

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

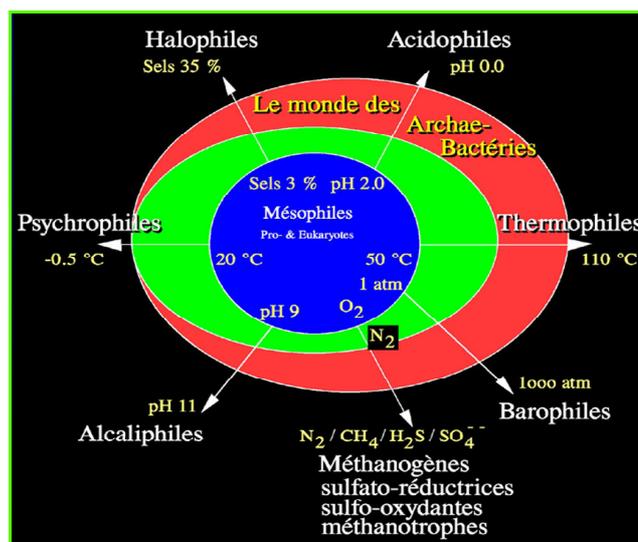


Figure 1 - Les micro-organismes de l'extrême [5].

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) ;

Tableau I - Exemples de conditions optimales de croissance d'extrémophiles.

Micro-organisme	Conditions optimales de croissance	Métabolisme
<i>Pyrolobus fumarii</i>	106 °C, pH 5,5	chimolithotrophe, aérobie
<i>Aquaspirillum arcticum</i>	4 °C	hétérotrophe, aérobie
<i>Picrophilus gen. nov.</i>	60 °C, pH 0,7	hétérotrophe, aérobie
<i>Clostridium paradoxum</i>	56 °C, pH 10,1	hétérotrophe, aérobie
<i>Haloanaerobium lacusroseus</i>	NaCl 200g.L ⁻¹ , 40 °C, pH 7,0	hétérotrophe, anaérobie

- les acidophiles et les alcaliphiles, qui poussent dans des milieux où le pH peut atteindre 0 ou 10 (effluents miniers, lac de soude africain) ;
- les halophiles, que l'on trouve par exemple dans les marais salants et dont la concentration saline est proche de la saturation (de 20 à 35 %) ;
- d'autres milieux extrêmes, tels les solfatares (milieux riches en soufre), les nappes pétrolifères, les aires de décomposition organiques...

Ces environnements considérés par l'Homme comme extrêmes contiennent une flore microbienne caractéristique, qui non seulement s'est bien adaptée à la composition chimique particulière du milieu, mais est également capable d'en retirer l'énergie nécessaire pour son métabolisme, sa croissance, sa reproduction (*tableau I*). La majorité de ces micro-organismes de l'extrême se distingue des procaryotes par une série de critères génétiques et biochimiques,

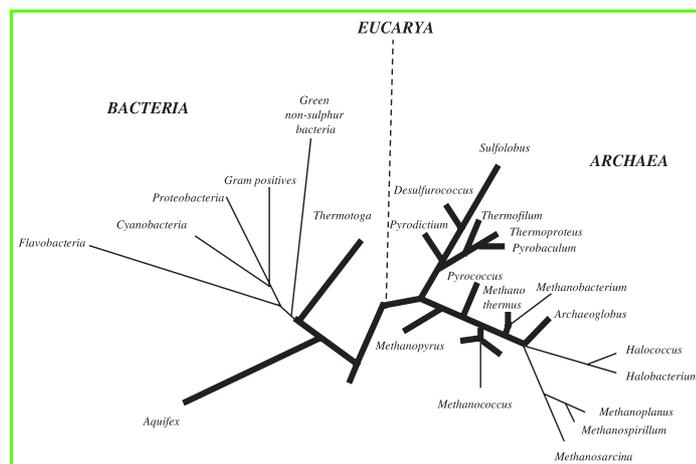


Figure 2 - Arbre phylogénétique universel (modifié d'après Woese, 1994). Les comparaisons des alignements de séquences réalisées avec les ADN ribosomiaux (composant essentiel de la machinerie de la traduction) montrent les trois domaines du monde vivant : les eucaryotes, les eubactéries et les archaea. En gras, on retrouve la répartition des micro-organismes thermophiles. Bien que des eubactéries aient été identifiées dans les milieux extrêmes, les archaea possèdent tous les records des micro-organismes vivants en conditions extrêmes de pH, température, pression, salinité... Cependant, des études concernant la diversité microbienne, réalisées directement à partir d'échantillons bruts sur lesquels le matériel génétique est isolé puis amplifié par PCR (sans que l'on ait besoin d'isoler ni de cultiver le micro-organisme), montrent que les archaea ne sont pas seulement confinés dans les niches écologiques où les conditions de vie sont extrêmes, mais semblent distribués partout à la surface du globe.

justifiant le fait que le monde vivant ne se divise pas seulement en deux règnes, sur la base de la présence ou l'absence de noyau, mais en trois domaines : les eubactéries, les eucaryotes et les **archaea** (*figure 2*) [3].

Certains micro-organismes ont colonisé des biotopes où ils ont pu s'adapter à des conditions de vie extrêmement dures. Pour s'adapter à de tels environnements, ces extrémophiles produisent entre autres des enzymes capables de catalyser toutes les réactions nécessaires à leur métabolisme. Les propriétés de ces enzymes nouvelles issues de ces micro-organismes en font des catalyseurs intéressants pour de nombreuses applications industrielles où ils pourront remplacer leurs homologues habituels (d'origine mésophile principalement) bien moins résistants. Ces enzymes de l'extrême ou **extrémenzymes**, beaucoup plus résistantes, sont plus faciles à conserver, à utiliser et permettent ainsi de réduire dans certains cas le nombre d'étapes des procédés industriels, et ainsi d'augmenter la productivité. Elles permettent aussi d'accéder à des domaines d'application non explorés jusqu'alors. A titre d'exemple, le *tableau II* illustre quelques applications

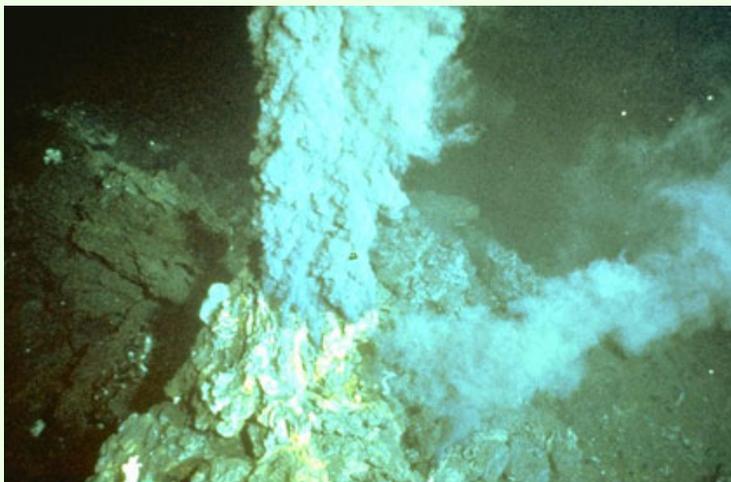
Tableau II - Domaines d'applications potentielles d'enzymes thermostables. (d'après Bruins *et al.*, *Appl. Biochem. Biotech.*, 2001).

Enzymes	Applications industrielles	Pourquoi utiliser une extrémenzyme ?	Brevets
<i>Cylo-dextrine glycosyltransférase</i>	Sirop de glucose	Compatibilité avec un procédé à haute température déjà existant	US5714369
<i>Cellulase</i>	Papier et pâte à papier	Compatibilité avec un procédé à haute température déjà existant	WO 9744361, WO 9714804
	Détergent	Stabilité à pH alcalin	WO 9744361, WO 9714804, WO 9743381
<i>Xylanase</i>	Blanchiment de la pâte à papier	Compatibilité avec un procédé à haute température déjà existant	US 5922579, EP 828002, WO 9736995, WO 9722691, WO 9714803
<i>Protéase</i>	Détergents	Stabilité à pH alcalin	
	Synthèse de peptides	Stabilité en solvant organique	US 5714373
<i>ADN polymérase</i>	Amplification, marquage d'ADN, transcription reverse, séquençage	Stabilité à haute température	US 6054301, WO 9953074, WO 0020629, WO 9845452, WO 9814590, WO 9735988, EP 892058, WO 9814588
<i>ADN ligase</i>	LCR (« Ligase chain reaction »)	Stabilité à haute température	WO 0026381, US 5830711
<i>Alcool déshydrogénase</i>	Synthèse chirale, arômes	Meilleure stabilité (solvant, température)	WO 9921971
<i>Laccase</i>	Blanchiment de la pâte à papier	Stabilité à pH alcalin	WO 9725469 WO 9743381

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 (vestimentifères), 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.

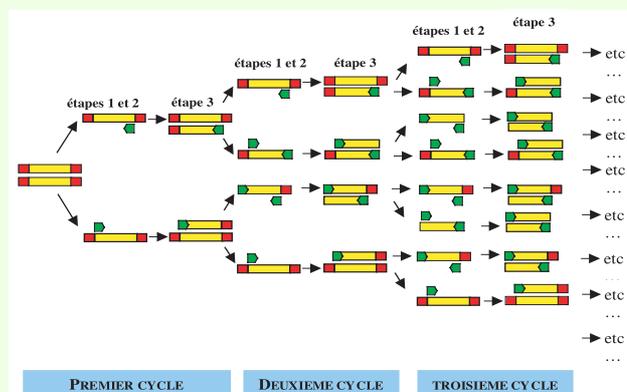


Schéma illustrant le principe de l'amplification par PCR

- 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 extrêmzymes 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)**.

* 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



Y. Gueguen



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