

# 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 noirs<sup>1</sup> » 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 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

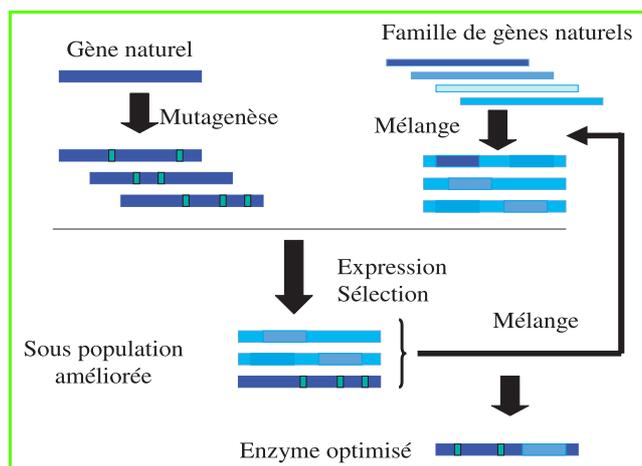


Figure 1 - Principe de l'évolution dirigée.

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 :

- on ne cherche pas à sélectionner le « meilleur » mutant mais toute une série de variants présentant chacun une forme d'amélioration fonctionnelle ;
  - 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 ;
  - 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 plus 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 recombinaison 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

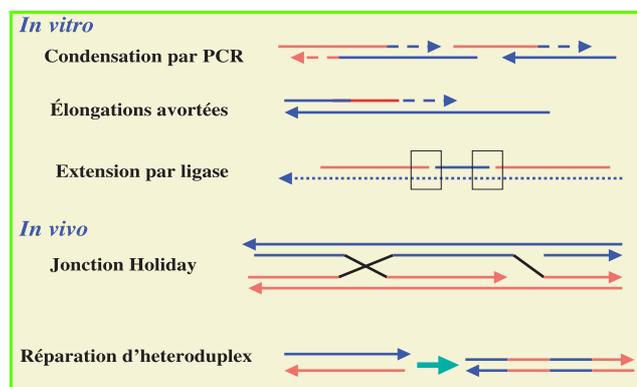


Figure 2 - Principaux mécanismes de recombinaison utilisés pour le mélange de gènes.

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

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 sécrétées. 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.

### 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<sup>TM</sup> (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 ligation<sup>2</sup>. 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.

## 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'énantioselectivité [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

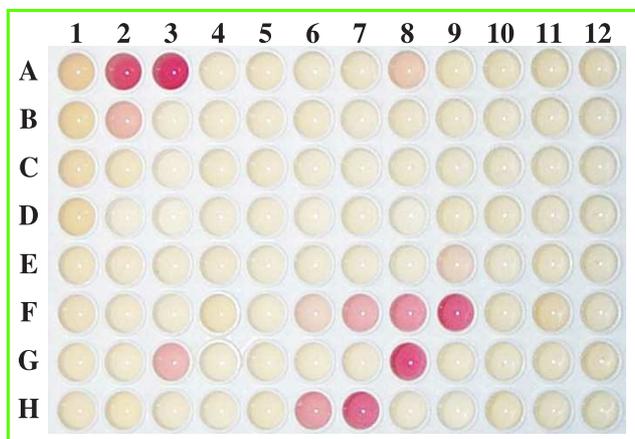


Figure 3 - Conversion du naphthalène en naphthol par des clones de levure exprimant une bibliothèque de P450 humains mosaïques.

### Encadré 2

#### Les systèmes d'expression et de sélection

##### Bactéries, levures et cultures cellulaires (in vivo)

Un plasmide d'expression est transféré 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<sup>®</sup> 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*<sup>®</sup>, 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 inimaginable [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

totallement 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

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

<sup>2</sup>ligation : 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](http://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/>

