atténuation naturelle, c'est-à-dire l'épuration du milieu sans intervention humaine, ait une efficacité compatible avec les exigences imposées par le site. La réhabilitation de sites pollués, par des techniques diverses faisant ou non appel à la microbiologie, est une autre option qui s'impose dans d'autres cas. L'évaluation de l'atténuation naturelle et des possibilités de biorestauration pour un site donné est un objectif ambitieux qui sollicite fortement les connaissances des processus de biodégradation. Ces connaissances concernent les capacités des microflores indigènes ainsi que les caractéristiques environnementales locales, différentes selon les sites, qui gouvernent la cinétique des processus de biodégradation.

Nous présenterons d'abord les polluants des sols. Nous donnerons ensuite un aperçu des recherches menées en microbiologie en mettant l'accent sur quelques exemples, y compris sur des applications dans d'autres domaines comme la bioconversion. Enfin, nous évoquerons la biorestauration de sites contaminés par les hydrocarbures.

Les hydrocarbures, polluants des sols

De nombreux cas de contamination du sol et de l'eau souterraine par des hydrocarbures sont découverts en permanence dans les pays industrialisés, et la majorité de ceux-ci ont des incidences importantes sur l'environnement, tant du point de vue de la qualité des ressources en eau potable que du point de vue de la sécurité.

Les hydrocarbures sont les principaux types de polluants organiques des sols, avant les solvants chlorés et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Ils sont la cause d'au moins 50 % des pollutions répertoriées en France. Parmi les produits pétroliers mis en cause, viennent en premier les carburants (essences, gazole, kérosène), suivis des fiouls de chauffage puis des produits plus lourds telles les huiles de lubrification et de graissage.

Le produit pétrolier, déversé sur un sol qui est un milieu hétérogène formé de graviers, sables, limons, argiles et matières organiques, de porosité et perméabilité variables, peut être piégé au-dessus de la nappe phréatique ou l'atteindre plus ou moins rapidement, en fonction de la nature du sol et de la qualité et de la quantité de polluant (figure 1).

Plus un composé est volatil, moins son affinité pour la matrice poreuse sera grande. Plus grande est son hydrophobicité, plus son adsorption sur le solide sera importante, la présence d'argile et de matière organique favorisant la rétention des hydrocarbures dans un sol. La

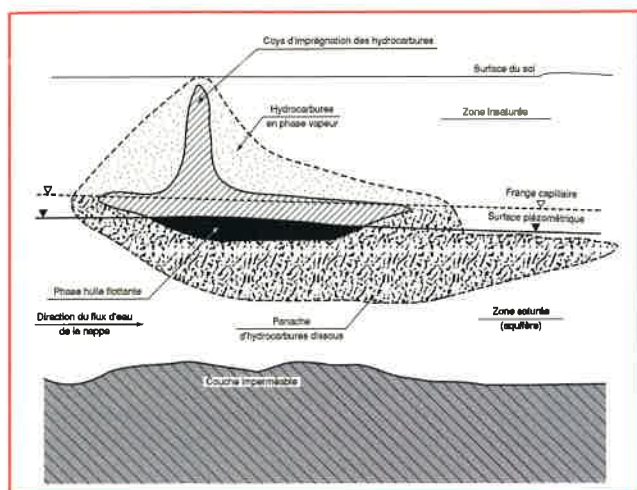


Figure 1 - Migration des hydrocarbures dans les sols.

partie des hydrocarbures non retenue dans le terrain au cours de son trajet vertical atteint le niveau de l'eau souterraine où, retrouvant une mobilité horizontale propre à la zone saturée, elle s'étale. Au contact des deux zones, insaturée et saturée, une frange capillaire soumise aux battements verticaux de la nappe se développe sur une hauteur variable. Ainsi, le volume de milieu poreux dans lequel le produit pétrolier est immobilisé à l'état résiduel peut se trouver très largement augmenté. L'huile résiduelle constitue une source continue d'hydrocarbures susceptibles de contaminer la nappe sur de longues périodes.

Au contact de l'eau, les hydrocarbures les plus solubles vont créer un panache de polluants dissous. La solubilité des hydrocarbures est directement liée à leur nature. Alors qu'une essence est composée à parts sensiblement égales d'hydrocarbures saturés et d'hydrocarbures aromatiques (surtout des alkylbenzènes), la composition de la fraction dissoute dans l'eau est aromatique à 96 % environ.

La microbiologie des hydrocarbures

Les questions posées

D'une façon générale, la dégradation aérobie existe à des degrés divers pour la majorité des composés organiques, sauf les plus lourds [1]. La dégradation aérobie des hydrocarbures pétroliers sera développée plus loin. Il faut noter par ailleurs les progrès importants relatifs à la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), essentiellement les HAP non substitués d'origine pyrolytique [2].

Un point général, qui sera illustré par la suite, est l'importance de la dégradation par co-métabolisme, c'est-à-dire la dégradation par un micro-organisme d'un composé qui ne peut en assurer la croissance. Ce phénomène, fréquent en conditions aérobies, est lié pour une bonne part à l'attaque par des oxygénases. Il constitue le seul mode de dégradation connu pour le trichloroéthylène par exemple.

L'existence de la dégradation anaérobie d'hydrocarbures comme les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène, xylènes) et les *n*-alcane a été reconnue assez récemment et l'étude des processus impliqués est en plein essor [3]. Ce point est tout à fait remarquable car on s'était longtemps demandé si le mode d'attaque d'un hydrocarbure par une oxygénase n'était pas le seul mécanisme d'activation biologique

efficace de ce type de structures. La dégradation anaérobie des hydrocarbures est importante dans le cas des sites contaminés, surtout pour les hydrocarbures suffisamment solubles pour diffuser dans les zones anoxiques des aquifères. Cette préoccupation explique les développements récents de ce domaine. Le cas des BTEX sera détaillé plus loin.

La dégradation aérobie des produits pétroliers

Des études très détaillées concernant la dégradation aérobie des hydrocarbures ont été menées depuis les années 60 [1]. Les hydrocarbures sont des composés hydrophobes. La solubilité très faible de la plupart d'entre eux implique des mécanismes spécifiques d'accès au substrat, tels que la production de biosurfactants, qui ont fait l'objet de nombreux travaux [1]. En fait, les capacités remarquables de conversion des hydrocarbures dont fait preuve le monde microbien, par exemple celle d'utiliser des hétérocycles soufrés comme sources de soufre pour leur croissance, sont susceptibles d'autres applications que la dégradation des polluants (voir encadré).

La connaissance du métabolisme des hydrocarbures repose principalement sur un certain nombre d'hydrocarbures individuels, essentiellement les BTEX et les *n*-alcane qui sont rapidement dégradés, de quelques isoalcane et du cyclohexane [1]. De ce fait, il existe peu de données précises dans le cas du métabolisme des produits complexes comme les produits pétroliers. Un aspect important est la dégradation par co-métabolisme qui prend toute sa signification dans la dégradation de mélanges.

Les pollutions par les essences constituent l'un des cas les plus importants de pollutions des sols et aquifères et les travaux ci-dessus ne donnent que des réponses partielles aux questions posées car les essences contiennent en fait plus de 200 composés identifiables. Des études directes des capacités de dégradation des microflore de l'environnement à leur égard ont été récemment effectuées. Solano-Serena et al. [4] ont déterminé le devenir de ces composés lors de leur dégradation aérobie par des microflore directement prélevées dans différents milieux de l'environnement. Les sols naturels et les boues de station d'épuration présentent une capacité de dégradation élevée (90 à 95 % de dégradation en 30 jours). Cette capacité élevée des microflore de milieu non pollués est la conséquence de la présence ubiquiste d'hydrocarbures produits par les plantes. De plus, la plupart des sols pollués sont capables d'une dégradation quasi complète. La dégradabilité intrinsèque de l'essence est donc quasi totale en conditions aérobies mais fait appel pour certains composés à des microflore spécialisées. En effet, quelques hydrocarbures, plus difficilement dégradables, sont dits récalcitrants. Il s'agit de certains triméthylalcanes, notamment ceux qui portent un carbone quaternaire comme le 2,2,4-triméthylpentane (isooctane), qui sont dégradés souvent incomplètement par co-métabolisme. Cependant, certaines souches spécialisées, présentes dans les milieux pollués, peuvent les utiliser pour leur croissance.

On ne dispose pas de résultats de biodégradabilité aussi détaillés que pour l'essence dans le cas des autres produits pétroliers. Il faut noter la multiplicité des composés dans les fractions pétrolières plus lourdes que l'essence, qui est déjà de plusieurs milliers pour un gazole (fraction C₁₀ à C₂₀), ce qui ne permet pas leur résolution chromatographique en composés individuels. Cependant, on a pu déterminer des

La désulfuration microbiologique des produits pétroliers

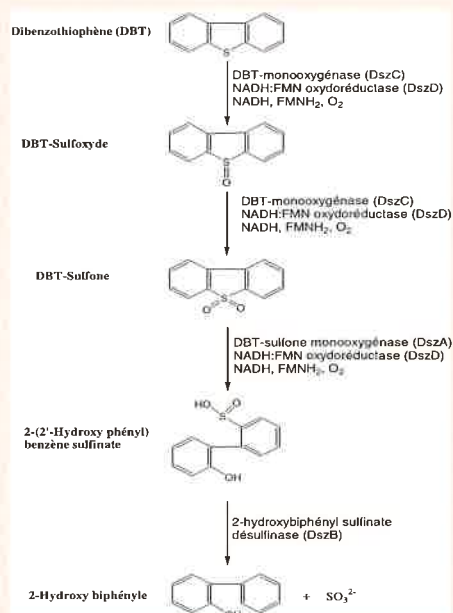
Les conséquences sur l'environnement et sur la santé humaine des émissions d'oxyde de soufre liées à la combustion des combustibles fossiles ont contraint les législateurs à imposer des réductions de plus en plus draconiennes des teneurs en soufre des carburants automobile. A titre d'exemple, dans l'Union Européenne, la teneur maximale en soufre du gazole, qui était de 0,3 % en 1994, sera de 50 ppm en 2005 et probablement de 10 ppm en 2010. Les surcoûts induits au niveau des procédés d'hydrodésulfuration (HDS) utilisés dans les raffineries sont tels qu'un intérêt s'est manifesté à l'égard d'autres procédés comme la désulfuration microbiologique. En effet, depuis le début des années 90, plusieurs bactéries aérobies capables d'oxyder spécifiquement, en sulfite, le soufre de composés comme le dibenzothiophène (DBT), composé utilisé comme modèle pour les études de désulfuration de coupes pétrolières comme le gazole, ont été isolées et leur mode d'action sur le DBT élucidé [1] (voir figure).

Ces micro-organismes oxydent le DBT successivement en sulfoxyde, sulfone et sulfinate avant de conduire au produit final, le 2-hydroxy biphenyle. Cette voie catabolique, fréquemment appelée voie des 4S, a été étudiée principalement chez *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, première souche isolée utilisant le DBT comme seule source de soufre pour sa croissance. Les gènes de *R. erythropolis* IGTS8 impliqués dans cette voie ont été localisés, caractérisés, séquencés et clonés. De même, les différentes enzymes ont été purifiées et caractérisées. Les deux premières réactions d'oxydation du DBT sont catalysées par une même mono-oxygénase, DszC, et nécessitent deux molécules d'oxygène et deux molécules de NADH. DszA est également une mono-oxygénase. Pour être actives, ces deux enzymes nécessitent de la flavine mononucléotide sous forme réduite (FMNH₂) qui est fournie par une NADH:FMN oxydoréductase (DszD). Enfin, la désulfinate, DszB, est une enzyme qui catalyse une réaction enzymatique jusqu'alors ignorée. Le génotype *dsz* semble bien conservé au sein des souches capables de désulfurer le DBT, quelle que soit leur origine.

La nature complexe du système multi-enzymatique de désulfuration condamne *a priori* l'emploi des enzymes purifiées et il est plus raisonnable d'envisager l'utilisation de cellules entières non proliférantes. En termes de procédés, deux étapes sont alors inévitables, la production de cellules actives par fermentation

précédant leur mise en œuvre en bioconversion. Cette dernière est réalisée en milieu aéré et biphasique comprenant une phase aqueuse contenant le biocatalyseur et une phase organique constituée de l'huile à traiter. De nombreux travaux ont été consacrés à l'amélioration des souches, notamment en vue d'augmenter leur activité [2]. Ceux-ci émanent principalement de la société américaine Energy BioSystems Corporation (dénommée Enchira depuis quelques mois) et d'équipes japonaises. Les avancées les plus marquantes sont à mettre au compte de la génétique (mutants dérégulés*, surexpression des enzymes de la désulfuration, clonage...). Un développement récent concerne l'application de techniques d'évolution moléculaire dirigée *in vitro* pour obtenir de nouvelles enzymes ayant des propriétés différentes, par exemple une spécificité plus large permettant d'agir sur les dibenzothiophènes alkylés très réfractaires à l'HDS [3].

En dépit de tous ces progrès, la biodésulfuration n'a pas encore connu de développement dans le domaine du raffinage. Pourtant, du point de vue énergétique (bilan en CO₂), les conditions opératoires douces requises plaident en sa faveur. Néanmoins, le procédé reste complexe et sa fiabilité à grande échelle doit être démontrée. Dans le même temps, les procédés et les catalyseurs d'HDS ont été améliorés. Par conséquent, l'insertion d'un procédé de biodésulfuration dans un schéma de raffinage comporterait un risque jugé encore trop démesuré par rapport à une HDS profonde. C'est peut-être ce même raisonnement qui a poussé la société Enchira à envisager la valorisation de ses recherches dans la synthèse de détergents à partir de sulfinate de dibenzothiophènes produits par des souches mutantes *dszB* ne produisant pas la dernière enzyme de la voie des 4S [2]. La biodésulfuration connaîtrait alors une retombée indirecte inattendue qui pourrait peut-être faciliter son implantation ultérieure dans les raffineries.



Voie des 4S de biodésulfuration du dibenzothiophène.

[1] Oldfield C., Pogrebinsky O., Simmonds J., Olson E.S., Kulpa C.F., *Microbiology*, **1997**, 143, p. 2961.

[2] Monticello D.J., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2000**, 11, p. 540.

[3] Coco W.J., Levinson W.E., Crist M.J., Hektor H.J., Darzins A., Pienkos P.T., Squires C.H., Monticello D.J., *Nature Biotechnol.*, **2001**, 19, p. 354.

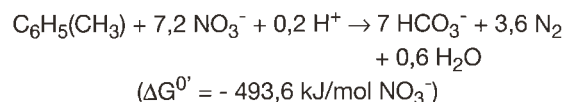
* mutant dérégulé : mutant chez lequel la production d'enzyme n'est plus sensible à la répression (en l'occurrence par le sulfate).

taux de dégradation de l'ordre de 65 % pour un pétrole brut « Arabian light », de 70 à plus de 90 % pour des gazoles selon leur composition, et de près de 10 % pour un fioul lourd No 2. La biodégradation des composés lourds est limitée en particulier par leur accessibilité aux micro-organismes.

La dégradation anaérobie des hydrocarbures monoaromatiques

La dégradation anaérobie est particulièrement importante pour le devenir des BTEX dans les aquifères. La plupart de ces constituants majeurs de l'essence peuvent être dégradés en conditions anaérobies par des bactéries utilisant comme accepteurs d'électrons NO₃⁻, Fe³⁺, SO₄²⁻, ou par des bactéries fermentatives (réducteurs de protons) en association syntrophique avec des méthanogènes (réducteurs de CO₂) [3]. Par exemple, le bilan de la

minéralisation du toluène par les bactéries dénitrifiantes capables de croissance sur cet hydrocarbure, s'écrit :



Le mode d'activation initiale le plus fréquemment observé en anaérobiose, très récemment élucidé, est illustré dans la figure 2 pour le cas du toluène.

Il s'agit d'un mécanisme radicalaire d'un type nouveau permettant la fixation de fumarate sur l'hydrocarbure [3]. La réaction est catalysée par la benzylsuccinate synthase qui a été purifiée chez *Azoarcus T.* Ce mode d'activation a également été observé dans la dégradation anaérobie des *n*-alcane. Le benzylsuccinate formé à partir du toluène est métabolisé en benzoyl-CoA. Cet intermédiaire central dans la dégradation de beaucoup de composés aromatiques subit une désaromatation réductrice et une ouverture du cycle

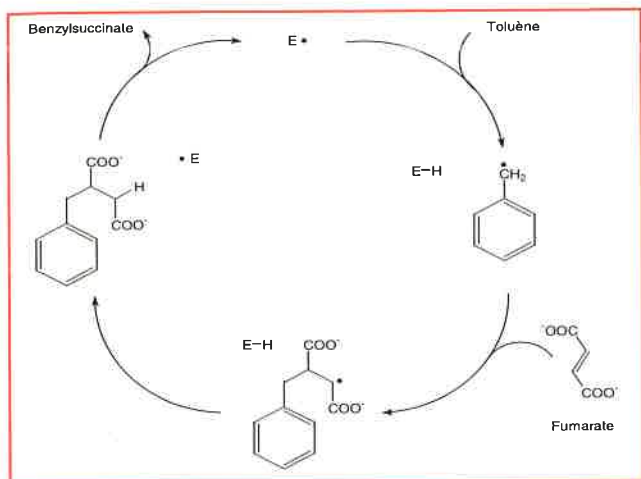


Figure 2 - Mécanisme d'activation anaérobie du toluène par la benzylsuccinate synthase (adapté de [3]).

La forme active de l'enzyme contient un groupe sous forme radicalaire (E*) qui fixe un atome d'hydrogène du groupe méthyle du toluène, formant un radical benzyle qui réagit sur la carbone sp^2 du fumarate. L'atome H fixé à l'enzyme (E-H) réagit avec le radical benzylsuccinyle et régénère la forme radicalaire de l'enzyme.

suivi par une séquence réactionnelle comparable à la β -oxydation des acides gras.

Le cas des éthers-carburants

Des produits oxygénés, des éthers ou des alcools, sont des composants communs des essences qui améliorent l'indice d'octane et l'efficacité de la combustion. Les structures de produits classiques sont présentées ci-dessous :

$\text{CH}_3\text{OC}(\text{CH}_3)_3$	méthyl <i>tert</i> -butyl éther	MTBE
$\text{CH}_3\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	<i>tert</i> -amyl méthyl éther	TAME
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_3)_3$	éthyl <i>tert</i> -butyl éther	ETBE
$\text{HOC}(\text{CH}_3)_3$	alcool <i>tert</i> -butylique	TBA

Le MTBE (capacité mondiale de production 25 Mt) est de loin le produit le plus utilisé, surtout aux États-Unis et à des teneurs importantes (jusqu'à 15 % en volume de l'essence). L'ETBE est notamment utilisé en France. Du fait de son usage massif, le MTBE a été détecté, principalement aux États-Unis, dans les nappes aquifères et les eaux de surface où sa présence pose un problème du fait des effets possibles sur la santé et d'autres propriétés indésirables (goût et odeur des eaux contaminées). Le cas du MTBE est intéressant à plusieurs points de vue. Au plan environnemental, sa solubilité élevée (48 g.L^{-1}) et sa mobilité dans les sols conduisent à de longs panaches de pollution dans les aquifères lors des fuites des stockages d'essence. Un aspect essentiel est sa récalcitrance à la biodégradation. Les études de terrain s'accordent pour estimer que, de ce fait, l'atténuation naturelle est lente, avec une demi-vie du MTBE d'au moins deux ans. Le cas des éthers souligne l'importance cruciale des processus microbiens d'auto-épuration du milieu, déjà évoqués, ainsi que ses limites. Le sujet a suscité une importante activité de recherche [5]. Les éthers-carburants sont récalcitrants mais ils ne sont pas réfractaires. Au sujet de la biodégradation en conditions anaérobies, dont la place dans l'atténuation naturelle ne peut être négligée, peu d'éléments positifs peuvent être actuellement avancés. Par contre, en conditions aérobies, la

croissance sur MTBE apparaît possible, bien que difficile. De plus, bon nombre de bactéries dégradent ce composé par co-métabolisme, le substrat de croissance étant souvent un hydrocarbure, notamment un alcane court comme le butane ou le propane. Cette association résulte du fait que le groupement méthyle du MTBE est hydroxylé en *tert*-butoxyméthanol par une monooxygénase dont le NAD(P)H est le co-substrat réducteur, la même enzyme qui effectue l'hydroxylation initiale de l'hydrocarbure utilisé pour la croissance (figure 3). Dans plusieurs cas, cette monooxygénase est un cytochrome P-450.

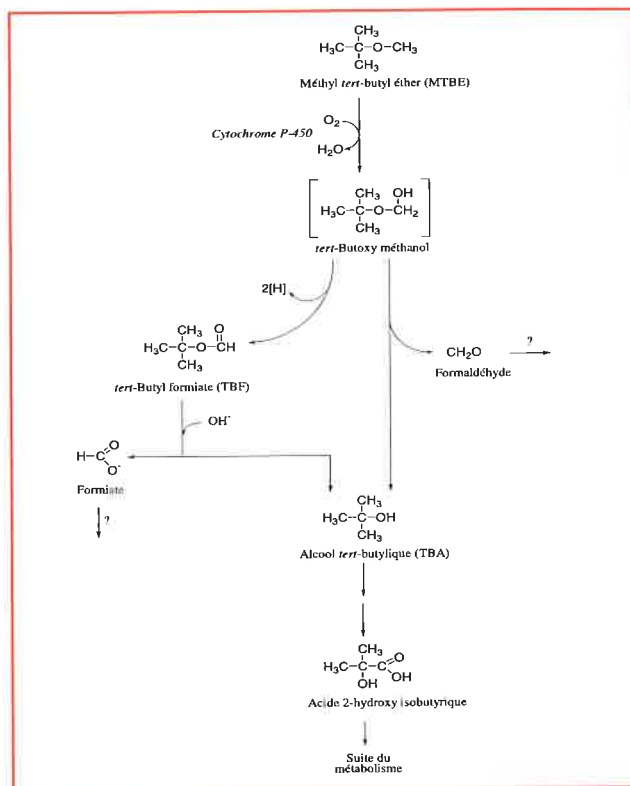


Figure 3 - Voies de dégradation du MTBE par les micro-organismes (adapté de [5]).

La libération du groupement méthoxy (sous forme de formiate ou de formaldéhyde) conduit au TBA qui peut, dans certains cas, être dégradé par la même souche. La figure 3 illustre les raisons de la récalcitrance du MTBE, à savoir l'attaque, souvent par co-métabolisme, d'un groupement méthyle stériquement encombré, suivi par le métabolisme d'un composé en C1 et/ou celui d'un autre composé récalcitrant, le TBA. En fait, un éther homologue, l'ETBE, est métabolisé de façon analogue mais plus facilement que le MTBE, l'hydroxylation qui conduit au TBA libérant dans ce cas un composé en C2 qui peut servir facilement de source de carbone au micro-organisme. Des souches utilisant le TBA comme source de carbone peuvent être isolées. Il existe donc un potentiel microbiologique significatif de dégradation des éthers-carburants, bien que les éléments d'appréciation restent encore limités quant à la répartition dans l'environnement, le rôle physiologique et les possibilités d'évolution des systèmes impliqués. Cependant, la caractérisation des gènes impliqués dans la dégradation de l'ETBE vient d'être effectuée [6]. On peut donc espérer que les sondes d'acides nucléiques dérivées de la séquence des gènes concernés se révéleront utiles pour détecter une fraction significative des

souches capables de dégrader les éthers-carburants dans les environnements contaminés.

Traitements biologiques des sols pollués

Pratiquement, ce sont les pollutions pétrolières qui ont donné l'occasion de développer le plus grand nombre de techniques de restauration des sites contaminés [7] : traitements physiques (lavages à l'eau et/ou aux solvants), thermiques (combustion catalytique, incinération, désorption thermique), biologiques.

Les techniques de biorestauration, qui méritent d'être encore améliorées, sont en plein essor [8]. Elles utilisent la capacité des micro-organismes à améliorer la qualité de l'environnement, en éliminant complètement le polluant (c'est le processus dit de minéralisation au cours duquel la molécule organique est transformée en CO₂ et H₂O avec une faible production de biomasse), ou en le transformant en d'autres composés moins toxiques et plus facilement éliminables du milieu.

Avant de procéder à l'opération de dépollution du site, une étude de biotraitabilité doit être réalisée. Cette étude, qui doit aboutir à la sélection de la technologie la mieux adaptée, examine différents critères comme la biodégradabilité et la toxicité des contaminants, la présence dans le sol de micro-organismes capables de dégrader les polluants en place, les caractéristiques du sol, les teneurs en éléments minéraux (N,P) et en oxygène, la présence ou non d'autres produits susceptibles d'inhiber les processus microbiologiques (des métaux lourds par exemple)...

Si l'apport de bactéries exogènes, spécifiquement adaptées au polluant mis en cause, est parfois proposé – c'est le concept dit de bioaugmentation – on s'accorde à penser que très souvent dans le cas des hydrocarbures, les facteurs limitant leur biodégradation rapide sont essentiellement la teneur en oxygène nécessaire au métabolisme aérobie des micro-organismes et, dans un second temps, la concentration en éléments nutritifs minéraux à base d'azote et de phosphore. Le concept de biostimulation, appliqué lors de la mise en œuvre des procédés biologiques de dépollution,

visé à pallier ces limitations. L'apport de micro-organismes est justifié quand les capacités dégradatives de la microflore indigène sont limitées ou inexistantes, en dépollution des aquifères et pour des opérations *ex situ*.

Conclusions

La biodégradation est le processus essentiel de l'épuration d'un milieu pollué dont la maîtrise exige des connaissances approfondies du métabolisme et de l'écologie des systèmes considérés. Ces connaissances, pour ce qui est des hydrocarbures et des xénobiotiques apparentés, couvrent un domaine particulièrement vaste. La grande diversité des structures hydrocarbonées naturellement présentes dans l'environnement est à la base des capacités étendues de biodégradation observées. Une contribution très importante est attendue des outils génétiques maintenant disponibles.

Notre présentation a mis l'accent sur la microbiologie de la biodégradation et sur la biorestauration des sols pollués. L'étude sur le terrain de l'atténuation naturelle en relation avec les conditions locales qui déterminent l'activité des microflores est une orientation qui s'est fortement développée ces dernières années. Les travaux concernent en particulier l'évolution dans les aquifères des pollutions par le MTBE, par les BTEX et par les solvants aliphatiques chlorés [9].

Références

- [1] Ratledge C., *Biochemistry of microbial degradation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994.
- [2] Kanaly R.A., Harayama S., *J. Bacteriol.*, **2000**, *182*, p. 2059.
- [3] Spormann A.M., Widdel F., *Biodegradation*, **2000**, *11*, p. 85.
- [4] Solano-Serena F., Marchal R., Lebeault J.-M., Vandecasteele J.-P., *Biodegradation*, **2000**, *11*, p. 29.
- [5] Fayolle F., Vandecasteele J.-P., Monot F., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2001**, *56*, p. 339.
- [6] Chauvaux S., Chevalier F., Le Dantec C., Fayolle F., Miras I., Glaser P., Béguin P., *J. Bacteriol.*, **2001**, *183*, p. 6551.
- [7] Riser-Roberts E., *Remediation of petroleum contaminated soils*, Lewis Publishers, London, 1998.
- [8] Ballerini D., Gatellier C., Vogel T., *Techniques de traitement par voie biologique des sols pollués*, ADEME Éditions, 1998.
- [9] Suarez M.P., Rifai H.S., *Bioremediation J.*, **1999**, *3*, p. 337.



J.-P.
Vandecasteele



F. Monot

Jean-Paul Vandecasteele¹ est directeur de recherche associé, Frédéric Monot², chef de projets, et Daniel Ballerini³, directeur de Département, à l'Institut Français du Pétrole*.



D. Ballerini

* Institut Français du Pétrole,
1 & 4 avenue de Bois-Préau,
92852 Rueil-Malmaison Cedex.

¹ Tél. : 01 47 52 64 85. Fax : 01 47 5 2 70 01.
E-mail : j-paul.vandecasteele@ifp.fr

² Tél. : 01 47 52 73 53. Fax : 01 47 52 70 01.
E-mail : frederic.monot@ifp.fr

³ Tél. : 01 47 52 62 88. Fax : 01 47 52 70 01.
E-mail : daniel.ballerini@ifp.fr

La phytoremédiation des sols contaminés

Jean-Louis Morel

Summary

Phytoremediation of contaminated soils

Plants provide new ways for soil remediation. The activity of living roots (absorption, exudation of organic compounds, action on physical soil properties) contribute to decrease the negative effects of pollutants, as they are stabilised or eliminated (extraction or degradation). In the presence of plants, hydrocarbons, a rather ubiquitous group of soil pollutants, are degraded faster than in bare soil. Hydrocarbon degrading bacteria are stimulated by root exudates, which also create favourable conditions for co-metabolism. Also, the fragmentation of aggregates as well as the release of surfactants increase the exposure of organic pollutants to microorganism degradation. The phytoremediation technology is efficient to reduce the dissemination of pollutants. On historically contaminated soils, effects are generally discrete within a short period of time and may be more effective in the long run.

Mots-clés

Plantes, racines, exsudats, hydrocarbures, dégradation, rhizosphère.

Key-words

Plant, root, exudate, hydrocarbon, degradation, rhizosphere.

Nouvelle voie de traitement des sols pollués, la phytoremédiation suscite depuis une dizaine d'années un intérêt grandissant. Si l'on dispose actuellement de technologies valables pour le traitement des eaux et des sols, en revanche, les fortes interactions avec la matrice organo-minérale rendent difficile l'extraction ou l'inactivation des polluants des sols à partir des technologies disponibles, sans altérer les propriétés du milieu. Ainsi, en raison de leur potentiel à intervenir sur les polluants des sols, les plantes sont considérées avec un regard nouveau. Avec le Soleil comme source d'énergie, un système racinaire « prospecteur » et un impact modéré sur les propriétés intrinsèques du sol, ce type d'approche apparaît économiquement et écologiquement très attractif pour gérer les sites contaminés. Mais quelles actions peut-on attendre des végétaux vis-à-vis des polluants des sols ? Les effets observés en conditions contrôlées peuvent-ils se traduire en technologies de traitement des sols pollués par les activités agricoles, urbaines et industrielles ?

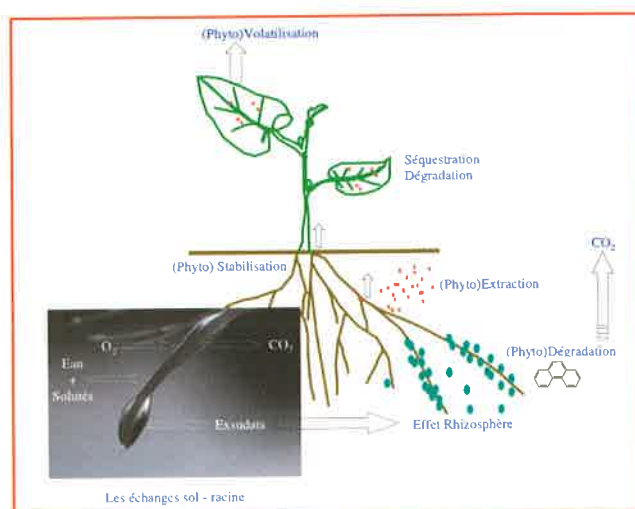


Figure 1 - Actions des plantes sur les polluants et applications pour le traitement des sols pollués.

Les différentes facettes de la phytoremédiation

Les plantes vivantes exercent diverses actions sur leur milieu, se comportant tantôt en puits par le prélèvement d'eau, d'oxygène et d'éléments minéraux, tantôt en source par l'introduction dans le sol de composés organiques (débris végétaux, exsudats racinaires) ou inorganiques (CO_2 , protons), qui contribuent à modifier les propriétés physiques et chimiques et l'activité microbienne du sol environnant (figure 1). A cette diversité d'action, correspondent plusieurs orientations de la phytoremédiation selon les polluants considérés.

• **La phytostabilisation** ou implantation d'un couvert végétal sur une surface contaminée protégeant le sol contre l'érosion éolienne et hydrique ; les polluants sont ainsi immobilisés [1]. Les espèces végétales sont choisies, d'une

part, pour leur tolérance aux composés toxiques présents dans le sol et, d'autre part, pour leur capacité à exclure ces composés du prélèvement racinaire. Les racines peuvent aussi modifier l'état chimique des polluants, par changement du pH rhizosphérique, réduction ou encore séquestration des polluants sur et dans les racines. Les polluants prennent alors des formes moins assimilables par les plantes ou moins susceptibles d'être transportées par les eaux. La phytostabilisation est applicable à tout type de pollution pour autant que des plantes tolérantes soient disponibles.

• **La phytoextraction** se veut une véritable extraction sélective des polluants minéraux des sols. Elle est relativement inopérante pour les polluants organiques comme les hydrocarbures car les plantes prélèvent ces composés en trop faible concentration [2], mais elle peut être notable

pour des composés halogénés [3]. Pour les polluants inorganiques, elle utilise des plantes hyperaccumulatrices qui ont acquis au cours de l'évolution la capacité d'accumuler dans leurs parties aériennes des quantités considérables d'éléments minéraux. Des métaux, comme le Cd, le Ni ou le Zn, normalement présents à l'état de traces, atteignent des concentrations de même niveau que les éléments majeurs comme l'azote. Plus de 400 espèces hyperaccumulatrices ont été identifiées de par le monde, la plupart sont des hyperaccumulatrices de nickel (e.g. *Alyssum murale*, espèce très répandue, qui contient plus de 1 % de Ni dans les feuilles), mais d'autres éléments sont également accumulés (As, Co, Cu, Mn, Pb, Se). Les hyperaccumulateurs offrent des applications multiples, incluant la phytoextraction des métaux des sols pollués et le « phytomining », c'est-à-dire l'utilisation des plantes pour exploiter des gisements métallifères pauvres (Ni). La phytoextraction est une voie prometteuse pour extraire sélectivement certains polluants métalliques particulièrement toxiques, comme le cadmium [4]. Son intérêt, qui repose sur l'existence de plantes sauvages constituant un patrimoine exceptionnel à sauvegarder, montrent une grande efficacité à réduire la disponibilité des polluants métalliques dans les sols.

- **La phytovolatilisation** est la transformation d'éléments comme le sélénium, le mercure ou l'arsenic par les micro-organismes et les plantes ; la méthylation microbienne du sélénium, par exemple, s'avère très efficace dans la rhizosphère. Certaines plantes hyperaccumulant le sélénium ont aussi la capacité de volatiliser l'élément absorbé à partir d'une chaîne de réactions qui conduisent à la formation de diméthylsélénure [5] (figure 2). Cette réaction, spontanée dans les sols, pourrait être amplifiée en stimulant l'activité des micro-organismes par l'implantation d'un couvert végétal approprié, conduisant à l'élimination du polluant du sol. Toutefois, son déplacement vers l'atmosphère peut entraîner de nouveaux problèmes. De même, il a été démontré qu'une part significative des composés organiques halogénés, comme le PCE ou le TCE, prélevés par des espèces ligneuses comme le saule, peuvent être « volatilisés » sous l'action de la transpiration [3].

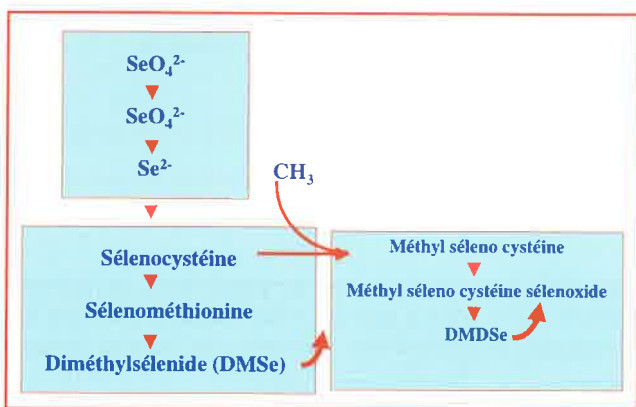


Figure 2 - Métabolisme du sélénium dans la plante [5].

- Enfin, **la phytodégradation** est l'amplification de la dissipation des polluants organiques récalcitrants, induite par la présence de plantes. Étant donné la fréquence des composés organiques dans les sols pollués, notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), une telle voie mérite toute l'attention. Nous consacrerons donc ce qui suit à cette approche du traitement des sols

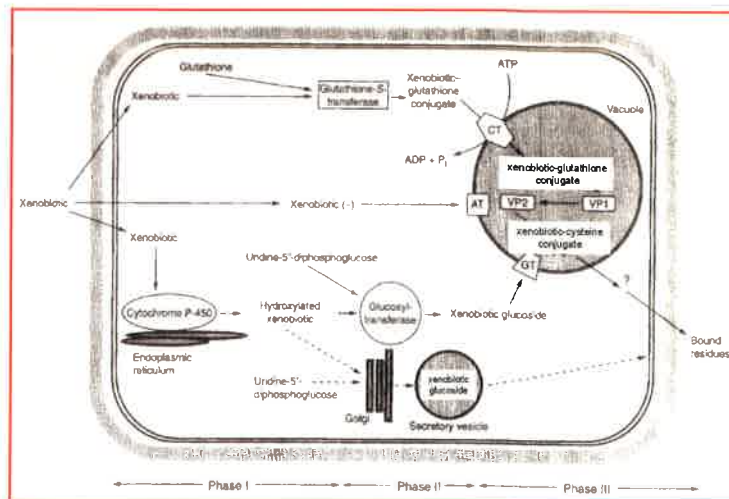


Figure 3 - Processus de détoxification des xénobiotiques dans les cellules végétales [6].

contaminés en insistant d'abord sur les caractéristiques du système sol/micro-organismes/plante, puis sur le devenir de composés organiques comme les hydrocarbures (notamment les HAP) et enfin sur les perspectives d'applications pratiques.

La phytodégradation des polluants organiques

Les plantes peuvent métaboliser de nombreuses molécules xénobiotiques toxiques dans leurs tissus : pesticides, hydrocarbures, composés halogénés [6] (figure 3). Mais elles peuvent aussi contribuer à la dégradation de ces composés organiques récalcitrants dans leur rhizosphère [7]. Les composés halogénés qui ont la capacité à pénétrer dans la plante sont dégradés à la fois dans les tissus (phytoréduction, phytooxydation et assimilation) et dans la rhizosphère (phytoréduction) (figure 4) [3].

La rhizosphère : un bioréacteur efficace

La rhizosphère est l'environnement immédiat des racines, et bénéficie d'apports réguliers de composés organiques issus de celles-ci, appelés exsudats, représentant une très large gamme de molécules, du glucose aux polysaccharides. Utilisés par la microflore du sol comme source de carbone et d'énergie, ces exsudats induisent une augmentation importante du nombre de micro-organismes au voisinage de la racine. L'exsudation est concomitante de la croissance de la plante et représente une dérivation vers le sol de 5 à 20 % du carbone fixé par la photosynthèse, dépendant des facteurs environnementaux (température, lumière, humidité, contraintes physiques, statut nutritionnel, présence de micro-organismes). Des travaux déjà anciens montrent que l'introduction de composés facilement métabolisables dans le sol s'accompagne souvent d'une dégradation accrue de l'humus, amenant à la diminution du stock de matière organique stable du sol. Ce phénomène, appelé « priming effect », affecte-t-il aussi des molécules organiques xénobiotiques comme les hydrocarbures ? Enfin, des symbioses s'établissent entre les racines des plantes et les micro-organismes. Les mycorhizes par exemple, associations entre les champignons et les racines des

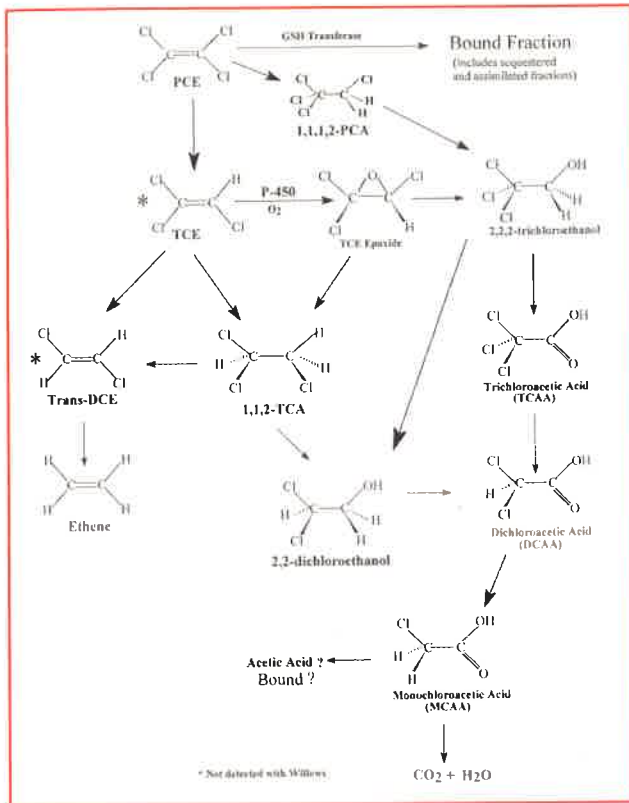


Figure 4 - Phytodégradation du pentachloroéthylène (PCE) (dégradation dans la plante et la rhizosphère) [3].

plantes terrestres, augmentent considérablement la zone d'influence de la plante sur son milieu.

La dissipation des hydrocarbures en présence de plante

Dans les sols, les hydrocarbures subissent une élimination progressive sous l'influence de processus abiotiques (volatilisation, oxydation, photodégradation, lixiviation, formation de résidus liés) ou biotiques (dégradation et minéralisation microbiennes). En présence de plante, une stimulation de la dissipation des hydrocarbures peut être observée, résultant souvent d'une augmentation du nombre de bactéries dégradantes. Des cultures en conditions contrôlées sur une terre contaminée montrent ainsi qu'en présence de plante, la dégradation des hydrocarbures saturés et aromatiques d'un fioul est accélérée [7]. La stimulation, enregistrée durant les premiers stades de l'expérience, est masquée ultérieurement en raison de l'épuisement du milieu et de la présence d'hydrocarbures plus difficilement biodégradables. De même, lorsque les exsudats ou des composés modèles sont la seule source de carbone, la dégradation des hydrocarbures est plus rapide, démontrant ainsi le rôle majeur des composés exsudés.

La rhizosphère est un habitat favorable aux micro-organismes capables de dégrader les composés organiques récalcitrants. Par effet direct, les exsudats augmentent les populations microbiennes et leur activité dégradante et induisent des processus de dégradation par co-métabolisme des molécules récalcitrantes comme les HAP [8]. En contrôlant la nature des communautés microbiennes dans la rhizosphère, ils peuvent aussi favoriser indirectement certaines populations microbiennes : par exemple, les

monocotylédones créeraient les conditions pour une dégradation plus rapide de composés xénobiotiques récalcitrants comme le 2,4-D ou le 2,4,5-T. De même, les bactéries dégradant les PCB sont stimulées par les phénols exsudés par les racines de certaines espèces végétales. Enfin, les mycorhizes sont aussi un facteur important de dissipation des HAP dans un large volume de sol entourant les racines [9]. Les plantes pourraient également, comme certaines bactéries, libérer des émulsifiants qui aideraient à la mise en solution des hydrocarbures et leur dégradation ultérieure. Les racines exposent les composés organiques emprisonnés, provoquant la fragmentation de certains agrégats qui sont alors plus facilement dégradés par les micro-organismes. C'est probablement le même mécanisme qui explique la dégradation rapide des HAP à la suite d'opérations de remaniement de terres polluées (voir photographie en fin d'article). Enfin, la liaison aux cellules des racines et la formation de résidus liés avec la matière organique du sol constituent également une voie significative de dissipation des hydrocarbures.

La phytodégradation : une technologie opérante ?

La phytoremédiation appliquée aux polluants organiques connaît maintenant un essor certain, en particulier aux États-Unis, avec la création d'entreprises spécialisées. Les peupliers, qui réduisent les flux de polluants vers la nappe, stabilisent le sol et favorisent probablement la dégradation des polluants organiques dans leur rhizosphère voire dans leurs tissus (pesticides), sont très largement utilisés pour traiter des sols contaminés par des polluants organiques. Des travaux tendent aussi à montrer que la culture d'espèces herbacées comme les graminées stimule la dégradation des HAP. Par exemple, des HAP de haute masse moléculaire (4-5 cycles), fraîchement introduits dans les sols cultivés avec différentes graminées, sont dégradés plus rapidement qu'en sol nu. Toutefois, dans le cas de sols contaminés par des activités industrielles passées où les composés ont subi différents processus conduisant à leur « vieillissement » ou incorporation dans la matrice solide du sol sous des formes peu disponibles, les informations sont quelquefois contradictoires. C'est le cas lorsque des essais sont conduits en vraie grandeur, c'est-à-dire dans des conditions qui reproduisent au mieux la réalité. Les effets sont alors plus discrets et souvent masqués par l'hétérogénéité du milieu, une propriété caractéristique des sols pollués. Par exemple, la dégradation des HAP présents dans des sols de cokerie ou d'anciennes usines à gaz n'apparaît stimulée que dans la profondeur du sol. Un autre indicateur de l'action de la plante est la réduction de la toxicité des terres contaminées, probablement liée à la réduction de la biodisponibilité des molécules toxiques dans la rhizosphère.

Conclusion

Après une décennie de recherches intensives sur la capacité des plantes à traiter les pollutions les plus complexes associées à la matrice solide des sols, les résultats sont très prometteurs. La progression relativement rapide des travaux dans ce domaine est en partie la conséquence d'une relecture des données déjà anciennes, notamment sur le fonctionnement du système sol/plante/micro-organismes, avec de nouvelles perspectives et de nouvelles méthodes

d'investigation. C'est ainsi que les connaissances sur l'activité rhizosphérique et ses effets sur la matière organique des sols trouvent ici un écho particulier et soutiennent le concept de phytodégradation. Dix ans, c'est malgré tout trop peu pour bien comprendre les processus rhizosphériques impliquant les polluants. Les recherches doivent donc se poursuivre sur les mécanismes de dissipation des hydrocarbures dans la rhizosphère, notamment ceux qui impliquent les molécules les plus récalcitrantes à la dégradation ; elles devraient permettre d'identifier des associations spécifiques plante/micro-organismes qui, par leur efficacité, pourraient être à la base de technologies de traitement en routine plus rapides que l'atténuation naturelle. Sous tous ses aspects, la phytoremédiation offre d'ores et déjà un fort potentiel. Cette biotechnologie représenterait un coût inférieur de 20 % à celui des méthodes physiques. Aux États-Unis, pas moins de 300 sites autorisés par l'Environmental Protection Agency sont en cours d'expérimentation et le marché est estimé à 300 millions de dollars d'ici 2005. Mais, en raison d'une efficacité à court terme pas toujours visible, la technologie n'est pas encore complètement acceptée par rapport à d'autres méthodes plus drastiques. A l'inverse, si elle reçoit un accueil favorable de la part du public, son application à grande échelle requiert encore des travaux sur son efficacité à long terme pour l'élimination des polluants et la protection de la ressource en eau.

Références

- [1] Mench M., Vangronsveld J., Didier V., Clijsters H., *Environmental Pollution*, **1994**, *86*, p. 279.
- [2] Chaîneau C.H., Morel J.-L., Oudot J., *J. Environ. Qual.*, **1997**, *26*, p. 1478.
- [3] Nzengung V.A., Jeffers P., *International Journal of Phytoremediation*, **2001**, *3*, p. 13.
- [4] Schwartz C., Morel J.-L., *6th International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil, ConSoil'98*, Thomas Telford, Londres, **1998**.
- [5] Terry N., Zayed A.M., *Selenium in the Environment*, W.T. Frankenberger and S. Benson, Marcel Dekker, Inc, New York, **1993**, p. 343.
- [6] Coleman J.O.D., Blake-Kalff M.M.A., Davies T.G.E., *Trends in Plant Sci.*, **1997**, *2*, p. 144.
- [7] Chaîneau C.H., Morel J.-L., Oudot J., *J. Environ. Qual.*, **2000**, *29*, p. 569.
- [8] Bouchez M., Blanchet D., Vandecasteele J.-P., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1995**, *43*, p. 156.
- [9] Joner E.J., Johansen A., Loibner A.P., de la Cruz M.A., Szolar O.H.J., Portal J.M., Leyval C., *Environ. Sci. Technol.*, **2001**, p. 2773.

Jean-Louis Morel

est professeur au Laboratoire sols et environnement de l'ENSAIA*.



* Laboratoire sols et environnement, ENSAIA-INPL/INRA, 2 avenue de la Forêt de Haye, BP 172, 54505 Vandœuvre-les-Nancy Cedex.
Tél. : 03 83 59 58 47. Fax : 03 83 59 57 91.
E-mail : Jean-Louis.Morel@ensaia.inpl-nancy.fr



Etude de la phytodégradation des HAP dans des sols industriels (dispositifs lysimétriques).

Nominations, distinctions

Deux membres de la SFC au ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies



Bernard Bigot, chimiste théoricien, professeur des universités, directeur de l'ENS Lyon et ancien directeur de l'Institut de Recherches sur la Catalyse, a été nommé Directeur du

Cabinet de Mme Claudie Haigneré.

Maurice Gross, électrochimiste, professeur des universités, membre de l'université Louis Pasteur (Strasbourg), a été nommé conseiller pour les relations avec les organismes de recherche et les établissements universitaires.

- Vous trouverez la composition complète du cabinet à : <http://www.recherche.gouv.fr/ministre/cabinet.htm>.

Michel Pouchard à l'Académie des sciences allemande



Le Professeur Michel Pouchard a été élu en mai dernier à l'Académie des sciences allemande Leopoldina (« Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina »). Cette

institution prestigieuse célèbre cette année son 350^e anniversaire. Elle comprend une trentaine de scientifiques français, dont sept chimistes.

Michel Pouchard, professeur à l'Institut de chimie de la matière condensée de Bordeaux, est président de la division Chimie du solide de la SFC et membre de l'Institut-Académie des Sciences.

Paolo Brenni, prix Paul Bunge 2002

Paolo Brenni (université de Florence) a reçu le prix Paul Bunge de la Fondation Hans R. Jenemann. Ce prix, parrainé par la GDCh, récompense des recherches exceptionnelles sur l'histoire des instruments scientifiques.

Mouvements

- En juin dernier, à l'issue de l'assemblée générale, **Madeleine Sonnevile** a

succédé à Josette Maurel à la présidence de l'Union des Physiciens.

D'autre part, **André Gilles** succède à Monique Schwob en tant que rédacteur en chef du BUP, le *Bulletin de l'UDP*.

- **Dieter Weichert** succède à Gilbert Touzot en tant que directeur de l'Institut national des sciences appliquées (INSA) de Rouen, où l'on trouve l'unique département de chimie (« Chimie fine et ingénierie ») des INSA.

- **André Renoux**, diplômé de l'ENS Marseille, responsable des synergies vapocraqueurs du groupe Basell en Europe depuis 2000, devient président du SCOB (Syndicat de la chimie organique de base).

- **Claire Dadou-Willmann**, ingénieur de l'École Centrale de Paris, a succédé à Anne-Marie Cardot-Vautier comme secrétaire général de l'UIC. Auparavant, elle dirigeait la Fondation pour la Recherche Médicale.

- **Jean-Jacques Duby**, directeur général de l'École supérieure d'électricité (SUPELEC), devient président du conseil d'administration de l'Observatoire des Sciences et des Techniques (OST). Cet organisme, groupement d'intérêt public, a pour principales missions de produire des indicateurs décrivant les activités scientifiques, technologiques et d'innovation de la France et de nombreux pays.

- **Alain Devic** a été nommé directeur général délégué d'Atofina pour la durée de son mandat d'administrateur. Il représentera la société auprès de l'Administration française, du MEDEF, de l'UIC, ainsi qu'auprès de toutes les institutions ou organismes professionnels en France.

Recherche et développement

La pathologie humaine joue la carte maîtresse : les isoprostanes

Des scientifiques du Laboratoire de chimie biomoléculaire et des interactions biologiques du CNRS ont synthétisé une nouvelle famille de molécules naturelles : les F2- et F4-isoprostanes (F2- et F4-isoPs), isomères des prostaglandines. Elles sont formées *in vivo* par un mécanisme radicalaire non enzymatique de peroxydation lipidique. Ces isoPs possèdent des actions biologiques vasoconstrictrice, mitogène et agrégante plaquettaire.

Les chercheurs ont montré que ces composés semblaient avoir également une implication dans le domaine cardiovasculaire.

- <http://www.forumlabo.com/2002/actua/cnrs/0402isoprostanes.htm>

Source : lettre de Forum Labo Infos, avril 2002.

Origines de la vie

Des équipes de chercheurs néerlandais, français et allemands ont réalisé la synthèse par voie photochimique de 16 acides aminés dans des conditions mimant celles du milieu interstellaire : un mélange de glaces d'eau, d'ammoniac, de méthanol, de monoxyde et de dioxyde de carbone a été irradié au Laboratoire d'astrophysique de Leyde aux Pays-Bas (vide poussé, T = - 261 °C). Une fois ramenés à la température ambiante, les échantillons ont été analysés au Centre de biophysique moléculaire du CNRS à Orléans à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les chercheurs ont identifié 16 acides aminés dont 6 font partie des 20 acides aminés protéiques (glycine, alanine, valine, proline, sérine, acide aspartique).

Le rôle joué par l'apport de matériaux d'origine extraterrestre dans l'apparition de la vie sur Terre fait actuellement l'objet de nombreux débats. Les résultats de ces équipes de chercheurs laissent supposer que des molécules prébiotiques (antérieures à l'apparition de la vie sur Terre) pourraient avoir été déposées sur la surface de la Terre par des météorites, des comètes ou d'autres particules interstellaires.

- Référence : G.M. Muñoz Caro *et al*, Photoproduction of amino acids in simulated interstellar pre-cometary conditions, *Nature*, 28 mars 2002, 416, p. 403.

Source : communiqué du CNRS, 28 mars 2002.

Contacts chercheurs : Centre de biophysique moléculaire, CNRS - Orléans.

Bernard Barbier. Tél. : 02 38 25 55 77.

André Brack. Tél. : 02 38 25 55 76.

Réacteur Fischer Tropsch

On a constaté ces dernières années une nouvelle vague d'intérêt partout dans le monde pour la production d'énergie propre. La valorisation du gaz naturel et du gaz associé au pétrole qui se réalise en deux étapes (vaporeformage/oxydation partielle puis synthèse Fischer Tropsch) permet d'obtenir des carburants qui ont un taux d'impuretés toxiques négligeable par rapport au gazoil ou à l'essence produits à partir du pétrole brut. Les importantes réserves en gaz naturel ont rendu avantageuse la construction des raffineries fondées sur la technologie Fischer Tropsch.

En 1999, l'équipe de jeunes chercheurs du Laboratoire de catalyse (univ. des Sciences et Technologies de Lille) a

proposé une nouvelle approche pour améliorer la performance des procédés Fischer Tropsch. Cette approche est fondée sur l'optimisation d'un ensemble formé par le catalyseur et par le réacteur. Le but particulier de la recherche est le développement de systèmes réactionnels qui aient une régularité structurelle. L'optimisation des conditions de synthèse des catalyseurs, de leur texture et de leur résistance à l'attrition font aussi partie des objectifs prioritaires. L'utilisation de différents types de réacteur catalytique (à lit fixe, à membrane, slurry) et de différents modes opératoires (stationnaire, périodique, à courant d'alimentation réversible...) permet d'améliorer le rendement en hydrocarbures, ainsi que d'obtenir des renseignements sur les étapes élémentaires de la réaction. L'équipe de Lille est ouverte à la collaboration scientifique avec les partenaires industriels et universitaires. Des travaux de recherche contractuels peuvent être effectués dans les domaines de la préparation, de la caractérisation et de l'évaluation de catalyseurs Fischer Tropsch dans différentes conditions réactionnelles. La modélisation de réacteurs peut également être réalisée.

- Contact : Andrei Khodakov. Tél. : 03 20 33 54 37. Fax : 03 20 43 65 61. andrei.khodakov@ec-lille.fr www.univ-lille1.fr/catalyse/



Réacteur Fischer Tropsch fonctionnant en mode transitoire.

Industrie

Aide à la création d'entreprises

Le succès du concours national d'aide à la création d'entreprises de technologies innovantes, organisé par le ministère de la Recherche, avec la participation de l'Anvar et du Fonds social européen, ne se dément pas. Pour sa 4^e édition, près de 1 500 projets ont été recueillis. 224 ont été proclamés lauréats 2002 par le jury national, dont 9 distingués par des prix spéciaux le 11

Répartition des projets lauréats 2002 par secteur d'innovation.

	nombre de lauréats (%)	montant des subventions (%)
Biotechnologies et pharmacie	25,4	27,3
Services informatiques	22,8	25,3
Mécanique, chimie et matériaux	22,7	15,7
Électronique, télécommunications	20,1	24,8
Génie des procédés	8,9	6,8

juillet dernier, en présence de la ministre. Parmi les nombreux enseignements que l'on peut retirer des résultats du concours, notons qu'il révèle particulièrement l'esprit d'innovation et d'entreprise qui anime les docteurs : plus de la moitié des projets lauréats (53 %).

Notons que la chimie occupe une bonne place avec près de 23 % des projets retenus (voir tableau) et le prix spécial attribué à Gabin-Anselme Treboux (38 ans, docteur ès Chimie quantique, université Paul Sabatier, Toulouse III) pour son projet « La chimie quantique au service du vivant » qui a pour objectif de promouvoir l'utilisation de la chimie quantique dans les applications de R & D du secteur pharmaceutique et des secteurs axés sur les sciences de matériaux. Les chimistes informaticiens du projet sont voués à créer des outils prédictifs pour assister la découverte « in silico » de procédés et de composés nouveaux (contact : gabin@inchem-sa.com).

Depuis sa création, le concours a permis de soutenir près de 800 projets (sur 5 200 candidatures déposées) et la création de 400 entreprises qui emploient près de 2 500 personnes.

- Résultats du concours et liste des lauréats : www.recherche.gouv.fr/technologie/concours

ECRIN dans le secteur des nanomatériaux

ECRIN crée une nouvelle action portant sur les nouvelles initiatives de recherche pour la valorisation des architectures nanostructurées et adaptatives, nommée Nirvana et présidée par Frédéric Schuster du CEA. Son objectif est d'organiser la recherche « matériaux » sur un des thèmes générateurs de ruptures, les matériaux nanostructures.

Il s'agit d'acquérir la maîtrise technologique et industrielle de la nano-fonctionnalisation, la nano-structuration et la nano-réactivité, afin de concevoir de nouveaux produits issus de technologies industrielles conventionnelles mais optimisées et de nouveaux procédés de nano-fabrication.

Ce projet, résolument transversal, constitue également le point de départ d'une initiative nationale structurée

dans le domaine stratégique des nanomatériaux pour l'industrie. Les matériaux étant présents dans tous les secteurs de l'activité humaine, cette action a pour objectif d'être un catalyseur d'énergies et d'innovations.

- Contact : Véronique Thierry-Mieg. Tél. : 01 42 79 51 01. thierry-mieg@ecrin.asso.fr

Enseignement, formation et emploi

Annuaire des écoles doctorales

Depuis juillet 2002, l'annuaire des écoles doctorales en sciences chimiques est disponible sur le site de la SFC : outre les fiches descriptives du ministère de la Recherche, vous trouverez notamment tous les renseignements nécessaires concernant ces écoles (coordonnées des responsables, liens vers les sites des DEA, équipes d'accueil, écoles doctorales) à l'aide des fiches détaillées spécialement élaborées par la SFC.

Bourses et aides à la mobilisation internationale

Le ministère des Affaires étrangères maintient sur son site Internet un solide répertoire des soutiens financiers dont peuvent bénéficier les Français qui vont étudier ou faire des stages à l'étranger. Ce répertoire existe également sous la forme d'un guide imprimé *Bourses et aides à la mobilité internationale*, 12 €, 2001, La Documentation française.

- www.diplomatie.gouv.fr/cooperation/universitaire/boursiers/

DU d'ingénierie pharmaceutique

La formation du DU « Ingénierie pharmaceutique » 2002/2003, proposé par la faculté de pharmacie de l'université d'Auvergne et dont les enseignements sont dispensés au Pôle universitaire et technologique de Vichy, se déroulera d'octobre 2002 à juin 2003. Les inscriptions sont possibles jusqu'au mois de septembre.

Les objectifs de cette formation sont d'apporter une expertise à l'échelon de la production pharmaceutique, à l'échelon du contrôle qualité et de l'adaptation aux normes internationales, de former des spécialistes de la production industrielle de médicaments et de compléter les connaissances et savoir faire des cadres et techniciens des industries cosmétique, agroalimentaire et pharmaceutique.

• Renseignements : Pôle universitaire et technologique de Vichy, Administration Biopharmie/Biotechnologie, 1 avenue des célestins, 03200 Vichy.
Tél. : 04 70 30 43 70. Fax : 04 70 30 43 73.
marie.clermont@vichy-communaute.com

Formation continue à l'ENSCP

L'École Nationale Supérieure de Chimie de Paris organise tout au long de l'année des stages de formation continue en chimie, mais également sur demande, suivant vos besoins. Ils s'adressent à des ingénieurs, chercheurs et techniciens supérieurs du secteur privé et public.

Programme du 2^e semestre 2002 :

- 23-27/09 : *Initiation à la spectrométrie de masse*
- 07-11/10 : *Électrophorèse et chromatographie électrocinétique capillaires*
- 18-22/11 : *Techniques séparatives pour l'environnement : théorie, applications et perspectives*
- 18-22/11 : *Dermatologie et cosmétologie.*

• Renseignements : Hélène Fischer, responsable administrative, ENSCP, Direction des relations industrielles, Formation continue, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05.
Tél. : 01 44 27 67 53. Fax : 01 43 29 73 95.
drienscp@ext.jussieu.fr, www.enscp.jussieu.fr

Hygiène-sécurité environnement

Un écolabel européen pour une gamme de détergents

Salveco, start-up vosgienne de biotechnologies à la pointe de la « chimie verte », a obtenu en juin dernier le premier écolabel européen accordé aux nettoyants universels satisfaisant aux exigences environnementales tout en garantissant des performances identiques à celles des produits analogues. Ce label, décerné par Afnor Certification, a été attribué à sa gamme de produits détergents et nettoyants, formulés à base d'huiles essentielles et 100 % biodégradables, développés en partenariat avec l'Institut

Compte rendu du 6^e Congrès de la Société Algérienne de Chimie

Ce 6^e congrès s'est tenu à Sétif du 14 au 16 mai dernier et a accueilli 462 participants provenant de 28 villes universitaires du pays. Tous les travaux du congrès, les conférences, communications orales et posters, les expositions de matériel de laboratoire et produits chimiques, ont eu lieu dans l'enceinte même de l'université de Sétif. Sept thèmes ont été développés : chimie organique, chimie théorique, chimie inorganique, chimie des matériaux, chimie physique, didactique de la chimie et génie des procédés.

Les 3 conférences plénières ont eu pour thèmes :

- *Impact de la recherche scientifique et technologique sur le développement et la compétitivité des entreprises ; expériences étrangères et attentes nationales*, Pr. H. Kerdjouj (USTHB, Alger),
- *La mondialisation et la formation des hommes*, Pr. C.E. Chitour (ENP-Harrach, Alger),
- *Chimie de coordination et médecine*, Pr. O. Benali-Baitich (USTHB, Alger).

Il y a eu également 6 conférences thématiques :

- *Prévention de la pollution dans l'industrie de l'électrodecomposition.*
- « *Revue des techniques et étude de*

- cas* », Dr. K.E. Bouhidel (Univ. Batna),
- *Chiralité moléculaire. Enjeux, implication et modes d'accès*, Pr. L. Zouioueche (Univ. Annaba),
- *Transfert d'ions métalliques contenus dans des matrices solides lors d'électrodialyses*, Dr. D.E. Akretche (USTHB, Alger),
- *Matériaux organiques pour l'opto-électronique : étude théorique*, Dr D. Hammoutene,
- *Modélisation d'un réacteur industriel à lit fluidisé : oxychloruration de l'éthylène*, Dr. M.S. Koutchoukali (UFA, Sétif),
- *Le problème de la conformation des polymères en anneaux : que peut-on déduire des expériences de diffusion des neutrons aux petits angles ?*, Pr. H. Benoit (Institut Charles Sadron, Strasbourg).

D'autre part, il y a eu 108 communications orales et 227 communications par posters.

Le 15 mai, lors de l'assemblée générale des adhérents de la SAC, un conseil national de 35 membres a été élu. Conformément au statut, le nouveau conseil national a procédé à l'élection des 12 membres du bureau national et du septième président de la SAC en la personne du **Dr. N. Djeghri**, pour un mandat de trois ans, succédant ainsi au Pr. M. Mouzali.

Français du Pétrole qui a participé à la conception de l'unité de production.

La valeur ajoutée du laboratoire Salveco, spécialiste de la physico-chimie organique et colloïdale, a été de permettre que les molécules puissent être judicieusement associées entre elles, de manière miscible et stable, par un procédé d'hydrosolubilisation breveté mondialement.

La pollution, un problème d'intérieur

L'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur va lancer dès la fin 2002 une campagne nationale d'étude sur les causes de la pollution de l'air intérieur. Cette décision fait suite à une étude pilote réalisée à l'aide de questionnaires et de calculs de concentrations qui ont révélé ce type spécifique de pollution. Il ressort entre autre que certains produits chimiques, tels que des composés organiques volatils (COV),

saturent particulièrement l'air intérieur de nos habitations.

La mini-campagne de mars à juillet 2001 effectuée par le CSTB (Centre Scientifique et Technique du Bâtiment) a servi de répétition à celle qui verra le jour à partir de 2003. Les tests menés sur 99 bâtiments répartis en 3 localisations régionales (Marseille, Strasbourg et Nord/Pas-de-Calais) ont donc permis de valider et améliorer les méthodes et outils d'investigation qui serviront à la prochaine enquête. Celle-ci portera sur 800 sites répartis sur l'ensemble du territoire et étudiera le transfert de pollution atmosphérique entre l'extérieur et l'intérieur grâce à des capteurs placés dans les locaux testés.

Des résultats du projet pilote, il ressort qu'une des causes de la pollution de l'air intérieur est d'origine chimique. Cette pollution est en partie due à nos habitudes quotidiennes (produits d'entretien, cosmétiques...) ainsi qu'aux matériaux de construction (peintures, vernis...).

De nombreux produits chimiques sont ainsi présents dans l'air que l'on respire et en quantités autres qu'à l'état de traces. Au premier rang desquels certains composés organiques volatils et des aldéhydes, du dioxyde d'azote, du monoxyde de carbone et du dioxyde de carbone. Par exemple, on retrouve 16,7 fois plus d'hexaldéhyde dans l'air intérieur que dans celui présent à l'extérieur, selon les premiers résultats de l'enquête. D'après Séverine Kirchner, coordinatrice scientifique de l'étude, l'air des écoles semble cependant plus « sain » que celui de nos habitations. « *Le problème principal est que l'OMS ne fait aucune recommandation sur les concentrations à ne pas dépasser pour la santé pour beaucoup de COV* » déplore-t-elle.

• Renseignements : www.cstb.fr

Collin Droniou

La chimie au quotidien



11^e édition de la Fête de la Science du 14 au 20 octobre 2002

La science doit être proche de tous et devenir une science conviviale partagée par la société. C'est l'objectif de la Fête de la science qui est désormais un rendez-vous attendu entre le monde de la recherche et le grand public, une rencontre ludique et captivante où sont mis en partage les avancées de la science, mais aussi les enjeux, les incertitudes, les questionnements qu'elles impliquent.

En 2001, cette semaine scientifique a attiré quelques 1 100 000 visiteurs, dont près de 250 000 scolaires, avec plus de 2 000 manifestations impliquant 5 000 chercheurs, 70 Villages des sciences et plus de 750 communes.

Cette année, l'accent sera mis sur les thèmes prioritaires du ministère de la Recherche : les sciences de la vie, l'environnement, l'énergie et le développement, les sciences et technologies de l'information et de la communication et l'espace. Le comité national est présidé

par Guy Ourisson, chimiste, ancien président de l'Académie des Sciences.

• www.recherche.gouv.fr

Les jeunes questionnent la science

Pour en savoir plus sur les rapports qu'entretiennent les jeunes avec la science, le Palais de la découverte vous invite à un Café de la Rotonde le 16 octobre 2002 de 18 h à 20 h, dans le cadre de la Fête de la Science.

La science est au cœur de nos vies, mais on constate malgré tout que les filières scientifiques sont de plus en plus désertées. Les raisons sont multiples. Aussi, une rencontre entre des jeunes et des scientifiques, dont des personnalités telles Pierre Gilles de Gennes, paraît essentielle. Les plus timides peuvent poser au préalable leurs questions par mail et ainsi amorcer le dialogue en amont.

• Questions et inscription :

par mail : jeunesetsciences@palais-decouverte.fr

ou par fax : 01 40 74 86 00.

<http://www.palais-decouverte.fr>

Images de science

Deux festivals internationaux sont au programme pour cet automne 2002 :

- *Le 17^e festival international du film scientifique*, à Orsay du 14 au 20 octobre.

• Renseignements : www.mairie-orsay.fr

- *Le 19^e festival international de l'émission scientifique de télévision*, à Paris du 30 septembre au 3 octobre. Cette manifestation fait partie de la fête du « voir et savoir » (28 septembre-27 octobre).

• www.cnrs.fr/imagescience

L'air dans tous ses états 24 septembre-31 décembre 2002



A partir du 24 septembre 2002, le Palais de la découverte accueillera « *L'air dans tous ses états - 100 ans d'Air Liquide* », exposition organisée dans le cadre des **100 ans d'Air Liquide**.

Généralement invisibles, mystérieux, les gaz sont partout autour de nous, souvent essentiels à nos vies : il fallait bien qu'on leur rende la place qu'ils méritent en les faisant connaître ou redécouvrir. C'est ce que le public va pouvoir faire en visitant une série d'espaces qui leur sont exclusivement consacrés :

- *l'espace Air* abordera sa composition et les différentes façons dont on extrait ses principaux constituants,

- *l'espace Oxygène*, où l'on évoquera tout naturellement le mécanisme de la respiration. Dans un tout autre registre, cet espace montrera pourquoi et comment on utilise l'oxygène pour souder et couper les métaux, ou encore comment l'oxygène aide à produire « propre » du verre, de l'acier ou à fabriquer des plastiques recyclables,

- *l'espace Azote* où l'on verra le rôle du gaz dans la fabrication des semi-conducteurs ou « puces » qui équipent désormais nos ordinateurs, nos téléphones portables ou nos voitures. L'azote est aussi un acteur majeur dans la conservation de nos aliments et la chaîne du froid et, à ce titre, il participe à notre sécurité alimentaire,

- *l'espace Hydrogène* qui sera l'occasion de montrer comment Air Liquide participe à l'aventure spatiale, dans le cadre du programme Ariane. L'hydrogène est aussi l'ingrédient indispensable à la fabrication d'essences dépourvues de soufre, donc plus respectueuses de l'environnement.

- *l'espace Gaz rares*. Hélium, xénon, krypton, argon... Cet espace fera toute la lumière sur ces gaz inconnus du grand public et qui ont pourtant de multiples applications dans notre vie quotidienne, dont certaines sont parfois surprenantes !

A l'intérieur de chaque espace gaz, un « point vert » développera une application qui contribue à la préservation de l'environnement.

• Palais de la découverte,

Avenue Franklin D. Roosevelt, 75008 Paris.

Tél. : 01 56 43 20 21. www.palais-decouverte.fr

Une pile à combustible au Pôle Nord

Le premier démonstrateur français de pile à combustible a fonctionné dans le cadre d'une aventure peu commune dans des conditions extrêmes.

Jean-Louis Étienne est de retour du Pôle Nord, après plus de 3 mois passés

sur la banquise, dans le cadre de sa dernière mission d'exploration baptisée « Mission Banquise ». L'Association Française de l'Hydrogène (AFH₂) et ses partenaires – Air Liquide et sa filiale Axane, Areva et sa filiale Cogema et le CEA – ont contribué à cette aventure en assurant à Jean-Louis Étienne la couverture de ses besoins en énergie électrique à bord du Polar Observer (éclairage, ordinateur portable, imprimante, réception et émission de messages... représentant 1 kW par jour), par la fourniture et l'installation d'un générateur électrique non polluant à base d'une pile à combustible de type PEM (proton exchange membrane), alimentée en hydrogène stocké dans une bouteille en fibre de carbone : la Polar Pac (brevet Air Liquide). Ce générateur a été développé pour les besoins du projet par Axane en moins de 3 mois. Une attention particulière a été portée sur le niveau de sûreté du système et également sur la limitation des nuisances sonores. Au-delà de l'intérêt environnemental de la « Mission Banquise », cette expérience permet de démontrer l'évolution et la maîtrise par les équipes Axane/Air Liquide de cette technologie, pour laquelle il est désormais possible d'envisager des applications « grand public » à moyen terme. Plusieurs objectifs ont ainsi été validés au cours de cette mission :

- la conception de cette pile d'un nouveau type permet son utilisation par une personne novice sur le sujet,
- l'excellent fonctionnement de la pile, testée parallèlement, d'une part en situation réelle d'utilisation en conditions extrêmes, et d'autre part en laboratoire,
- des essais d'endurance sur une longue période (près de 1 000 heures) en utilisation continue.

Dès lors, la pile à combustible alimentée par de l'hydrogène peut s'inscrire comme une alternative aux énergies fossiles, dans le respect des engagements internationaux (protocole de Kyoto...), permettant de répondre tant au problème de la dépendance énergétique qu'à celui des émissions polluantes, notamment des gaz à effet de serre. Axane, société créée en mai 2001 par Air Liquide, a pour mission de développer à l'échelon international des systèmes d'équipements complets de production d'énergie, à partir de piles à combustible alimentées par de l'hydrogène. Les récents progrès de développement et l'émergence de nouveaux matériaux permettent d'envisager différentes applications dans les domaines du transport public, du stationnaire, du petit portable et de la distribution d'éner-

gie (voir *L'Act. Chim.*, décembre 2001). Pour le moment, la pile à combustible n'est pas une industrie mais un « artisanat de luxe », cependant, les premières applications industrielles sont prévues d'ici 2005, notamment sur le marché des transports publics urbains.

- www.axane.fr

Produits et services

Catalogue Alfa Aesar 2002-03

Le nouveau catalogue Alfa Aesar Produits Chimiques, Métaux et Matériaux pour la recherche vient de paraître. Cette nouvelle édition comporte un peu plus de 15 000 produits classés dans différents groupes : composés inorganiques, composés organiques, éléments purs et alliages, composés de métaux précieux et catalyseurs, composés organométalliques, terres rares et appareils de laboratoire.

- Pour recevoir un exemplaire gratuit : <http://www.alfa-aesar.com/contact/request.asp?lg=f>

Analyse *in situ* des réactions chimiques, cristallisations et polymérisations



Le ReactRA 4000 de Mettler Toledo Automated Chemistry est un tout nouveau système d'analyse par spectroscopie Raman complémentaire à la spectroscopie IR pour

le suivi *in situ* des réactions chimiques. Il est équipé d'un laser émettant un faisceau à 785 nm amené à l'échantillon via une fibre optique. L'analyse peut s'effectuer indifféremment directement dans l'échantillon ou au travers de la paroi d'un récipient. Cet avantage est particulièrement apprécié par l'opérateur lorsqu'il doit effectuer des mesures de liquides corrosifs susceptibles d'endommager la sonde ou réaliser des mesures successives sans risque de contamination croisées.

Ce faisceau apporte une information en fréquence relative aux vibrations moléculaires de l'échantillon qui sont transmises à un spectromètre haute résolution (1,8 cm⁻¹) équipé d'un détecteur CCD. Le signal obtenu permet d'analyser tous types d'échantillons (des matières premières jusqu'aux produits finaux).

- Mettler Toledo S.A.

18 avenue de la pépinière, 78222 Viroflay Cedex.
Tél. : 01 30 97 17 17. Fax : 01 30 97 16 16.
<http://www.ml.com/home/countries/FRA/welcome.asp>

Nouveau système de pipetage



La nouvelle pipette Bio naturelle Ovation est la première pipette vraiment ergonomique conçue pour réduire l'inconfort, la fatigue et les affections liées au travail, tout en accroissant l'efficacité et la précision.

Elle existe sous six contenances différentes (de 0,2 à 1 000 µL).

- amilabo, 15 rue Lavoisier, Z.I.,
BP 53, 69684 Chassieu Cedex.
Tél. : 04 78 90 56 88. Fax : 04 78 40 67 91.
amilabo@amilabo.com www.amilabo.com

Sonde en Téflon pour liquides corrosifs

Une nouvelle sonde revêtue Téflon PFA pour le radar à ondes guidées (GWR) Eclipse vient élargir la gamme actuelle. Elle est spécialement adaptée pour tous les fluides corrosifs, visqueux ou collants, et n'est pas perturbée par le colmatage. Le Téflon utilisé pour cette sonde résiste à une température de 200 °C et à 50 bar de pression.

- Magnetrol, Z.I. de Mitry-Compans, Le Vinci,
6 rue Becquerel, 77290 Mitry Mory.
Tél. : 01 60 93 99 50. Fax : 01 60 93 99 51.
www.magnetrol.com



Livres



Name Reactions A Collection of Detailed Reaction Mechanisms

Jie Jack Li

416 pages, 79,95 €

Springer Berlin, 2002

Devant le grand nombre de réactions chimiques découvertes et étudiées ces dernières années, un ouvrage les recensant, indiquant leurs mécanismes réactionnels et donnant des références bibliographiques récentes, ne peut être qu'un guide intéressant pour le chimiste organicien.

Voici donc un nouvel ouvrage qui recense 300 réactions de chimie organique et de chimie organométallique, des plus anciennes aux plus récentes. Elles sont présentées sous forme d'un bilan résumant les composés mis en jeu, précisant éventuellement les conditions opératoires particulières. Leur mécanisme est détaillé étape par étape, ce qui permet une bonne compréhension des phénomènes chimiques impliqués, y compris, dans le cas de certaines réactions, le devenir du catalyseur. Sur ce point, il faut juste noter qu'une écriture du mécanisme sous forme de cycle catalytique, comme dans le cas de la réaction de Heck, eût été préférable.

Pour chaque réaction, les références bibliographiques les plus récentes sont indiquées ; on peut ainsi facilement évaluer leur utilité synthétique, ainsi que leur champ d'application. Leur classement par le nom des chercheurs qui les ont développées, une méthode usuelle de description des réactions en synthèse organique, fait de ce livre un outil efficace de travail, aussi bien pour le chercheur, l'enseignant-chercheur, que l'étudiant de 2^e ou 3^e cycle universitaire, car il permet un accès facile et rapide à ces très nombreuses réactions. Par ailleurs, un index détaillé en fin d'ouvrage permet de faire une recherche par d'autres voies, comme la nature de la réaction impliquée ou la

famille de molécules ou de catalyseurs mis en jeu.

Enfin, il faut mentionner la très bonne lisibilité de cet ouvrage dont les pages sont présentées avec beaucoup de clarté bien qu'elles soient riches en informations. Il est seulement à regretter que l'esthétique des schémas n'ait pas été plus soignée.

Il s'agit donc d'un ouvrage de qualité qui sera particulièrement utile aussi bien pour le chimiste débutant que pour un chercheur plus confirmé.

Max Malacria



Les complexes du palladium en synthèse organique

J.-M. Campagne et D. Prim

312 pages, 29 €

CNRS Éditions, 2001

Cet ouvrage est avant tout une initiation à la chimie des complexes du palladium et surtout un guide pratique pour leur utilisation.

L'utilisation des complexes des métaux de transition a conduit aux découvertes les plus spectaculaires et les plus générales en méthodologie de synthèse ces dernières années. Singulièrement, les complexes de palladium permettent de catalyser des réactions de formation de liaison carbone-carbone avec des efficacités et des sélectivités qui en font des méthodes essentielles de la synthèse organique moderne. La catalyse au palladium est décrite dans ce livre d'abord d'un point de vue mécanistique en présentant les différentes étapes selon que l'espèce active est le palladium 0 ou le palladium II (en début et en fin de cycle). Les auteurs décrivent les différentes possibilités découlant de ces cycles catalytiques en fonction du substrat et des réactifs. L'utilisation de complexes de palladium 0 occupe bien évidemment la majeure partie du mémoire. Les étapes essentielles (génération de l'espèce catalytique, addition oxydante, élimination réductrice) sont présentées de façon simple, mais le détail de ces méca-

nismes est repris dans chaque cas. Ainsi, les réactions de Heck, de Kumada-Corriu, de Negishi, de Stille, de Suzuki, de Sonogashira et de Tsuji-Trost, sont présentées à la fois dans ce qu'elles ont de commun et de différent du point de vue mécanistique. Les domaines d'applications sont à chaque fois présentés à l'aide d'exemples et de tableaux très complets, ce qui fait de ce livre un outil de référence dans les laboratoires. Les applications synthétiques particulièrement bien choisies sont discutées et démontrent l'efficacité de cette chimie en synthèses multiétapes, l'aspect pédagogique de cette partie étant très important.

Les réactions mettant en jeu le palladium II découlent essentiellement de la réaction du procédé Wacker avec l'eau comme nucléophile. L'extension à d'autres nucléophiles comme les alcools, les amines primaires et les carbanions, permet de rationaliser la description de cette réaction souvent présentée de façon confuse dans de nombreux livres.

Les plus récentes avancées dans le domaine des réactions tandem, comme par exemple Wacker/Heck et Wacker/hydrogénolyse, sont présentées d'une façon simple qui permet d'appréhender le potentiel synthétique de ce type d'approche. Enfin, les réarrangements sigmatropiques, 3-3 catalysés au palladium sont décrits. A la lumière de ce chapitre, les hétéro-Claisen apparaissent de très grandes potentialités, surtout si le contrôle de la stéréosélectivité continue à progresser.

Le corpus des réactions présenté dans les deux chapitres constitue une part essentielle des outils concrets à la disposition des chimistes de synthèse pour la formation de liaisons C-C et dans la moindre mesure C-O et C-N, et il est notable que pour la plupart de celles-ci, le principe n'ait été découvert que dans les dernières décennies. Les avoir rassemblées dans ce volume constitue un élément important à vocation pratique pour les chercheurs des laboratoires, mais aussi pour la formation. Nul doute que des chimistes peu familiarisés avec l'utilisation des métaux de transition en synthèse trouveront une approche très pédagogique et démystifiante dans ce mémoire.

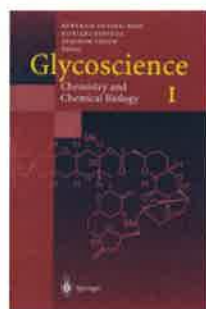
Le dernier chapitre décrit les complexes de palladium utilisés le plus couramment en synthèse organique. Des renseignements pratiques sont donnés ainsi que des modes opératoires de préparation et quelques informations utiles pour comprendre certains des effets de ligands ; c'est peut-être la

partie la plus faible du livre. Les très récentes avancées concernant les complexes stables et « hyperactifs » (Hermann, Santelli...), de même que les approches favorisant le recyclage, sont malheureusement omises ou peu développées. Il est cependant vrai que les auteurs avaient pour objectif une « initiation » et un « guide » et qu'ils ont de ce point de vue tout à fait rempli leur contrat.

Avoir introduit des exemples nombreux de mode opératoire paraît *a priori* original et un peu étonnant. Expérience faite auprès d'étudiants en DEA et en thèse, cette originalité se révèle payante car elle permet aux chimistes non familiarisés de se rendre compte de la relative simplicité de mise en œuvre de ce type de catalyseur et contribue fortement à augmenter l'intérêt pour ce type de chimie.

En conclusion, ce livre est à recommander dans les laboratoires de synthèse, mais peut être aussi un outil de formation initiale. Les exemples d'applications en synthèse multiétapes sont particulièrement bien choisis pour préparer (et soumettre !) des exercices. Je ne peux terminer sans ajouter qu'il est rare maintenant de lire un livre de chimie organique avec autant de plaisir que celui que j'ai eu avec cet ouvrage.

Marc Lemaire



Glycoscience
Chemistry and Biology vol. I, II et III
 B. Fraser-Reid, K. Tatsuta et J. Thiem
 (éditeurs)
 2 854 pages, 860,27 €
 Springer, 2001

« Glycoscience » est un terme générique couvrant tous les aspects de la physico-chimie, de la chimie et de la biologie des mono-, oligo-, polysaccharides, de leurs conjugués aux lipides ou aux protéines et des mimes glucidiques. Une partie de ce domaine de recherches, à l'interface de la chimie et de la biologie, est en plein essor depuis le début des années 70, lorsqu'on a voulu comprendre à l'échelle molé-

culaire les interactions sucre-protéine qui régissent la vie sociale des cellules, mais aussi le métabolisme des polysaccharides, constituants majeurs de la biomasse végétale. Une autre partie des glycosciences est constituée par les glycomatériaux et est plutôt à l'interface de la physique et de la chimie.

L'ouvrage se présente sous 3 volumes totalisant plus de 2 500 pages. Une soixantaine d'articles écrits par les spécialistes mondiaux dans leur domaine sont suivis par plus de 11 000 références et sont regroupés en 10 chapitres.

Comme dans la plupart des livres récemment parus dans ce domaine, le premier chapitre est constitué de quatre articles donnant des généralités sur la structure et la conformation, les propriétés, la séparation et la purification, et l'abondance naturelle des mono-, oligo- et polysaccharides. Ces informations sont nécessaires pour le lecteur néophyte, mais elles se retrouvent dans toutes les parutions récentes traitant de cette thématique.

Les objectifs des chapitres 2 et 3 sont de donner des méthodes générales sur des réactions possibles sur les hydroxyles de monosaccharides et ils se décomposent chacun en neuf articles. Les protection-déprotection, oxydation-réduction, désoxygénation, substitution et élimination des hydroxyles non anomères ainsi que les réactions de dégradation sont amplement illustrées dans le chapitre 2. Le chapitre 3, quant-à-lui, décrit les réactions possibles sur le carbone anomère. En particulier, toutes les méthodes d'activation de donneurs de glycosyles nécessaires à la synthèse d'oligosaccharides et même les stratégies pouvant être employées pour la préparation de banques combinatoires d'oligosaccharides sont particulièrement bien décrits. L'obtention de *S*-, *N*- et *C*-glycosides y est également rapportée. Le deuxième volume est constitué de deux chapitres consacrés aux synthèses et utilisations des mono- et oligosaccharides.

Le chapitre 4 rapporte tout d'abord la préparation de monosaccharides ayant des implications biologiques (sucres rares, désoxy-, amino-, aza-monosaccharides ainsi que les dérivés carboxyliques), soit par modification chimique ou enzymatique du squelette saccharidique, soit par des synthèses *de novo*. Un article est ensuite consacré à la préparation de molécules naturelles en utilisant la chiralité des monosaccharides utilisés comme synthons de départ. Les deux derniers articles de ce

chapitre sont dédiés au métabolisme des monosaccharides et à leurs utilisations biomédicales.

Le chapitre 5 a pour thème les oligosaccharides et traite successivement de leurs rôles et propriétés structurales et fonctionnels, de leurs synthèses enzymatiques et chimiques en phase homogène ou supportée en phase solide. Quelques-uns de ces articles sont redondants avec ceux présentés dans le premier volume. Comme dans le chapitre précédent, les derniers articles abordent le métabolisme de ces composés et l'étude à l'échelle moléculaire des interactions des glycoconjugués correspondants avec leurs protéines affines.

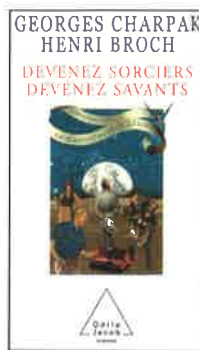
Le troisième et dernier volume se compose de 5 chapitres relatifs aux polysaccharides complexes, aux glycolipides, aux glycoprotéines et autres glycoconjugués et glycomimétiques ayant des propriétés biologiques ou biomédicales importantes.

Le premier chapitre décrit les biosynthèses et les biodégradations de tous les polysaccharides d'origines bactérienne, végétale ou animale, mais également leurs modifications chimique ou enzymatique post-synthétique ainsi que les études détaillées des outils utilisés pour atteindre ce but. Les deuxième et troisième chapitres traitent respectivement des glycolipides et des glycoprotéines sont agencés suivant le même modèle : rôle, fonction, propriétés, synthèse, biosynthèse et biodégradation et utilisations comme agents thérapeutiques ou de diagnostic. Le quatrième chapitre rapporte les propriétés et les structures de glycoconjugués qui sont des métabolites secondaires extraits des milieux de culture de différents micro-organismes. Les deux chapitres suivants sont complémentaires et traitent des propriétés, de la structure et de la synthèse des molécules naturelles glycosylées ayant des propriétés biomédicales intéressantes (antibiotiques, cardiotoniques, énergétiques...). Enfin, les deux derniers chapitres développent des thématiques abordées dans le premier volume sur la synthèse et les propriétés d'azaglycomimétiques et de *C*-analogues d'oligosaccharides.

L'intérêt de cette série de trois volumes est d'avoir intégré les connaissances les plus récentes dans tous les domaines des glycosciences à l'interface avec la biologie, pouvant être utilisées tant par le spécialiste pour retrouver une référence précise, que pour l'étudiant ou le chercheur voulant

avoir des informations générales dans un domaine particulier. Tous les laboratoires ayant des chimistes organiciens, biochimistes, immunologistes, biologistes cellulaires ou oncologistes s'intéressant aux « sucres » devraient avoir ces livres dans leur bibliothèque.

Hugues Driguez



Devenez sorciers, devenez savants

G. Charpak et H. Broch

300 pages, 21 €

Odile Jacob, 2002

La crédulité des hommes, grands et petits, n'est plus à faire depuis les origines de la pensée rationnelle. Ptolémée le Grand, Isaac Newton, Victor Hugo et d'autres ont, à un moment de leur vie ou de l'évolution de leur pensée, voulu croire à des puissances occultes, des forces cosmiques, et donner un sens à une succession d'événements qui n'en avaient pas. On est surpris, choqué, que des hommes qui nous gouvernent aient pu consulter cartomancienne ou astrologue avant de prendre des décisions nous concernant. Mais lequel d'entre nous n'a jamais été troublé, ne serait-ce qu'un moment, par un lien fortuit, une coïncidence... troublante entre des faits apparemment non corrélés ?

Sous un titre quelque peu sibyllin, Charpak et Broch* donnent des bases rationnelles, probabilistes, à nombre de ces pseudo événements et dénoncent, preuves à l'appui, les affabulateurs que sont astrologues, sourciers, marcheurs sur braise, télépathes et fakirs, tous plus ou moins consciemment artisans de la crédulité de nos contemporains. On peut s'étonner du choix de telles cibles. Quoi ! Dénoncer l'astrologue Mme Teissier, ou la Sorbonne qui lui a décerné un diplôme universitaire, citer longuement le rapport du chimiste Chevreul (1812) sur les pratiques des sourciers ou même la caution plus récente (1981) d'Yves Rocard ? Ne

vaut-il pas mieux en sourire, n'y a-t-il rien de plus sérieusement condamnable ? Ne devrait-on pas plutôt ranger tout cela avec les conseils de l'été : maigrir de 4 kilos en 3 semaines et autres balivernes ? Les auteurs ne le pensent pas et, tout en offrant des explications claires et convaincantes à toute une série de phénomènes dits paranormaux, ils se désolent de l'impuissance de la science à raisonner nombre de nos contemporains.

Car tout cela est souvent réjouissant, mais qui sont les coupables ? La vogue du paranormal serait-elle, ne serait-ce que partiellement, un échec de l'Éducation nationale à former des têtes bien faites ? Pas si sûr. Au cours d'une discussion sur l'illusion coïncidentale, Charpak et Broch posent une question : quelle est la probabilité pour que dans une assemblée quelconque de 60 personnes, deux d'entre elles soient nées le même jour du même mois ? La réponse est : plus de 99 % ; elle est encore de 50 % pour une assemblée de 23 personnes. Une enquête rapide dans un laboratoire universitaire montre la perplexité de chercheurs devant le résultat d'un calcul qui semble s'opposer au « sens commun ». C'est un aspect du problème : le sens commun, chose du monde la mieux partagée dit-on, n'est pas probabiliste. Partant, la crédulité n'est pas l'apanage des non scientifiques. On peut être un bon scientifique et craindre les Djinns du Sahara. C'est ainsi.

L'ouvrage de Charpak et Broch avec ses traces de pessimisme sur l'évolution de nos sociétés est pédagogique et instructif, et donc utile. Un peu fourre-tout tout de même. Ainsi, l'inquiétude à propos de l'utilisation civile du nucléaire n'est pas uniquement du domaine de l'escroquerie. Les auteurs le savent bien et leur ton devient moins prime-sautier lorsqu'ils abordent ce sujet. Et on peut se demander si la proposition de remplacer le becquerel par une nouvelle unité prenant pour référence la contribution de l'ensemble des radiations naturelles sur l'organisme humain ne ressort pas quelque peu d'un effet placebo dans le meilleur des cas, et un effet Pinay dans le pire. Les anciens comprendront.

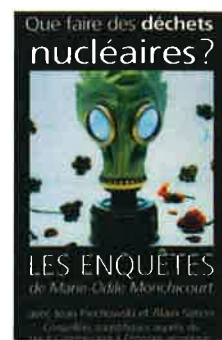
Quel est le meilleur public pour cet ouvrage ? Les rationalistes convaincus verront leurs intuitions confirmées. Le public avide de surnaturel tournera la tête ou trouvera d'autres objets à ses fantasmes. Reste l'univers des enfants qui reconnaît souvent quand le roi est nu. Le vrai monde magique est sans doute celui de la science et de la technique,

mais leurs prouesses n'étonnent plus nos contemporains. L'émerveillement de nos aînés devant la découverte de l'électricité, du téléphone, de l'avion au détour du XX^e siècle s'est... envolé. Une dose de merveilleux est nécessaire à l'Homme. « *Ah que la vie est quotidienne* » disait le poète.

Une note pour finir. Les auteurs s'adressent évidemment aux habitants des sociétés industriellement développées. Les mondes des sorciers et des chamans des sociétés dites traditionnelles ne sont pas évoqués. Il faut certes d'abord balayer devant sa porte, mais il y a beaucoup à apprendre de l'étude des croyances de ces populations sur la puissance résiduelle de la pensée magique dans les sociétés industrielles. Mais ceci est une autre histoire...

Claude Treiner

* Il faut aussi lire l'excellent petit livre de H. Broch, *Le paranormal*, Collection Sciences, édition du Seuil, 1989, dont nombre d'exemples du présent ouvrage sont tirés.



Les enquêtes de Marie-Odile Monchicourt

Platypus Press, 4,5 €

La science, ami public numéro 1 ! Tel est l'objectif des *Enquêtes de Marie-Odile Monchicourt*, journaliste scientifique sur France Info (voir article dans le prochain numéro de *L'Actualité Chimique*). En 50 pages environ, et en compagnie d'un ou plusieurs experts, la chroniqueuse fait le point sur un problème scientifique de société. Ces petits livres, vendus 4,5 €, ont l'ambition de « donner des réponses scientifiques à des questions qui nous préoccupent tous ». En effet, 90 % des personnes n'ont pas accès à cette littérature spécialisée. Pour remédier à ce constat, ces enquêtes sont destinées au plus grand public possible et se présentent sous la forme de polars noirs ; grâce à l'intervention de l'expert, on peut alors « reconstituer les faits »

tout au long de l'investigation et ensuite métamorphoser « l'accusé » en « coupable ».

La collection compte aujourd'hui une dizaine de titres parmi lesquels *Que faire des déchets nucléaires ?*, *Faut-il avoir peur des virus ?*, *Sur un air de pollution*, *Bienvenue dans la thérapie génique...*, mais ses créateurs souhaitent l'agrandir. Ainsi, on pourra peut-être bientôt suivre une enquête chimique sur l'amiante ou sur les nouveaux matériaux. A suivre...

Colin Droniou

A signaler

• CD-Rom Sécurité et gestion des risques

125 € pour le CD-Rom + abonnement
58 € HT
Techniques de l'Ingénieur, 2002

Organisés autour des grandes problématiques que sont les démarches et les méthodes d'analyse des risques, la sécurité des produits et des sites, les aspects réglementaires ou encore les spécificités par industrie, ce CD-Rom, mis à jour tous les 6 mois, constitue un ensemble structuré et fiable grâce à la collaboration de plus de 20 spécialistes du domaine.

www.techniques-ingenieur.fr

• CD-Rom ©Clic'Ademe entreprises

Ademe, 2002, 50 €
Ce CD-Rom est conçu spécifiquement à l'attention des PME-PMI pour la mise en place du tri des déchets au sein d'une entreprise.

www.ademe.fr

• Springer handbook of enzymes (2nd ed.)

Vol. 3, Class 4 : Lyases I (4.1.1-4.1.2)
D. Schomburg, I. Schomburg, A. Chang
600 p., 249 €
Springer, 2002

• New aspects in phosphorous chemistry I Topics in current chemistry, vol. 220

J.-P. Majoral
244 p., 149 €
Springer, 2002

• Toxicology of solvents

M. McParland, N. Bates
400 p., 255 €
Rapra Technology Ltd, 2002

• Dendrimers and other dendritic polymers

J. Frechet, D. Tomalia

688 p., 332 €
Wiley, 2002

• Handbook of polymer blends and composites

C. Vasile, A.K. Kulshreshtha
850 € les 4 volumes
Rapra Technology Ltd, 2002

• Polymer dispersions and their industrial applications

D. Urban, K. Takamura
420 p., 162 €
Wiley-VCH, 2002

• Developments in the theory of cationoid polymerisations

P.H. Plesch
772 p., 145 £
Rapra Technology Ltd, 2002

• Polymer characterization and materials science

Macromol. Symp., vol. 178, 2002
http://www.iupac.org/publications/macro/2002/178_preface.html

Revue

Bulletin de l'Union des Physiciens (BUP)

Sommaire du n° 845, juin 2002

• Des « campagnes » de questions aux fiches de synthèse en passant par les rapports et les colloques : une année « politique », par Josette Maurel et Madeleine Sonnevile.

• Chimie et nature (acte III) : itinéraire de quelques éléments chimiques en marge du vivant, par Suzanne Fery-Forgues, Robert Pince et Robert Wolf.

• Un archétype d'oscillateur : le résonateur acoustique de Helmholtz, par Frédérick Bernardot, Janine Bruneaux et Jean Matricon.

• Petite histoire de chute libre, par Jean-Marie Vigoureux.

• Marches aléatoires, par Jimmy Roussel.

• Étude théorique de la stabilité relative des intermédiaires réactionnels, par Claire Gillery, Mathieu Diehr et Majdi Hochlaf.

• Mise en œuvre d'un capteur de mouvements à ultrasons avec Candibus, sous Linux, par Vincent Nenzel.

• Expérience, démonstration et instrumentation, dans les lycées au XIX^e siècle, par Claudette Balpe.

• La sécurité en TP de chimie organique, par Micheline Izbicki.

• Les XVIII^e Olympiades de la chimie, par Micheline Izbicki.

• Énoncés des concours : agrégation de sciences physiques, CAPES de sciences physiques (concours externes et internes).

Une source d'information indispensable



Profitez d'une réduction de 15% en souscrivant à la collection complète

D. Schomburg, I. Schomburg,
Universität zu Köln, Germany (Eds.)

Springer Handbook of Enzymes

2^{ème} édition entièrement actualisée

- A concise and complete description of more than 3700 enzymes sufficiently well characterized for application in analytical, synthetic and biotechnology processes as well as in food industry
- It consists one third new enzymes
- The already existing enzymes are totally revised and contain all new data to an enzyme
- New datafields: application and engineering
- A yearly supplement contains the newly classified enzymes of the already published enzyme classes.

A recommended name and an EC-number index are available at <http://www.springer.de/enzymes/> free of charge

Pour en savoir plus :

<http://www.springer.de/enzymes/>

Volumes déjà disponibles :

Class 5: Isomerases: Vol. 1 (752 p., ISBN 3-540-41008-2)
Class 6: Ligases: Vol. 2 (798 p., ISBN 3-540-41399-5)
Class 4: Lyases: Vol. 3 (585 p., ISBN 3-540-42129-7),
Vol. 4 (679 p., ISBN 3-540-42140-8),
Vol. 5 (492 p., ISBN 3-540-42141-6)
Class 3.4 Hydrolases: Vol. 6 (610 p., ISBN 3-540-43012-1),
Vol. 7 (755 p., ISBN 3-540-43013-X),
Vol. 8 (672 p., ISBN 3-540-43171-3)
Synonym Index (1369 p., ISBN 3-540-41830-X)

Prix par volume : 262,70 €*

Prix de souscription par volume : 223,66 €*

(pour l'achat de la collection complète uniquement)

Springer-Verlag
1 rue Paul-Cézanne
75008 Paris
Tél.: 0800 919 343



Springer

*Prix TTC en France (5,5% TVA incl.). Autres pays : TVA locale applicable. Les prix indiqués et autres détails sont susceptibles d'être modifiés sans avis préalable.

d&p - 51868

Enseignement de l'électrochimie

Compte rendu des 19^e JIREC, La Baume-les-Aix, 15-17 mai 2002

Les 19^e Journées sur l'innovation et la recherche pour l'enseignement de la chimie (JIREC), consacrées principalement à l'électrochimie, ont été organisées avec l'appui scientifique du Laboratoire MADIREL (UMR CNRS-université de Provence), de la Commission interdivisions enseignement de la SFC et du Centre de développement informatique pour l'enseignement de la chimie (CDIEC). Elles se sont tenues dans le cadre bucolique du Centre de colloques de La Baume-les-Aix, dans la campagne provençale. Plus d'une centaine de participants, passionnés par l'enseignement de la chimie, sont venus de toute la France, mais aussi de Belgique, de Suisse, de Tunisie et du Maroc. Malgré la tentation du soleil méridional et une chaleur déjà presque estivale, ils ont été assidus aux conférences et aux ateliers qui portaient sur tous les domaines de l'électrochimie fondamentale et appliquée.

Dans sa conférence inaugurale, Bernard Trémillon, ancien directeur de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Paris, a brossé un tableau de l'état actuel de l'électrochimie en insistant sur son aspect interdisciplinaire, puisque des notions multiples de la mécanique quantique à la mécanique des fluides, en passant par la physique des solides, l'électrostatique et l'électrodynamique, la thermodynamique et la cinétique chimique, sont nécessaires pour sa compréhension.

La conférence de Didier Devilliers (Paris VI) a traité des générateurs et électrolyseurs industriels, notamment l'électrolyseur chlore-soude et ses variantes, l'accumulateur au plomb, les piles au lithium et les piles à combustible. Cette conférence a souligné l'importance des diagrammes courant-potential pour l'étude cinétique des réactions d'oxydoréduction.

Henri Mazille (INSA Lyon) a exposé les spectaculaires méfaits de la corrosion, affectant des métaux jusqu'aux prothèses dentaires, et les moyens pour empêcher « du temps irrémédiable outrage », notamment les différents revêtements protecteurs, la protection cathodique et les inhibiteurs de corrosion.

La conférence de Pierre Fabry (université J. Fourier, Grenoble) a présenté le domaine des capteurs électrochimiques,

qui traduisent le message chimique en un signal électrique facile à mesurer et à traiter. Ce domaine s'élargit de plus en plus en relation avec les demandes accrues pour la protection de l'environnement, la prévention des risques industriels et le domaine biomédical.

L'histoire de l'électrochimie a été le sujet de la conférence de Pierre Bianco, directeur de recherche au CNRS (Marseille). Basé sur son récent ouvrage, il a montré avec de multiples illustrations le cheminement continu de cette discipline depuis les découvertes initiales de Galvani et Volta, jalonné par les grands noms de son développement, Grotthuss, Faraday, Nernst, Heyrovsky et tant d'autres.

Jean-François Fauvarque (CNAM, Paris) a présenté les systèmes modernes de stockage de l'énergie : accumulateur au plomb, accumulateur nickel-hydrure, piles au lithium, piles à combustible. Il a souligné les avantages et inconvénients des différents systèmes et les directions de recherche dans ce domaine.

Enfin, l'application de l'électrochimie au domaine biomédical a été le thème de la conférence de Christian Amatore (École Normale Supérieure, Paris), qui a montré que l'utilisation de micro-électrodes permettait l'étude des phénomènes du stress oxydatif dans les cellules vivantes. Cette technique permet de mesurer l'émission d'un « cocktail » de molécules en quantités extrêmement faibles (correspondant à quelques milliers de molécules).

Les participants aux JIREC avaient le choix entre cinq ateliers, où étaient présentées des expériences pratiques permettant d'approfondir les notions introduites dans les conférences. Ces ateliers ont été aussi le lieu d'échanges et de discussions informelles sur les différents domaines concernant la thermodynamique de l'oxydoréduction, les piles et l'électrolyse, la corrosion et l'anticorrosion, les capteurs électrochimiques, les nouvelles technologies pour l'enseignement de la chimie.

Les communications par affiches, disposées sous une tonnelle, ont été à l'origine de discussions intenses sur différents domaines de l'électrochimie, notamment sur les nouveaux programmes de chimie du secondaire, les recommandations de l'IUPAC, la notion

de quantité de matière, la présentation de l'oxydoréduction, de la catalyse, du concept d'électrode ou de celui de réaction chimique acido-basique, les mécanismes de transport des espèces chargées en solution, le dosage de traces de cations métalliques par polarographie différentielle, l'illustration de l'élaboration de matériaux par électrolyse, la préparation de polymères conducteurs ou la recherche bibliographique pour l'enseignement de l'électrochimie. On a trouvé aussi une présentation du Centre de développement informatique pour l'enseignement de la chimie (CDIEC) et un module d'électrochimie de la collection de CD-Roms « Le bon geste pratique au laboratoire de chimie ».

Une table ronde était organisée sur l'importance des travaux pratiques dans l'enseignement de la chimie avec Michel Boyer (Olympiades de la chimie), Monique Schwob (Union des Physiciens), Marie-Blanche Mauhourat (Commission des nouveaux programmes du secondaire), Gilberte Chambaud (SFC, enseignement) et Michel Clément (IUFM).

A l'exposition de livres et d'équipements scientifiques, on a remarqué tout particulièrement les stands de la SFC et d'EDP Sciences.

Au-delà des trois journées bien remplies, les participants ont pu tester leur aptitude à la pétanque et, après un cocktail servi dans les jardins du Pavillon Vendôme, découvrir les merveilles architecturales de la ville d'Aix-en-Provence lors d'une visite guidée du centre historique. Une soirée de jazz en plein air a suivi le banquet du congrès.

Le plein succès de ces journées a été unanimement souligné. Les 20^e JIREC se tiendront **début mai 2003 à Arcachon**.

**Philippe Knauth, Yvan Massiani
et Françoise Rouquérol**

Les articles suivants seront publiés dans L'Act. Chim. de janvier 2003 :

. Intérêts et originalités de l'électrochimie dans une formation scientifique, par Bernard Trémillon (ENSCP) ;

. Cellules électrochimiques : aspects thermodynamiques et cinétiques. Applications aux générateurs et aux électrolyseurs industriels, par Didier Devilliers et Éric Mahé (UPMC).

New trends in photopolymerization

Compte rendu du workshop EPF/GFP, Paris, 27-28 mai 2002

Le workshop « New trends in photopolymerization » s'est tenu en mai dernier sur le campus de Jussieu, sous les auspices de l'European Polymer Federation (EPF), le Groupe Français des Polymères (GFP) et l'université Pierre et Marie Curie (Paris VI). Cette mini conférence est la 4^e édition d'une série de workshops informels organisés par le Laboratoire de chimie des polymères sur des sujets « brûlants », comme la polymérisation radicalaire contrôlée, les polymères supramoléculaires, les polymères électroluminescents ou encore la polymérisation sous UV.

L'audience était composée de 80 inscrits, un chiffre inférieur aux workshops précédents du fait du caractère spécifique du domaine. 30 % d'étrangers provenant de 10 pays européens, 30 % d'étudiants (les frais d'inscriptions à ce genre d'événements sont volontairement nuls) et 25 % d'industriels composaient l'assemblée.

Le principe du workshop consiste en 45 minutes d'exposés suivis de 30 minutes de questions-discussion. Trois thèmes ont été abordés tant par les universitaires que les industriels : les cinétiques de polymérisation, les nouveaux photo-amorceurs, ainsi que les applications UV pour « coatings ».

Les principaux acteurs de la photopolymérisation sous ses aspects fondamentaux étaient présents (Buback, Coqueret, Crivello, Decker, Dietliker, Fouassier). Les industriels ont également eu la part belle pour s'exprimer

(BASF, Ciba, CrayValley-AtoFina, DSM, Fusion-UV System, Rhodia) ou participer aux débats (AkzoNobel, Lamberti SA, L'Oréal, Ocular Sciences). Les présentations étaient d'un haut niveau scientifique et technologique, ce qui a satisfait toutes les personnes présentes dans la salle. Les analyses de relaxation par RMN de réseaux photoréticulés, ainsi que les avancées proposées sur les lampes UV (système 3D) ont particulièrement été appréciées.

Une réunion informelle réunissant une vingtaine de participants français a également été organisée le lendemain du congrès pour discuter des sujets à développer ou des différentes actions à mener dans les dix prochaines années, dans l'hexagone ou au niveau européen.

D'un point de vue fondamental, une attente s'est fait sentir dans la recherche de *nouveaux monomères photopolymérisables* ainsi que de *nouveaux procédés d'irradiation* (photopolymérisation 2D, absorption à deux photons, polymérisation frontale). Une tendance à développer concerne également les *supports ou matériaux entourant la matrice à polymériser*, tels qu'une interface métallique, matériaux chargés ou poreux, membranes et composites. Dans le domaine appliqué, des lacunes sont à noter dans le *suivi de la conversion ou de la dose d'irradiation lors d'une polymérisation ultrarapide* (inférieure à la ms). Des procédés de *polymérisation à l'échelle*

nanoscopique, tels que la stéréolithographie ou la polymérisation sous irradiation laser. Le « *coil-coating* » est encore peu connu en termes d'adhésion ou de vieillissement (« *weathering* »).

Il apparaît que le domaine de la photopolymérisation intéresse beaucoup de monde, mais que les contacts entre les communautés académique et industrielle sont finalement ténus. Les seuls congrès spécifiquement dédiés à la photopolymérisation sont les conférences RadTech, de haut niveau technologique et réunissant toute la communauté industrielle (2 000 adhérents, 700 personnes en moyenne au congrès ACS organisé pendant 3 jours aux États-Unis). Ces congrès sont uniquement axés sur la mise en œuvre. Un tour de France des personnels de laboratoires et de l'industrie pouvant s'associer autour du thème de polymérisation sous rayonnement a ensuite été mené. Une première prise de contact au CNRS Paris est envisagée à court terme pour proposer un regroupement du type réseau ou GDR, parrainé par le CNRS et RadTech. Des symposiums annuels (cf. club émulsion) pourraient alors être organisés, sous l'impulsion de Christian Decker et Xavier Coqueret pour les universitaires, Jean-Marc Francès pour les industriels. Une extension à l'Europe pourra ensuite être envisagée.

François Ganachaud

L'Actualité Chimique fait « salons » !

8^e Réunion des chimistes théoriciens francophones

Strasbourg, 16-20 septembre 2002

Matériaux 2002

Tours, 21-25 octobre 2002

La coulabilité des poudres

Paris, 5-6 novembre 2002

3rd European conference on environmental chemistry

Genève (Suisse), 11-14 décembre 2002

Forum Horizon Chimie

Paris, 5-6 février 2003

**Profitez de
notre présence
sur ces salons pour
promouvoir
votre entreprise,
vos produits et vos
services.**

**Contact :
Céline Hoarau
01 69 18 15 12**

30 septembre-3 octobre 2002

**SyCOCAL II**2^e Symposium de chimie organique

Pierrefitte

(L'Act. Chim., avril 2002, p. 63)

- sycocal2@hotmail.com
http://chimtp.univ-bpclermont.fr/sycocal/accueil.html

9-11 octobre 2002

Chemical nanotechnology talks III

Mannheim (Allemagne)

- Barbara Feisst, Dechema. Tél. : +49 (69) 7564 333.
Fax : +49 (69) 7564 441. feisst@dechema.de
http://www.dechema.de/nano2002

10-11 octobre 2002

CoFrRoCA 20022^e Colloque Franco-Roumain de chimie appliquée

Bacau (Roumanie)

- P. Grandclaudon.
Tél. : 03 20 33 61 19. Fax : 03 20 33 63 09.
Pierre.Grandclaudon@univ-lille1.fr
http://www.ensc-lille.fr/actu/actu.html

13-16 octobre 2002

Drug delivery

Boston (Ma, États-Unis)

- ACS ProSpectives.
Tél. : +1 (202) 872 4600. Fax : +1 (202) 872 6013.
ACSProSpectives@acs.org
http://www.chemistry.org

13-17 octobre 2002

29th Annual conference of the Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopy Society

Providence (RI, États-Unis)

- FACSS.
Tél. : +1 (505) 820 1648. Fax : +1 (505) 989 1073.
facss@facss.org
http://facss.org

13-17 octobre 2002

5th World conference on detergents

Montreux (Suisse)

- AOCSS Meetings and Exhibits Dept.
Tél. : +1 (217) 359 2344. Fax : +1 (217) 351 8091.
meetings@aocss.org
http://www.aocss.org/meetings/montreux

15 octobre 2002

Les techniques de couplage en analyse thermique

Roissy

Journée technique Mettler Toledo sur

1-3 octobre 2002

Innovact 20027^e édition des journées dédiées à la jeune entreprise innovante

Reims

Cette manifestation, financée par la Chambre de Commerce et d'Industrie de Reims et d'Épernay, la région Champagne-Ardenne, la ville de Reims et la Caisse des Dépôts et Consignations, rassemblera 200 exposants et près de 3 000 participants : 120 entreprises et projets innovants y seront présentés et 1 900 rendez-vous d'affaires y sont déjà organisés. L'invité d'honneur sera la Wallonie, dont les liens avec la région Champagne-Ardenne se renforcent régulièrement.

Chaque journée sera consacrée à un thème particulier : colloque Agro&Bio le 1^{er} octobre, ateliers Technologie le 2 octobre et Open-Development (financement, accompagnement, business) avec le Forum des capitaux (présentation de projets) le 3 octobre. De nombreux prix, apportant dotations financières et produits ou services offerts par les partenaires d'Innovact, sont ouverts à toutes les jeunes entreprises innovantes porteuses de projets. A noter particulièrement les **Trophées de l'Innovation 2002** parrainés par Innovact, France Info et L'Étudiant, récompensant les étudiants ayant une idée de création d'activité en phase de conception ou de début de réalisation (contacter gilbert.azoulay@letudiant.fr).

- Trait d'Union CM Associés. Tél. : 01 53 24 98 20. laure@traitunioncm.com. www.innovact.com

les techniques des plus classiques aux plus innovantes (DSC/UV, IR, spectrométrie de masse et GC-MS).

Inscription avant le 27 septembre 2002.

- Christine Fauvarque.
Tél. : 01 30 97 14 39. Fax : 01 30 97 17 73.
christine.fauvarque@mt.com

15-16 octobre 2002

Carrefour européen des biotechnologies6^e Carrefour français des biotechnologies Lille 2002

Lille

- Christelle Pérour.
Tél. : 03 28 55 90 60. Fax : 03 28 55 90 61.
cperour@eurasante.com
http://www.biotech-lille.com

15-17 octobre 2002

**Art et chimie : les polymères**

Paris

(L'Act. Chim., nov. 2001, p. 68)

- SCI. Tél. : 01 53 59 02 10. Fax : 01 45 55 40 33.
j.grolere@wanadoo.fr
http://www.scifrance.org

15-18 octobre 2002

Biotechnology, state of the art and prospects of development1^{er} International congress and exhibition Biotech world

Moscou (Russie)

- http://www.biotechworld.ru/

15-18 octobre 2002

IImac

Salon international et congrès de la technique chimique, de la technique analytique et de la biotechnologie

Bâle (Suisse)

- Schweizer Mustermesse AGCH.
Tél. : +41 (61) 686 20 20. Fax : +41 (61) 686 21 91.
messe@messebasel.ch. http://www.ilmac.ch

18-22 octobre 2002

6th Euroconference on environmental analytical chemistry

Eperheide (Belgique)

- http://chem-www.uia.ac.be/euroconference

20-25 octobre 2002

FEBS 200228th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies

Istanbul (Turquie)

- http://www.kenes.com/febs/topics.htm

21-23 octobre 2002

**SAJEC 2002**3^e Symposium Sigma-Aldrich des jeunes chimistes

Obernai

Club de jeunes Alsace
(*L'Act. Chim.*, juillet 2002, p. 46)

- Jérôme Pansanel.
Tél. : 03 88 41 62 32, Fax : 03 88 41 62 66.
pansanel@chimie.u-strasbg.fr
<http://www-chimie.u-strasbg.fr/~sajec2002/>

21-25 octobre 2002



Matériaux 2002

Tours
(voir IV^e de couv.)

- materiaux@materiaux2002.net
<http://www.materiaux2002.net>

23-24 octobre 2002

Préventica Grand Sud 2002

5^e Congrès national « *Qualité de vie au travail* » : *sécurité, ergonomie, environnement*

Marseille

- Communica Organisation.
Tél. : 05 57 54 38 20, Fax : 05 57 54 38 21.
info@communica.fr
<http://www.preventica.com>

23-26 octobre 2002

Interchimie Maroc 2002

1^{er} Salon des technologies pour les industries chimique, pharmaceutique et cosmétique

Casablanca (Maroc)

- Nathalie Andrieu.
Tél. : 01 47 17 63 66, Fax : 01 47 17 63 71.
n-andrieu@worldnet.fr
<http://www.interchimie.com>

5-6 novembre 2002

Comment maîtriser la coulabilité de vos poudres ?

Paris

(voir II^e de couv.)

- Audrey Miaux.
Tél. : 01 44 88 14 98, Fax : 01 44 88 16 75.
ami@euroforum.fr
<http://www.euroforum.fr>

10-13 novembre 2002

Proteomics

Boston (MA, États-Unis)

- ACS ProSpectives.
Tél. : +1 (202) 872 4600, Fax : +1 (202) 872 6013.
ACSProSpectives@acs.org
<http://www.chemistry.org>

14-15 novembre 2002



SFC Environnement 2002

Aspects analytiques et électrochimiques

Paris

Groupes Environnement et Électrochimie
(*L'Act. Chim.*, juillet 2002, p. 46)

- Jean-François Fauvarque. Tél. : 01 40 27 24 20.
Fax : 01 40 27 40 74, fauvarqu@cnam.fr

19-21 novembre 2002

Rencontres franco-brésiliennes Matériaux composites

Sao Paulo (Brésil)

Dans le cadre du salon FEIPLAR-ASPLAR Composites Amérique Latine (<http://www.feiplar.com.br>).

- UBIFrance. Fax : 01 53 70 06 42.
mgermain@ubifrance.com
<http://www.ubifrance.com>

20-23 novembre 2002

Educathec

Salon professionnel des équipements, systèmes, produits et services pour l'éducation et la formation

Paris

- Groupe Mm. Tél. : 01 41 18 86 18.
Fax : 01 45 06 29 41, <http://www.educatec.com>

27 novembre-1^{er} décembre 2002

Euchem Conference on environmental catalysis

Göteborg (Suède)

- Swedish National Committee for Chemistry.
Tél. : +46 (8) 411 5260/80, Fax : +46 (8) 106678.
anna@chemsoc.se
<http://www.chemsoc.se/sidor/KK/euchem/environ1.htm>

4-5 décembre 2002



Chimiométrie 2002

Paris

Groupe Français de Chimiométrie
(*L'Act. Chim.*, avril 2002, p. 61)

- jgrolere@wanadoo.fr
<http://www.chimimetrie.org>

9-10 décembre 2002



Journées de formulation

Lyon/Villeurbanne

Groupe Formulation

(voir détails p. 85).

- Marie-Hélène Lara.
Tél. : 04 72 44 81 21, Fax : 04 72 44 83 19.
lara@cpe.fr

9-11 décembre 2002

Molécules du futur : les défis de la synthèse organique

15^e Entretiens du Centre Jacques Cartier

Villeurbanne

- Josiane Prot, CPE Lyon.
Tél. : 04 72 43 26 21, Fax : 04 72 43 14 08.
<http://umr5622.univ-lyon1.fr>

26-28 mars 2003

La matière organique naturelle

Clermont-Ferrand

5^e Colloque organisé sous l'égide du Groupe Français de la Société Internationale des Substances Humiques

Date limite de soumission :

30 novembre 2002.

- Claire Richard. Tél. : 04 73 40 71 42.
ihss@univ-bpclermont.fr

19-22 mai 2003

Symposium international Chimie verte

Utilisations et applications de matières premières renouvelables

Poitiers

- ESIP. Tél. : 05 49 45 44 17, Fax : 05 49 45 33 49.
gilles.courtois@esip.univ-poitiers.fr
<http://labo.univ-poitiers.fr/umr6503/symposium>

19-24 mai 2003

Achema 2003

27^e Exposition-congrès internationale du génie chimique, de la protection de l'environnement et de la biotechnologie

Frankfurt am Main (Allemagne)

- Dechema. Tél. : +49 (69) 7564 152.
Fax : +49 (69) 7564 201, achema@dechema.de
<http://www.achema.de>

Du 1^{er} au 31 octobre 2002

« A la rencontre de la chimie » dans vos régions

Tout ce que la chimie sait faire, des parfums aux pneus, des médicaments aux doudounes..., tout ce que la chimie met en œuvre pour assurer la sécurité des sites et la protection de notre environnement..., c'est ce que vous invitent à découvrir l'Union des Industries Chimiques et les professionnels de la chimie qui « ouvrent les portes » de la chimie dans votre région : visite d'usines guidées et commentées, présentation des techniques et des produits de l'industrie chimique, emploi et formation pour les jeunes (voir *L'Act. Chim.*, juillet 2002, p. 38 et détails sur le site de l'UIC).

- <http://www.uic.fr>

Compte rendu de l'Assemblée générale de la SFC

Paris, 26 juin 2002



Le Président François Mathey ouvre la séance à 9 h 30.

Rapport moral du Président

Les évolutions et les négociations sont toujours plus lentes que prévues. Nul ne sera donc surpris d'apprendre que le processus de construction du système européen de publications a pris quelque retard par rapport à ce que j'avais annoncé dans mon dernier rapport.

Aujourd'hui sont effectivement signés les accords concernant *Chemistry* (depuis longtemps), *EurJIC*, *EurJOC* et *ABC* (en 2002). L'accord sur *ChemPhysChem* (avec une place prépondérante pour la SFC) est arrivé au stade final, l'accord sur *ChemBioChem* (semblable à celui de *Chemistry*) est en cours de définition. Il est clair néanmoins que le problème des publications européennes est, pour l'essentiel, résolu. Dans le futur, les seules interrogations concernent l'impact effectif de ces publications (les premiers chiffres sont encourageants) et l'évolution technique et financière du système sous la pression de l'informatisation et d'Internet. La situation de *L'Actualité Chimique* est plus contrastée. Sur le plan technique et scientifique, il s'agit d'une réussite incontestable. Les articles sont intéressants, la présentation est agréable. Sur le plan financier cependant, la revue accuse un déficit considérable. En 9 mois sur 2001, il s'établit déjà à 125 K€ ! L'origine de ce déficit est double : l'abonnement est vendu à nos membres à un prix inférieur en moyenne de 40 € au coût de la revue ; les recettes publicitaires sont ridiculement insuffisantes. Cette situation va nous imposer de revoir

complètement notre politique de production, de diffusion, de facturation et de publicité. Nous devons essayer à tout prix de préserver la qualité de notre magazine. Mais il faudra nécessairement augmenter les recettes. Nous n'avons pas de solutions miracles à proposer pour l'instant.

Le site web de la SFC a continué à évoluer en 2001. Une nouvelle présentation a été mise en place en octobre. Les annuaires thématiques « catalyse » et « formulation » sont en ligne depuis avril et septembre. La bourse de l'emploi propose en permanence environ 30 offres industrielles et 30 offres académiques. Une version anglaise du site est disponible depuis octobre. Un dossier complet sur le nitrate d'ammonium réalisé par le professeur Guiochon a été mis en ligne en octobre. Bref, le site évolue constamment et sa consultation augmente régulièrement. Malgré sa qualité, il faut toutefois reconnaître que les recettes de ce site restent très faibles.

Venons-en maintenant à SFC 2002. Le contexte toulousain est évidemment très défavorable depuis l'explosion d'AZF. L'absence de subventions locales nous impose une gestion budgétaire très serrée. Nous ne nageons pas dans le luxe ! Il semble aujourd'hui (fin juin 2002) que nous serons, malgré tout, près de l'équilibre. Ce serait un résultat inespéré ! On retiendra aussi deux particularités de ce congrès : une forte participation industrielle - une journée entière sera consacrée à certaines avancées techniques de l'industrie chimique - et une participation officielle significative de certaines sociétés européennes sœurs : RSC, GDCh et Suisse. Malgré quelques imperfections dans l'organisation, le bilan devrait être cependant satisfaisant grâce au travail acharné des équipes toulousaines. Il ne faut néanmoins pas se voiler la face. Depuis plusieurs années, l'organisation de ces congrès généralistes pose des problèmes financiers. La participation des membres y est insuffisante, ce qui entraîne un déficit pour la société. Se pose donc le problème de leur

maintien en l'état, de leur évolution ou de leur disparition. Nous devons sans doute trancher rapidement ce problème. Y aura-t-il un SFC 2005 ? Comme le lecteur l'aura remarqué à la lecture de ce rapport, la SFC doit se battre sur tous les fronts avec des moyens limités. Je crois qu'elle n'a pas démérité en 2001. Mais la réaction des chimistes français reste tiède. L'érosion du nombre de membres semble stoppée, mais il nous faudrait maintenant induire une croissance de la participation à nos activités. Le défi est devant nous : lorsque sonnera l'heure de la Société Européenne de Chimie, le poids de notre communauté sera, pour partie, à la mesure du nombre de membres de la SFC. J'espère donc que la nouvelle génération de chimistes comprendra et relèvera ce défi.

Élection du Président

François Mathey est réélu pour deux ans Président de l'association à une quasi totalité des votes (1 058 voix sur 1 085 votants).

Rapport du Trésorier

L'exercice 2001 se solde globalement par un bénéfice de 21 675 €.

Compte de résultats 2001

Par rapport à l'exercice 2000, on peut noter en 2001 :

- une stabilité des postes cotisations et abonnements ;
- une augmentation sensible des redevances provenant des revues (142 718 contre 92 143 €) ;
- une augmentation importante des charges de l'immeuble rue Saint-Jacques suite à une provision pour ravalement et à de gros travaux nécessités par les récentes intempéries ;
- une stabilité des autres charges.

L'Assemblée générale approuve les comptes.

Bilan au 31 décembre 2001

Le montant total du bilan au 31 décembre 2001 se situe au même niveau que celui constaté à la fin de l'exercice 2000 : 3 060 641 € contre 2 932 493 €.

Affectation du résultat 2001

L'Assemblée générale donne son accord sur l'affectation des résultats

2001 : le compte « Fonds associatif » passe ainsi de 2 456 457,65 € à 2 479 104,14 € et le compte « Report à nouveau » de 163 764,35 € à 162 802,53 €, au 31 décembre 2001. Le Commissaire aux comptes a conclu à la sincérité et à la concordance des comptes annuels.

Les tableaux présentant ces comptes (Compte de résultat et Bilan au 31 décembre 2001), le Rapport du Trésorier ainsi que le Rapport général du Commissaire aux comptes ont été adressés à chaque membre courant mai 2002.

Approbaton des résolutions

Les quatre résolutions suivantes soumises à l'Assemblée ont été votées à l'unanimité :

• Résolution n° 1

Ayant pris connaissance du Compte de résultat de l'exercice 2001 et du Bilan au 31 décembre 2001 arrêtés par le Conseil d'administration, du Rapport du Trésorier et de celui du Commissaire aux comptes, l'Assemblée générale approuve les dits comptes, se clôturant par un bénéfice de 21 674,67 €.

Elle donne quitus de leur mandat aux membres du Conseil d'administration.

• Résolution n° 2

L'Assemblée générale approuve :

- L'imputation au compte « Fonds associatif » de 22 636,49 € respectant les 10 % minimum statutaires des produits annuels du patrimoine, portant le montant de ce compte à 2 479 104,14 € au 31 décembre 2001.
- L'imputation au compte « Report à

nouveau » de - 961,82 € portant le montant dudit compte à 163 764,35 € au 31 décembre 2001.

• Résolution n° 3

Ayant pris connaissance du compte du résultat prévisionnel pour l'exercice 2002, l'Assemblée générale approuve ce budget dégageant bénéfice de 18 052 € hors SFC Eurochem 2002.

• Résolution n° 4

Le mandat du Commissaire aux comptes, le cabinet Richard & Associés, venant à échéance au cours de la présente Assemblée, ce mandat est renouvelé pour une période de 6 ans, soit jusqu'à l'Assemblée statuant sur les comptes de l'exercice 2007.

Jean-Claude Brunie
Secrétaire Général

Grands prix 2002

Prix Süe

• Abel Rousset



Abel Rousset, 64 ans, est professeur à l'université Paul Sabatier (Toulouse III) et directeur du Centre interuniversitaire de recherche et d'ingénierie des matériaux (CIRIMAT) UMR CNRS 5085.

C'est en préparant une thèse à l'université Claude Bernard sous la direction de J. et R. Paris et en très forte interaction avec L. Neel, alors directeur du Laboratoire de magnétisme de Grenoble, que dès le milieu des années 60, il met au point des méthodes de chimie douce permettant d'accéder à des solutions solides d'oxydes « à grains fins » dans le système $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Cr}_2\text{O}_3\text{-Al}_2\text{O}_3$ dont certaines permirent les premières vérifications expérimentales des théories de Neel du superantiferromagnétisme.

Par la suite, mettant à profit les potentialités de la chimie douce pour contrôler la taille et la forme des particules submicroniques (appelées aujourd'hui nano-

matériaux) ainsi que la réactivité exceptionnelle des solides divisés, il met en évidence des phases métastables inédites dont certaines à base d'oxyde de fer présentent des propriétés originales et intéressantes pour l'enregistrement magnétique notamment.

En 1976, il est nommé maître de conférences à l'université Paul Sabatier où très vite, il va créer, de toutes pièces, le Laboratoire de chimie des matériaux inorganiques (LCMI).

Poursuivant ses travaux antérieurs, il va, avec une poignée de collaborateurs, faire apparaître les premiers ferrites lacunaires à valence mixte qui s'avèreront très performants non seulement pour l'enregistrement magnétique, mais aussi, à l'état de couches minces, pour l'enregistrement magnéto-optique. A cette même époque, il entreprend des travaux sur les thermistances CTN à base de manganites de métaux de transition à structure spinelle, largement utilisées aujourd'hui en tant que capteurs ou régulateurs de température dans l'automobile, la téléphonie portable, l'électroménager... Ces études aboutiront à optimiser les formulations ainsi que la précision et la fiabilité de ces composants passifs.

Nommé professeur en 1980, ses travaux vont par la suite s'élargir à de nouveaux composants électroniques, les varistances à base d'oxyde de zinc pour lesquelles, avec son équipe, il montrera l'intérêt de préparer des poudres par chimie douce pour obtenir dans les céramiques qui en sont issues des microstructures mieux maîtrisées et

des propriétés électriques nettement améliorées, comme par exemple la capacité d'absorption d'énergie.

Dès la fin des années 80, il lance les premiers travaux sur les nanocomposites dans lesquels des nanoparticules métalliques (Fe, Cr, Co, alliages) inférieures à 5 nm sont élaborées *in situ* non seulement dans des poudres, mais également dans des céramiques massives du type Al_2O_3 , MgO ... Ces composés originaux serviront de matériaux modèles pour des études de propriétés magnétiques, électriques, mécaniques...

En 1988, le LCMI compte une trentaine de personnes et est reconnu par le CNRS en tant qu'Unité de Recherche Associée. Cette reconnaissance va donner un nouvel essor à la formation et Abel Rousset va impulser de nouveaux thèmes de recherche, notamment dans le domaine des catalyseurs à base d'oxydes à valence mixte, des composites de surface à matrice métallique où des particules submicroniques de céramiques sont codéposées électrolytiquement pour fonctionnaliser des surfaces. Dès 1994, les recherches sur les nanocomposites déboucheront sur la mise en évidence des nanotubes de carbone élaborés par voie catalytique, matériaux qui continuent à être étudiés intensivement à l'heure actuelle.

Vers la fin des années 90, Abel Rousset est sollicité pour rassembler la chimie du solide et des matériaux à l'université Paul Sabatier, ce qui conduira à la création au sein de son laboratoire d'une équipe de recherche sur l'énergie et à la

constitution du Laboratoire de chimie des matériaux inorganiques et énergétiques (LCMIE). Enfin en 1999, il prend en charge la création et la direction d'une nouvelle Unité Mixte de Recherche CNRS, le CIRIMAT, qui rassemble les chimistes du solide, les métallurgistes, les physiciens polyméristes de l'université Paul Sabatier et de l'Institut National Polytechnique. Cet ensemble de 160 personnes, dont 80 permanents, compte 9 équipes de recherche en forte interaction avec le milieu industriel et bien intégrées aux grandes thématiques actuelles : les nanomatériaux, les biomatériaux, les matériaux pour l'énergie, pour l'électronique, pour l'environnement, pour les transports, pour les nouvelles technologies de l'information et de la communication (NTIC).

Parallèlement à son activité de recherche, Abel Rousset a créé à l'université Paul Sabatier la plupart des formations « Science des matériaux » ; d'abord le DESS Matériaux minéraux en 1991, la maîtrise Science des matériaux en 1992 et l'École doctorale « Matériaux-structure-mécanique » en 1999. De 1995 à 1999, il a été membre du Conseil National des Universités – CNU (33^e section) et est actuellement membre du Comité National du CNRS en section 19.

Abel Rousset a fait souvent œuvre de pionnier, notamment dans la mise au point et le développement des méthodes de chimie douce qui permettent d'obtenir des particules à fort rapport surface/volume et de contrôler leur forme et leur réactivité pour élaborer des phases métastables originales. Ainsi, il a abordé très tôt la mise en évidence et l'étude des nanomatériaux (les « grains fins » des années 60-80) et établi des corrélations entre leurs morphologies et leurs propriétés physiques et chimiques. Il a également été un précurseur vis-à-vis des collaborations avec les physiciens du solide, en particulier du magnétisme, ainsi que des collaborations fructueuses et durables avec le secteur industriel.

Auteur de 338 publications, 38 brevets, dont certains ont donné lieu à plusieurs contrats de licence, 301 conférences ou communications dont 24 invitées, Abel Rousset a dirigé 28 thèses et 48 contrats industriels. Il a obtenu le Prix Michel Benech en 1986 et est membre de l'Académie des sciences Inscriptions et Belles Lettres de Toulouse depuis 1997 ainsi que de la Materials Research Society of India depuis 1993.

Prix Le Bel

• Jean-Yves Saillard

Jean-Yves Saillard, 54 ans, est professeur au Laboratoire de chimie du solide et inorganique moléculaire (Institut de chimie de Rennes) et directeur de l'École doctorale Sciences de la matière à l'université Rennes I. Il a débuté sa carrière scientifique par une thèse de cristallographie sous la direction de D. Grandjean avec lequel il a travaillé sur la détermination de structures de complexes organométalliques, en collaboration avec l'équipe de G. Jaouen. Son intérêt pour la chimie structurale et la compréhension de la liaison chimique l'a alors conduit vers l'utilisation des outils de la chimie théorique en complément de ceux de la diffraction des rayons X. Il a par la suite effectué un séjour post-doctoral dans le groupe de R. Hoffmann (Cornell University, États-Unis) où il a pu compléter sa formation en chimie théorique appliquée, tant dans le domaine de la chimie des complexes de métaux de transition que dans celui de la chimie du solide ou des surfaces. Leurs travaux sur l'activation des liaisons H-H et C-H ont eu un fort impact dans la communauté des chimistes organométalliciens et de surface.

Après cette période, il s'est intéressé à la structure électronique des clusters de métaux de transition dont la chimie se développait rapidement à l'époque. Son travail sur l'interprétation de structures inattendues ou complexes de nouveaux clusters n'a pas cessé depuis. Il est devenu un spécialiste des règles de comptage électroniques (relations structure/nombre d'électrons) et s'est plus particulièrement intéressé aux composés qui n'obéissent pas aux règles habituelles, y compris aux espèces paramagnétiques : pourquoi ces types de composés sont-ils stables et peut-on comprendre (voire prédire) leurs propriétés ? Dans ce domaine, il a aussi travaillé sur des clusters de composés de l'état solide, mettant à profit une collaboration avec un groupe de solidistes rennais solidement établi dans ce domaine. Il a pu ainsi établir que des similitudes électroniques existent entre des clusters moléculaires et des clusters de composés de l'état solide. Dans la même optique, Jean-Yves Saillard s'intéresse aussi aux complexes organométalliques mono- et binucléaires qui n'obéissent pas à la règle des 18 électrons. Dans ce domaine, sa collaboration sur les complexes réservoirs d'électrons avec D. Astruc a été extrêmement fructueuse.

Mais les règles de comptage électronique ne sont pas seulement utiles en chimie moléculaire. Elles constituent aussi un outil précieux pour la compréhension de la structure et des propriétés de composés de l'état solide que le groupe de Jean-Yves Saillard a mis à profit pour interpréter la structure et les propriétés de toute une famille de borocarbures, boronitrides et borosiliciures de terres rares, en collaboration avec l'équipe de J. Bauer à Rennes. Pour interpréter la liaison dans ces composés, ils ont développé un modèle de décompte électronique basé sur la règle de l'octet et quelques autres critères simples, qui a été établi à partir de calculs de bandes. Ce modèle est utilisé dans le but d'orienter les synthèses pour optimiser certaines propriétés et obtenir des composés nouveaux. Dans le même ordre d'idée, il travaille avec le groupe rennais de R. Marchand sur des oxynitrides de métaux en vue d'optimiser leurs propriétés de pigments.

Travaillant dans le domaine de la chimie théorique appliquée et de la modélisation, Jean-Yves Saillard a été amené à collaborer avec un nombre important de chimistes expérimentalistes français, européens, sud- et nord-américains. Pour ce faire, il bénéficie de l'aide d'un groupe constitué de cinq permanents et d'une demi-douzaine d'étudiants et de stagiaires dont le co-animateur est J.-F. Halet.

Prix des divisions 2002

Catalyse

• Marco Daturi

Marco Daturi, 38 ans, est actuellement maître de conférences à l'université de Caen et enseignant-chercheur dans le Laboratoire de catalyse et spectrochimie de l'ISMRA où il a effectué son post-doctorat.

Marco Daturi est venu à la catalyse par la voie de la chimie structurale et de la spectroscopie. En effet, il a débuté sa carrière de chercheur à l'Institut de Chimie Physique de l'université de Gênes par des travaux en synthèse et caractérisation de matériaux supraconducteurs. Ses travaux sur les systèmes Céline-Zircone à l'ISMRA l'ont tout naturellement conduit à s'intéresser à la catalyse trois voies et aux pots catalytiques de dernière génération.

Marco Daturi est à la tête de 62 publications dans des revues à comité de lecture, de 2 brevets, de 3 conférences invitées, de 25 communications orales

et de 34 affiches dans des congrès nationaux et internationaux.

Par ailleurs, son rayonnement scientifique a déjà largement dépassé nos frontières, puisqu'il représente le Laboratoire au PICS Japon et au PICS Brésil. Il faut également noter qu'en plus de tout cela, Marco Daturi enseigne la chimie générale en DEUG et la thermodynamique en licence de chimie.

Chimie organique

• Prix pour un scientifique : Angela Marinetti



Après une thèse soutenue à Turin sur les clusters organométalliques et un séjour post-doctoral à Rennes, Angela Marinetti intègre, en qualité d'attaché de recherche au CNRS, l'équipe de François Mathy à Thiais. Devenue chargée de recherche, elle passe un an à l'université du Wisconsin avant de retourner dans son unité, maintenant à l'École polytechnique, où elle est promue directeur de recherche en 1991. En 1997, elle rejoint le Laboratoire Synthèse sélective organique et produits naturels à l'ENSCP (J.-P. Genet).

Après sa formation initiale, Angela Marinetti s'est consacrée à différents aspects de la chimie organique du phosphore. Tout d'abord, elle s'est intéressée à la stabilisation par les métaux de transition d'espèces trop instables pour être valorisées, comme les phosphinidènes (phosphore monocoordonné) et les phosphaalènes (double liaison P=C). Elle a montré que la complexation permettait une bonne maîtrise de la réactivité et développé ainsi une chimie de grande originalité. Ses travaux les plus récents concernent l'utilisation de dérivés chiraux du phosphore pour la synthèse asymétrique. Après un développement concernant des phosphaalènes chiraux, elle a abordé, de façon autonome, le thème alors inédit des phosphétanes chiraux. Deux familles de phosphétanes ont été synthétisées et étudiées : chiralité portée par le phosphore du cycle à 4 chaînons ; chiralité portée par les carbones du cycle. Ainsi, des diphosphines de symétrie C₂ ont été élégam-

ment synthétisées et utilisées pour réaliser des hydrogénations asymétriques catalysées par le ruthénium ou le rhodium, avec des activités et des énantiosélectivités remarquables. Des prolongements très prometteurs dans le domaine des azétinophosphétanes sont en cours, ainsi que la mise au point de diphosphines atropoisomères.

Auteur de 82 publications, 1 brevet et 4 articles de revue sur la chimie du phosphore, récipiendaire de la Médaille de bronze du CNRS, elle a aussi été récompensée, en 1991, par le prix de la division Chimie de coordination.

• Prix pour un industriel : Gérard Hecquet

Dès sa sortie de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Lille (major de la promotion 1966), Gérard Hecquet devient ingénieur de recherche en catalyse puis, à partir de 1974, chef du groupe de recherche sur la catalyse pour les sociétés CdF-Chimie puis Orkem. En 1990, il est adjoint au directeur R & D d'Elf-Atochem, chargé des domaines acryliques et pétrochimiques et de la catalyse en général. De 1996 à 1999, il est détaché au CNRS en qualité de directeur du Laboratoire de catalyse de Lille.

Gérard Hecquet a toujours maintenu un lien étroit avec le milieu universitaire tant en recherche qu'en formation : il a participé à la mise en place et au suivi de plus d'une centaine de thèses universitaires et de post-docs et enseigné à l'ENSC Lille pendant près de 30 ans (en qualité de professeur associé de 1990 à 1999) et à l'École Centrale Lille.

Ses travaux couvrent divers thèmes de la catalyse et de la chimie organique industrielle : déshydrogénation oxydative de l'acide isobutyrique, du propane et de l'isobutane, oxydation du butane en anhydride maléique et du propène en acide acrylique ou en acroléine, synthèse et estérification des acides acrylique et méthacrylique.

Auteur de nombreuses publications (16 articles scientifiques et 8 brevets internationalisés pour les seules 10 dernières années), Gérard Hecquet est Médaille d'Or de la Société Industrielle du Nord de la France (1966), Prix de l'Instrumentation et du Génie Chimique de la Société d'Encouragement pour l'Industrie Nationale (1988) et Officier des Palmes Académiques.

Il est actuellement adjoint au directeur R & D d'Atofina, chargé des programmes court terme de plusieurs divisions et des programmes long terme de l'ensemble des procédés catalytiques.

• Prix Dina Surdin : Jean-Guy Boiteau

Jean-Guy Boiteau, âgé de 28 ans, est motivé et passionné pour la chimie depuis longtemps : il a été classé 1^{er} aux Olympiades de la chimie en 1993 et 2^e aux Olympiades internationales. Ingénieur de l'ENSC Mulhouse (major de promotion), il a passé une année en alternance chez Hoffman-Laroche à Bâle. Il est actuellement en séjour post-doctoral en Hollande (B.L. Feringa). Après son DEA (major, mention TB), il a préparé sa thèse à l'ENSC Mulhouse, sous la direction de Jacques Eustache. Son travail concerne la recherche d'inhibiteurs de la méthionine aminopeptidase intervenant dans l'angiogénèse et la synthèse d'analogues de la fumagilline. J.-G. Boiteau s'est d'abord penché sur la conception et la réalisation d'une nouvelle synthèse totale asymétrique de la fumagilline ouvrant des accès potentiels aux différentes régions à modifier. Cette tâche, très ambitieuse, a été menée à bien et la synthèse réalisée fait partie des quatre seules décrites à ce jour. Cette réussite a été exploitée en préparant, à la suite, plusieurs analogues soigneusement ciblés, en trouvant au passage des solutions intelligentes et élégantes à des problèmes à première vue insolubles.

Jean-Guy Boiteau a effectué non seulement un remarquable et difficile travail de synthèse organique, mais il apporte aussi une contribution importante à l'avancement des recherches médicales dans le domaine très actuel de l'angiogénèse.

• Prix Acros-SFC : Paul-Henri Ducrot

Paul-Henri Ducrot, 38 ans, est directeur de recherche à l'INRA. Ancien élève de l'École polytechnique, il a soutenu en 1990 une thèse sur la structure et la synthèse des calystégines, sous la direction de Jean-Yves Lallemand. Il intègre aussitôt l'INRA en qualité de chargé de recherche mais, pour des raisons logistiques, reste localisé à l'École polytechnique jusqu'en 1994, en tant que chef de l'équipe « Chimie de synthèse ».

Dès l'installation de l'Unité de phytopharmacie et médiateurs chimiques au centre INRA de Versailles, Paul-Henri Ducrot se voit confier la responsabilité de l'équipe de Chimie et physico-chimie des produits naturels. Il développe alors des travaux, en relation étroite avec les biologistes, autour d'une thématique qui inclut trois pôles : extraction et identification de produits d'origine animale

intervenant dans la communication chimique intraspécifique et de métabolites secondaires de végétaux à activité pesticide, synthèse totale de produits naturels, et élaboration et formulation de principes actifs utilisables en protection des cultures et des récoltes.

P.-H. Ducrot a identifié par RMN plusieurs phéromones d'insectes, des phytoalexines de plantes, des métabolites secondaires et des toxines de champignons pathogènes. Il a étudié de nombreux métabolites à propriétés pesticides et s'intéresse à la pollution des terrains cultivés par le biais de l'étude de la dégradation des xénobiotiques. En synthèse totale, il a préparé diverses phéromones d'insectes, des toxines fongiques, des alcaloïdes nortropaniques ou azétidiniques, des antiappétants de la famille des agarofuranes et des clérodanes, etc. Ses travaux actuels portent également sur la synthèse et la biosynthèse des tanins condensés et d'autres polyphénols d'intérêt nutritionnel.

Auteur de 42 publications et d'un brevet, P.-H. Ducrot a également rédigé 2 chapitres d'ouvrages. Il participe à l'enseignement (DEA « Protection des cultures » de l'INA-PG) et est examinateur au concours d'entrée à l'École polytechnique.

• **Prix Sigma-Aldrich-SFC :**
Victor Mamane

Victor Mamane, 27 ans, a effectué de brillantes études à l'université René Descartes Paris V avant de préparer un DEA et une thèse à l'université Paris XI Orsay, sous la direction d'Olivier Riant. Il est actuellement en stage post-doctoral à Muelheim (A. Fuerstner).

Sa thèse, consacrée à la synthèse et aux propriétés physico-chimiques d'assemblages de polyferrocènes chiraux dans des structures à haut degré de symétrie, concerne des molécules présentant des potentialités dans différents domaines de la science des matériaux, de l'optique non linéaire à la conversion de l'énergie solaire, en passant par les matériaux à valences mixtes. Les nombreux objets synthétisés, parfois au terme de multiples étapes, sont de masses moléculaires comprises entre 1 000 et 10 000 : molécules octupolaires énantiomériquement pures constituées de 3 unités ferro-céniques, issues de couplages au palladium ; édifices obtenus par cyclo-trimérisation d'alcyne et réunissant de multiples entités électroactives (ferrocényles chiraux et complexes de ruthénium) ; [60]-fullerènes fonctionnalisés par des groupements ferrocényles et

des terpyridines, complexants potentiels de métaux de transition, etc.

Victor Mamane a préparé et étudié un nombre impressionnant de nouvelles molécules, remarquables par leur complexité, leur originalité et parfois leur esthétique ; il s'agit d'un véritable tour de force de synthèse. Son travail illustre de façon remarquable la contribution déterminante que peuvent apporter les chimistes organiciens au développement des nanosciences.

• **Prix Fournier-SFC :**
Yoann Coquerel

Yoann Coquerel a effectué de très bonnes études à l'université de Dijon, puis à l'université Joseph Fourier de Grenoble. Après le DEA (mention TB), il a préparé un doctorat à Grenoble sous la direction de Jean-Pierre Deprès. Agé de 27 ans, il effectue actuellement un séjour post-doctoral à Tallahassee (Robert Holton).

Ses travaux sont consacrés à une nouvelle approche générale de produits naturels possédant le squelette bicyclo[5,3,0]décané. La nouvelle méthode est basée sur les dérivés du cycloheptatriène et de la tropolone ; c'est ainsi que la cycloaddition [2+2] entre le dichlorocétène et les dérivés du cycloheptatriène permet un accès très efficace au squelette recherché.

L'approche est illustrée par la synthèse totale du guaiazulène et du 4,10-diméthylazulène naturels, de deux guaïanes (déoxytorilone et 1-épi) et d'un guaïanolide (déoxygeigerine). Ces synthèses sont réalisées à partir d'un intermédiaire commun obtenu en 6 à 9 étapes à partir du cycloheptatriène, ce qui souligne la modularité et la généralité de l'approche. Les complexes fer tricarbonyle de dérivés du cycloheptatriène et de la tropolone ont été également valorisés par des réactions d'addition nucléophile d'hydrures et d'organométalliques.

Ses recherches, remarquables en qualité et en quantité, constituent une avancée significative et originale dans la synthèse totale des molécules naturelles renfermant un squelette bicyclic assez fréquemment rencontré, mais difficile à construire.

Chimie du solide

• **Maryline Guilloux-Viry**

Diplômée de l'INSA de Rennes, Maryline Guilloux-Viry a soutenu son doctorat en 1991 et une habilitation à

diriger des recherches en 1998. Membre de l'E-MRS Society dont elle a reçu le Prix Young Scientist en 1992, M. Guilloux-Viry est une scientifique reconnue dans le milieu des matériaux en couches minces (ablation laser), sujet qui lui a valu d'être sollicitée pour l'édition d'un ouvrage intitulé *Crystal growth in thin solid films: control of epitaxy*, publié dans Crystal Growth Research Series (Network Publishers).

Le prix de la division lui a été attribué pour ses travaux sur l'élaboration et la caractérisation de couches minces de matériaux complexes à propriétés spécifiques (cuprates supraconducteurs, phases de Chevrel, ferroélectriques de type PZT...).

Actuellement chargée de recherche au Laboratoire de chimie du solide et inorganique (CNRS/Institut de Chimie de Rennes), elle assume par ailleurs diverses responsabilités administratives comme la co-direction de son laboratoire.

Prix binationaux

Prix franco-allemand Grignard-Wittig :

• **Charles Mioskowski**

La Société des chimistes allemands (GDCh) a décerné ce prix à Charles Mioskowski (université Louis Pasteur, Strasbourg). Ce prix a donné lieu à trois conférences qui ont été prononcées à Leipzig et Stuttgart (*Nouveaux carbénoïdes du chrome (III)*) et Tubingen (*Cristallisation en une et deux dimensions de protéines*) respectivement les 29 et 31 janvier et 1^{er} février derniers.

Charles Mioskowski, né en 1946, est directeur de recherche au CNRS et travaille au Laboratoire de synthèse bioorganique de la Faculté de pharmacie de l'université Louis Pasteur ainsi qu'au Service des molécules marquées du CEN Saclay à Gif-sur-Yvette. Ses activités de recherche concernent le développement de nouveaux réactifs et réactions, la synthèse totale de produits naturels ainsi que la chimie combinatoire en chimie de synthèse ; et en chimie organique, la cristallisation bi-dimensionnelle de protéines, ainsi que les anticorps catalytiques.

• *Nous rappelons que ce prix est décerné tous les deux ans :*
- soit par la SFC à un chimiste allemand,
- soit par la GDCh à un chimiste français
(voir L'Act. Chim., mai-juin 2002, p. 127).

Sections

Alsace

29 novembre 2002

1^{er} Forum JSPS

Strasbourg

A l'occasion de l'installation en France d'une antenne de la Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), un 1^{er} forum sera organisé en France avec au programme : I. Iwamura (président de la Société Chimique du Japon), T. Kunitake (Prix de l'Empereur du Japon), R. Noyori (Prix Nobel 2001), J.-M. Lehn (Prix Nobel 1987), J.-Y. Lallemand et D. Mansuy (Académie des sciences).

- Patrick Pale. Tél. : 03 88 41 60 42.
Fax : 03 88 41 60 42. ppale@chimie.u-strasbg.fr

Aquitaine/Languedoc-Roussillon/Midi-Pyrénées

22 novembre 2002

12^e Journée Chimie Grand
Sud-Ouest

Montpellier

Chimie organométallique et hétérochimie, chimie de coordination et catalyse, chimie organique et biomolécules, chimie du solide et matériaux seront au programme des communications orales de cette journée (voir *L'Act. Chim.*, juillet 2002, p. 46).

Les **résumés des communications** sont à adresser avant le **17 octobre 2002** à J.-L. Olivé (olive@cit.enscm.fr).

- Renseignements, programme et inscriptions :
GSO@enscm.fr
<http://www.enscm.fr/GSO/>

Bourgogne-Franche-Comté
Nouveau bureau

Président : Sylvain Jugé
Vice-président : Joël Vebrel
Trésoriers : Yves Mugnier et Michaël Knorr
Secrétaires : Claude Dubois et Hélène Cattey

- S. Jugé, Université de Bourgogne, LSEO,
6 bd Gabriel, BP 138, 21000 Dijon.
Tél. : 03 80 39 61 13. Fax : 03 80 39 60 98.
Sylvain.Juge@u-bourgogne.fr

Groupes

Formulation

9-10 décembre 2002

9^e Journées de formulation

Lyon/Villeurbanne

Cette année, les Journées de formulation

s'internationalisent en se déroulant au sein des Entretiens Jacques Cartier. Le thème de 2002 : « **Formulation des composés siliconés et fluorés : concurrence ou complémentarité ?** » permettra de comparer les propriétés de ces deux familles de spécialités aux domaines d'applications très riches et sera illustré par les conférences suivantes :

- *Silicones et fluorés : des matières premières aux propriétés d'usage*, par Gilbert Schorsch (UIC Ile-de-France).

- *Pourquoi introduire de la silice dans les huiles et les gommes de polydiméthyles siloxanes ?*, par Jean-Pierre Cohen Adad (université Joseph Fourier, Grenoble).

- *Propriétés physico-chimiques des systèmes à base de tensio-actifs fluorés : comparaison avec les systèmes hydrogénés*, par Marie-José Stebe (université Henri Poincaré, Nancy).

- *Le PVDF et ses applications*, par Jacques Komornicki (Atofina).

- *Preparation, stability and properties of emulsions stabilised solely by silica particles*, par Bernard P. Binks (Hull Univ., Royaume-Uni).

- *Le challenge de la formulation de silicones réactifs en milieux aqueux*, par Michel Feder (Rhodia).

- *Formulating silicones into aqueous systems*, par Glen Verhovnik (OSI Specialties Crompton SA, Genève).

- *Silane, siloxane, silicon resin taylor made for self priming decorative coating*, par Alain Hausberger (Wacker).

- *Factors influencing the treatment of paper with fluorochemical surfactants for grease-proof applications*, par Robert Pelton (Mac Master University, Canada).

- *Modification superficielle des charges par fluoration*, par Alain Demourgues (CNRS, Bordeaux).

- *Mécanismes d'adhésion et contrôle de l'adhérence pour les matériaux très déformables*, par Costantino Creton (CNRS, Paris).

- *Les mastics silicones : préparation et performance*, par François de Buyl (Dow Corning, Belgique).

- *Une colle silicone thixotrope à prise rapide : est-ce possible ?*, par Alain Pouchelon (Rhodia).

- *Rôle des composés hautement fluorés dans la formulation des substituts du sang et dans celle des agents de contraste pour le diagnostic par ultrasons*, par Jean Riess (Univ. of San Diego, États-Unis).

- *Substituts des CFC dans les fluides frigogènes*, par Gérard Guilpain (Atofina).

- *Émulsions eau dans huile silicone :*

stabilisation par des protéines, par Mikael Brook (Mac Master University, Canada).

- *Applications des silicones dans l'optique de contact*, par Daniel Wild (Ciba Vision).

- *Les silicones dans les produits de coiffage*, par Françoise Pataut (R & D L'Oréal).

Ces journées prendront fin avec une table ronde sur le thème « *Silicones et fluorés : chimie ou formulation ?* », animée par le Pr Boutevin (ENSC Montpellier).

En dehors des conférences déjà prévues, les communications scientifiques en rapport avec le thème du congrès se feront uniquement par voie d'affiches. **Date limite d'envoi des résumés** (de préférence par e-mail à lanteri@cpe.fr) : **30 septembre 2002.**

Date limite d'inscription :
24 octobre 2002.

- Marie-Hélène Lara, Laboratoire de chimométrie, ESCPE Lyon.
Tél. : 04 72 44 81 21. Fax : 04 72 44 83 19.
E-mail : lara@cpe.fr

Parrainages

21 novembre 2002

Maîtrise des risques industriels pour une chimie sûre et durable

Paris

Parce qu'une chimie sûre et durable exige des procédés de plus en plus propres et robustes intégrant dès leur conception le facteur humain et prenant en compte les défaillances inhérentes à tout système, la Société Française de Génie des Procédés (SFGP), la Société Française de Chimie (SFC), la Société de Chimie Industrielle (SCI), l'Association Française des Techniciens du Pétrole (AFTP), le Conseil National des Ingénieurs et Scientifiques de France (CNISF) et le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) joignent leurs efforts pour soutenir la recherche, le développement et la diffusion de la culture du risque en engageant un débat sur la sûreté de fonctionnement, la maîtrise des risques et leur degré d'acceptabilité par la société civile.

- SCI. Tél. : 01 53 59 02 10. Fax : 01 45 55 40 33.

22 octobre 2002

6^e Entretiens physique-industrie Physique et chimie du recyclage

Paris

Ces 6^e Entretiens sont organisés par la Société Française de Physique (SFP), le Conseil National des Ingénieurs et

des Scientifiques de France (CNISF) et la SFC dans le cadre de Mesurexpo-Exposition de Physique.

Au programme :

- *Gestion des déchets nucléaires et recyclage des matières énergétiques ou toxiques*, par Philippe Leconte (CEA, DEN/DDIN).

- *Les fonctionnalités des plastiques et leur rôle pour le développement durable. Participation des producteurs de matières plastiques aux initiatives de collecte et de valorisation en fin de vie*, par Jean-Jacques Couchoud et Yves Samuel (Atofina).

- *Le recyclage des produits verriers*, par Hervé Arribart (Saint-Gobain).

- *Associer caractérisation des déchets et définition des filières de traitement ou de valorisation*, par Corinne Bekaert (SITA Tech.).

- *Boues des stations d'épuration et recyclage agricole*, par Alain Huyard (CIRSEE) et Élisabeth Jaskule (Lyonnaise des Eaux).

- *L'acier, un matériau indéfiniment recyclable*, par Jean-Louis Birat (IRSID).

La table ronde « *Concevoir en vue de recycler, remplacement des matières interdites, exploitation des déchets*,

coût du recyclage » sera animée par Jean-Claude Bernier, directeur du Département Sciences chimiques du CNRS.

• Ghislaine Collon, SFP.
Tél. : 01 44 08 67 10. Fax : 01 44 08 67 19.
secretariat@sfpnet.org
www.cnisf.org

15-20 juin 2003

HPLC 2003

27th International symposium on high performance liquid phase separations and related techniques

Nice

Date limite de soumission des résumés de communication : 10 décembre 2002.

• MCI. Tél. : 01 44 53 72 20. Fax : 01 44 53 72 22.
congres@mci-salons.fr ou
maryse.deleris@hplc2003.com pour les résumés.
www.hplc2003.com

17-19 septembre 2003

FRPM'03

9th European meeting on fire retardancy and protection of materials

Lille-Villeneuve d'Ascq

La résistance au feu est le problème

majeur pour le développement de nouveaux matériaux et de nouvelles technologies utilisant des matériaux polymères. De multiples applications tels le bâtiment, le textile, les transports et l'isolation électrique et thermique, sont susceptibles d'utiliser ces matériaux nouveaux.

La plupart des polymères sont des combustibles. De ce fait, la propriété « retard » de flamme des polymères doit être prise en compte afin de prévenir ou réduire les dommages liés au feu et les risques de pollution liés à l'application de technologies nouvelles.

Les objectifs du congrès doivent permettre une rencontre pluridisciplinaire des sciences fondamentales et appliquées, des représentants du monde industriel et des universitaires. Les présentations devront concerner la résistance au feu, à la flamme et à la combustion, les nouveaux matériaux, les concepts récents ainsi que les tendances de la réglementation et l'uniformisation des méthodes d'essai et des normes.

• Secrétariat FRPM'03.
Tél. : 03 20 43 49 25. Fax : 03 20 43 65 84.
frpm03@ensc-lille.fr
<http://www.ensc-lille.fr/actu/frpm/frpm03.html>

Jean-Claude Barrière (1956-2002)

Nous avons appris, avec une très grande tristesse, le décès fin mai, dans des conditions tragiques, de Jean-Claude Barrière, chimiste médical chez Aventis et expert antibactériens. Après un doctorat de chimie en 1982 dans le laboratoire du professeur Gero et un stage post-doctoral dans les laboratoires du professeur Barton à l'Institut des Substances Naturelles (CNRS, Gif-sur-Yvette), il avait rejoint le centre de recherche de Rhône-Poulenc, à Vitry-sur-Seine, en avril 1983.

Après une période initiale dans divers axes thérapeutiques comme le système nerveux central, Jean-Claude Barrière s'était rapidement investi dans les antibactériens et y avait acquis, au fil des années, une grande expertise à la fois biologique et chimique. La grande aventure de sa carrière restera la chimie des pristinamycines. Faisant suite à la commercialisation de la Pyostacine par Rhône-Poulenc dans les années 60 et à l'élucidation structurale dans les années 70, les chimistes de Rhône-Poulenc avaient débuté au début des années 80 un programme d'hémisynthèse destiné à solubiliser les pristinamycines naturelles afin de disposer d'un traitement injectable contre

les infections hospitalières graves à Gram positif. En compagnie de Jean-Marc Paris, Jean-Claude Barrière avait contribué à la découverte et au développement clinique du Synercid, la première streptogramine injectable, lancé aux États-Unis en 1999, pour le traitement des infections hospitalières, souvent mortelles, causées par les entérocoques résistants à la vancomycine.

Jean-Claude Barrière avait reçu en 1996, le prix de la recherche Rhône-Poulenc pour la production de nouvelles pristinamycines I par mutasynthèse, un travail multidisciplinaire combinant biologie moléculaire, chimie et fermentation.

Nous garderons de Jean-Claude le souvenir d'un collègue très apprécié pour ses qualités humaines et reconnu pour son expertise, ses conseils précieux, son travail acharné et sa détermination à faire avancer ses projets.

Nous présentons nos sincères condoléances, de la part de l'ensemble des chimistes d'Aventis, à sa famille et à ses proches, afin de les soutenir dans ces moments douloureux.

Éric Bacqué (Aventis DI&A France)
Jean-Marc Paris (Rhodia)

Lavoisier et l'oxygène

La chronique de Colin Droniou intitulée « Lavoisier et l'oxygène » (avril 2002, p. 36), décrit deux erreurs commises par Lavoisier. Les deux reproches faits au chimiste devraient être remis en perspective. D'abord, Lavoisier n'est pas tant le chimiste qui a « fait sortir la chimie des ténèbres de l'alchimie » que l'homme de loi qui a finalisé un travail déjà largement entamé tout au long du XVIII^e siècle par de nombreux « savants » remettant en cause des principes alchimiques déjà fortement contestés depuis le XVII^e siècle, et qui surtout combattit la théorie du phlogistique.

La première erreur porte dans le choix du nom oxygène pour l'élément. Notons que Lavoisier n'est pas celui qui « entreprit de réglementer la nomenclature ». Cette initiative revient au dijonnais Guyton de Morveau, en 1782. Berthollet, Fourcroy et Lavoisier le rejoindront par la suite et leur ouvrage commun sera publié en 1787. Dans la première moitié du XVIII^e siècle, l'air était encore considéré comme un élément, et donc indécomposable. Des expérimentateurs (Scheele, et surtout Priestley) ont montré que l'air était constitué de deux gaz dont un, le gaz vital, représentait 20 % de l'air. Lavoisier a montré que le gaz vital était composé d'un seul élément qu'il appellera oxygène. De plus, en travaillant sur la chimie de ce gaz, il montra que sa réactivité vis-à-vis de corps comme le carbone, le soufre, l'azote ou le phosphore donnait à chaque fois ce que nous appelons aujourd'hui des oxoacides. Donner le nom d'oxygène (générateur d'acide) à cet élément prenait alors tout son sens. Dire que le nom que Lavoisier a choisi pour l'oxygène est « l'un de ses plus grands contresens » me paraît un peu fort.

La deuxième erreur serait la théorie des acides énoncée par Lavoisier en 1777. Suite aux conséquences de la réactivité de l'oxygène, il énonça que « dans tout acide [on trouve] le principe acidifiant, c'est-à-dire, l'oxigène » (*Traité élémentaire de chimie, 1789, vol. I, p. 69*). La découverte de l'acide chlorhydrique va venir perturber cet énoncé. Dire que cette découverte a eu comme conséquence que « la théorie de

l'oxygène générateur d'acide ne tenait plus debout » est un contresens. Il n'y avait à cette époque aucune certitude qu'il n'y avait pas d'oxygène dans l'acide chlorhydrique ; il avait été constaté que l'acide muriatique (ancien nom de l'acide chlorhydrique) était difficilement décomposable et les chimistes cherchaient à le décomposer pour y trouver l'oxygène. C'est pour ça que le radical muriatique occupe sa place dans la nomenclature de 1787. Si erreur il y a eu, ça a été de généraliser trop rapidement la loi des acides puisqu'il est vrai que Lavoisier propose une loi en ne se basant que sur quatre exemples. Dire que les « chimistes ont tu [la] découverte [de l'acide chlorhydrique] » est inexact ; les chimistes de l'école lavoisienne comme Berthollet ont clairement soulevé le problème et n'ont pas enterré l'affaire ; ils l'ont laissé de côté en attendant de trouver une technique de décomposition appropriée. Notons que l'acide chlorhydrique n'a pas été isolé par Berthollet mais que sa préparation était connue depuis le XV^e siècle par action d'acide sulfurique sur le sel (NaCl), d'où son ancien nom d'« esprit de sel ».

Ce sera plus tard que H. Davy qui, utilisant l'électrolyse, permettra de montrer que le radical muriatique était seulement constitué de chlore, et donc mettait en défaut la théorie des acides de Lavoisier.

Juger Lavoisier sur ses erreurs me semble une approche de l'histoire des sciences peu convenable. A la lumière de nos connaissances contemporaines, il est facile de déceler chez les plus grands un nombre considérable d'erreurs qui n'en sont pas : le principe de conservation de la masse énoncé par Lavoisier revu par la relativité en serait un.

D'autre part, à propos de l'article « Histoire de la chimie » (toujours p. 36), il est dommage que le nom de l'auteur du site, Sébastien Hermann, ne soit pas cité.

Xavier Bataille

A propos de Fernand Gallais

J'ai été profondément attristé à la nouvelle de la mort de Fernand Gallais qui fut mon professeur et mon maître de 1948 à 1950, alors que j'étais élève de

L'École Nationale Supérieure de Chimie de Toulouse.

J'ai beaucoup apprécié l'article de Patrick Cassoux que vous avez publié (avril 2002, p. 63), étant de ceux qui le respectaient profondément, sans pour autant aller jusqu'à l'aimer.

Cependant, je relève dans cet article une erreur que je me dois de vous signaler : Fernand Gallais n'a pas succédé à la direction de l'École à Paul Sabatier (qui était mort en 1941), mais à Georges Mignonac qui partait en retraite en cette année 1950.

S'il est vrai que les deux hommes se détestaient cordialement, ce n'est certes pas une raison pour ignorer ce grand savant, disciple de Paul Sabatier, qu'était Georges Mignonac, qui fut lui aussi mon professeur et maître, que j'ai toujours admiré, et de qui je garde le souvenir ému d'un enseignant particulièrement humain et joignant à un immense savoir une très grande gentillesse émaillée d'un sens de l'humour toujours en éveil. Je me devais à sa mémoire de le dire.

Robert Picard

Les études supérieures en chimie

Suite à la lecture de l'article de E. Champion et S. Bléneau paru dans *L'Actualité Chimique* de mai 2001, j'ai été surpris par l'absence de référence au lycée de l'Escaut* de Valenciennes dans la liste des établissements préparant au BTS « peintures, encres, adhésifs ».

Je me permets de vous apporter ci-après quelques précisions peut-être utiles pour vos lecteurs sur cette formation originale et spécialisée.

Le lycée de l'Escaut est un lycée polyvalent à vocation scientifique et technologique. Ouvert il y a 10 ans, il prépare entre autres aux baccalauréats de chimie, de physique, de biochimie mais aussi à 4 BTS : Biochimiste, Chimiste, CIRA (physique industrielle et gestion de procédés automatisés) et PEA (peintures, encres et adhésifs).

Le BTS PEA est ouvert aux titulaires d'un baccalauréat STL chimie ou S ; l'admission se faisant sur étude du dossier scolaire. En première année, à l'image de la plupart des formations

bac + 2, la formation s'articule autour d'un enseignement général incontournable (expression française, anglais, maths, économie et gestion...) mais aussi d'un enseignement scientifique et professionnel dense (chimie générale, organique, polymères, chimie des matériaux, techniques d'analyses physico-chimiques, rhéologie, colorimétrie, plans d'expériences...). La moitié des horaires de formation se déroule en travaux pratiques. En deuxième année, l'enseignement est plus spécifique et concerne le choix de l'étudiant entre l'option peintures et encres et l'option adhésifs (connaissance des matières premières, des techniques de fabrication et de contrôle du produit fini...).

Le cœur de la formation réside dans la connaissance et la maîtrise de la formulation et des techniques mises en

œuvre. Deux stages permettent à l'étudiant de découvrir des problématiques d'entreprise : le premier à la fin de la première année et d'une durée minimale de quatre semaines, le second à la fin de la deuxième année et d'une durée de neuf semaines.

Les techniciens supérieurs issus du BTS PEA exercent leur activité soit dans la filière des matières premières de ces produits, soit dans celle du produit fini (société productrice, distributrice ou utilisatrice de peintures, encres, adhésifs). Généralement la première insertion professionnelle se fait en laboratoire de recherche et développement ; elle se fait aussi en contact clientèle.

Le lycée de l'Escaut dispose de locaux spécifiques remarquablement équipés et dédiés à cette formation. Cinq promotions ont d'ores et déjà intégré la

vie active et sont opérationnelles en entreprise.

L'invitation est faite aux industriels, grands groupes ou PME, de venir visiter cet établissement afin d'y constater la performance de l'outil de formation mais aussi la disponibilité d'une équipe de professeurs ouverts au partenariat.

A. Vanhoutte

***Lycée de l'Escaut,**

1 avenue de Saint-Amand, BP 229,
59005 Valenciennes Cedex.

Tél. : 03 27 22 11 11.

www2.ac-lille.fr/escaut-valenciennes

(site du lycée)

perso.wanadoo.fr/bts.pea/

(site des étudiants)

Chef de travaux (pour tout renseignement pédagogique sur la formation) :

Tél. : 03 27 22 11 23. Fax 03 27 22 11 27.

Au sommaire des prochains numéros

Octobre

Recherche

- * La science au service du patrimoine européen
- * Structure des matériaux désordonnés à l'échelle atomique
- * Carbure de silicium et catalyse hétérogène

Industrie

- * Les problèmes de l'eau potable

Les travaux pratiques

- * Alkylation réductrice d'un aminoacide

Chimie et vie quotidienne

- * Les sciences à la radio

Novembre-décembre

Numéro spécial

Chimie des substances renouvelables

L'utilisation directe

Les transformations chimiques

Les fermentations

Émanation du Conseil Régional de Haute-Normandie, Le Centre Européen de Bioprospective, créé en 1994, est une association loi de 1901 du paysage économique de la région, dans le secteur Chimie-Biologie-Santé. Sa mission est de favoriser les échanges entre industriels et chercheurs, créer des synergies propices au développement et à l'aboutissement de projets communs et accélérer la liaison Découverte-Innovation-Valorisation.

L'association est dirigée par un Directoire constitué de deux industriels de la Région Haute-Normandie et d'un chercheur hospitalo-universitaire, chacun apportant la connaissance du milieu auquel il appartient et sa spécificité. L'Équipe opérationnelle est essentiellement orientée « *business development management* ». Dans le cadre des objectifs généraux décrits ci-dessus, la mission de cette Équipe est de connaître le tissu industriel dans le domaine de la Chimie, des Biotechnologies, de l'Agroalimentaire, de la Biologie et de la Santé aux plans régional et national, ainsi que les partenaires académiques et leurs compétences respectives, de susciter les interactions et les rencontres, d'établir des collaborations fondées sur les besoins des uns et des autres et, enfin, de participer à la constitution d'un solide maillage entre les différents partenaires. Le Centre Européen de Bioprospective s'inscrit donc dans une démarche concrète et pragmatique de court terme et de moyen terme. Ce maillage des compétences se fonde donc sur une politique des « petits pas », sur l'identification et la menée à bien de projets ponctuels et sur une parfaite connaissance du terrain, des hommes, des thèmes et des structures. A plus long terme, le Centre Européen de Bioprospective a pour vocation de devenir un partenaire naturel des industriels et des chercheurs académiques de la Région de Haute-Normandie, capable de répondre aux besoins rencontrés à tous les stades d'un développement industriel ou de la valorisation d'une recherche fondamentale. Rappelons ici que la Haute-Normandie réunit les plus grands noms de l'industrie chimique et pharmaceutique, un ensemble de PME-PMI que ce soit dans la production de principes actifs ou dans la galénique, un Centre de recherche académique Institut Fédératif de Recherches Multidisciplinaires sur les Peptides fédérant 300 personnes et équipé d'un plateau technique exceptionnel permettant d'aborder génomique et post-génomique. La palette de compétences réunies au sein de l'Institut de Recherche en Chimie Organique Fine IRCOF avec plus de 170 chercheurs, techniciens et doctorants opérant dans les domaines de la Chimie hétérocyclique aromatique, de la Chimie médicinale et biomimétique et de la Chimie verte, supportés par un pôle puissant en sciences séparatives et analyse structurale avec un réseau de Modélisation moléculaire, constitue un Centre de R & D particulièrement attractif.

Le Centre Européen de Bioprospective n'a pas pour vocation de conduire ses propres activités de recherche, de développer ses propres projets, mais tout au contraire, de se placer à l'interface de deux compétences pour en favoriser les synergies, les projets communs, et *in fine*, la valorisation scientifique et économique. A cet égard, l'action du Centre Européen de Bioprospective se situe dans la perspective de la création du Technopôle Chimie-Biologie-Santé dont la Région Haute-Normandie doit se doter d'ici la fin de l'année 2002.



Tél. : 02.32.10.11.70
Fax : 02.32.10.16.48

Place Colbert, 24 bis rue Jacques Boutrolle
BP 24 - 76131 Mt St Aignan Cedex - FRANCE
Président : François TRON
courriel : centre.europeen@bioprospective.fr
web : www.normandieonline.com

Les sociétés organisatrices

AFM

Association Française de Mécanique

AMAC

Association pour les Matériaux Composites

CEFRACOR

Centre Français de l'Anticorrosion

COFREND

Confédération Française pour les essais Non Destructifs

DYMAT

Association pour la promotion des études du comportement Dynamique des Matériaux

GFC

Groupe Français de la Céramique

GFCC

Groupe Français de Croissance Cristalline

GFEC

Groupe Français d'étude des Carbones

GFP/SFC

Groupe Français d'études et d'applications des Polymères, Division de la société Française de Chimie

MECAMAT

Groupe Français de Mécanique des Matériaux

RFM

Réseau Français de Mécanosynthèse

SCI

Société de Chimie Industrielle

SF2M

Société Française de Métallurgie et de Matériaux

SFGP

Société Française du Génie des Procédés

SFμ

Société Française de Microscopie Electronique

SFMC

Société Française de Minéralogie et de Cristallographie

SFN

Société Française de la Neutronique

SFP

Société Française de Physique

SFV

Société Française du Vide

SIS

Société Française des Ingénieurs, Scientifiques et Techniciens en soudage

MATÉRIAUX

19 congrès nationaux
20 associations scientifiques
et techniques

2002

Exposition du Laboratoire, du Contrôle Industriel et des Nouveaux Matériaux.



22 • 24 Octobre

TOURS

Vinci

IDEXPO Organisation : 58, bd Paul Vaillant Couturier. 94246 l'Haÿ les Roses Cedex - Tél.: 01 46 65 18 34
Fax : 01 46 63 26 00 - E-mail : idxpo@wanadoo.fr - Internet : www.idxpo.com

Coupon à retourner à IDEXPO :

Nom _____ Fonction _____

Société _____ Activité _____

Adresse _____ Code postal _____

Ville _____ Pays _____

Tél _____ Souhaite recevoir des informations pour exposer

Fax _____ Souhaite recevoir _____ carte(s) d'invitation pour visiter

E-mail _____ Souhaite recevoir le programme des COLLOQUES.