

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. PhenomicsTM is a functional HTS technology designed and patented by Protéus for the screening of natural biodiversity as well as biodiversity generated by combinatorial biology. PhenomicsTM 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-ShufflingTM, has been designed and patented by Protéus. The thousands of new recombinants generated by L-ShufflingTM can be further screened for their biochemical characteristics using PhenomicsTM. The whole process of novel biocatalysts discovery and optimization has been automated using commercially available high throughput robotics.

Mots-clés

Biocatalyse, CLIPS-OTM, biodiversité, PhenomicsTM, criblage, L-ShufflingTM, évolution dirigée.

Key-words

Biocatalysis, CLIPS-OTM, biodiversity, PhenomicsTM, screening, L-ShufflingTM, 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*.

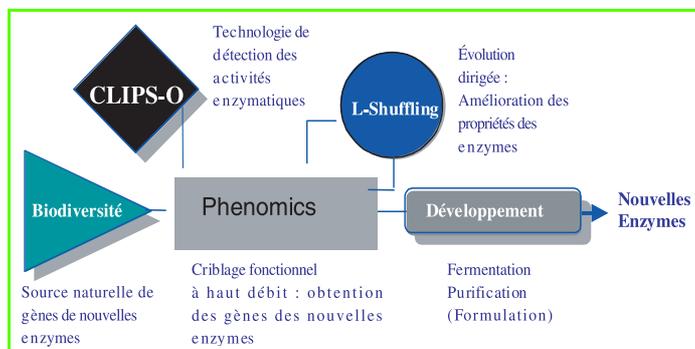


Figure 1 - Synergie entre les différentes technologies de Protéus pour aboutir à la mise au point d'un nouveau produit.

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 (ie 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

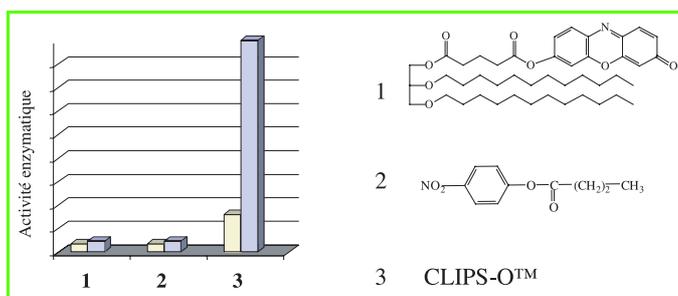


Figure 2 - Rapport signal/bruit obtenu avec un substrat CLIPS-O™ mis en œuvre dans un criblage Phenomics™ de lipases (1µL de produit Phenomics™ par essai – activité testée à température élevée).

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, WO0192563, 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 : flfevre@proteus.fr, gravot@proteus.fr, hknguyen@proteus.fr, lfourage@proteus.fr,

jmsonet@proteus.fr, ddupret@proteus.fr