

Biocatalyse, bioconversion et biotechnologie blanche

Des outils du vivant pour la chimie

Anne Zaparucha, Véronique de Berardinis et Jean Weissenbach

Résumé	L'idée que la chimie doit s'insérer dans une perspective de développement durable fait son chemin. L'utilisation des outils catalytiques du vivant sous ses différentes formes – enzymes isolés, micro-organismes entiers – permet d'aller dans ce sens et est une des alternatives à la chimie de synthèse. Cette approche nécessitant une étroite collaboration entre chimistes et biologistes ouvre de nombreuses perspectives. Cet article présente une vue d'ensemble de cette thématique et des moyens pour en dépasser les limites.
Mots-clés	Biocatalyse, bioconversion, biotechnologie blanche, ingénierie métabolique, biologie synthétique, chimie durable.
Abstract	Biocatalysis, bioconversion and white technology: tools from the living world for chemistry The idea that chemistry must form a part of sustainable development makes progress. Using the catalytic tools from the living world – isolated enzymes, whole microorganisms – represents one of the alternative options to synthetic chemistry. This approach needs a strong collaboration between chemists and biologists and paves the way to numerous opportunities. This article presents an overview of this thematic and of the ways to overcome its limits.
Keywords	Biocatalysis, bioconversion, white technology, metabolic engineering, synthetic biology, sustainable chemistry.

La chimie a commencé une profonde évolution qui résulte d'une prise en compte grandissante de l'impact environnemental des procédés de synthèse. Cette responsabilisation progressive a fait suite à la formulation des douze principes de la « chimie verte » au cours des années 90 aux États-Unis [1]. Mais la conversion de l'industrie chimique à des pratiques plus vertes représente un défi gigantesque, sur les plans scientifique, opérationnel, organisationnel et financier.

D'une manière remarquable, l'introduction de méthodes biocatalytiques et d'ingénierie métabolique peut avoir un effet positif qui concerne jusqu'à neuf des douze principes et se place ainsi loin devant les autres pratiques mises en œuvre ou envisagées. Ceci n'est pas complètement étonnant car la chimie développée par le vivant est intrinsèquement au cœur d'écosystèmes établis sur le long terme qui ont acquis une stabilité au fil du temps et où les organismes se développent collectivement en évitant de perturber leur environnement. À quelques exceptions près, les processus chimiques du vivant sont verts par construction.

Les débuts de la biocatalyse industrielle

L'utilisation de procédés biocatalytiques par l'homme remonte à la nuit des temps. Elle concernait aussi bien l'élaboration d'aliments, de matériaux, d'édulcorants, de colorants que de produits chimiques bruts. Les premières applications s'appuyant sur la biocatalyse* ont fait appel à des micro-organismes* entiers (fermentations*). Ce n'est cependant que dans les années 1830 que l'on commence à comprendre que les transformations opérées dans les

fermentations sont de nature catalytique (Berzelius). C'est aussi dès les années 1830, alors qu'on ignore encore le principe sous-jacent, que l'on commence à utiliser des ferments solubles extraits et non plus des organismes entiers, par exemple pour l'hydrolyse de l'amidon ou la fermentation du lactose ou du sucre. Ce ne sera qu'à la fin du XIX^e siècle que l'on aboutira, moyennant des polémiques retentissantes entre vitalistes et réductionnistes, au consensus que les agents responsables de ces transformations (les enzymes*) sont produits par des organismes vivants.

Au XIX^e siècle coexistent donc déjà deux manières de faire des conversions chimiques biocatalytiques : soit par les méthodes traditionnelles qui utilisent des organismes entiers, soit à partir d'extraits d'organismes (diastases). C'est aussi au cours de cette même période que la chimie de synthèse s'est progressivement et considérablement affranchie de sa dépendance envers des matières premières d'origine biologique et qu'elle a pu produire par synthèse complète des composés antérieurement produits par des systèmes vivants.

Vers la fin du XIX^e, on note un premier progrès après l'utilisation par l'industrie de ferments type diastases préparés et commercialisés par des entreprises créées *ad hoc*. L'utilisation de micro-organismes pour synthétiser des molécules chimiques est apparue en 1915 lorsque Chaïm Weizmann recourt à l'utilisation d'une souche bactérienne, *Clostridium acetobutylicum*, pour fabriquer en anaérobiose* de l'acétone en mélange avec du butanol et de l'éthanol, séparés ensuite par distillation. Ceci permet à l'armée britannique de faire face à la pénurie d'acétone, indispensable pour la fabrication d'explosifs. La paix revenue, le procédé de fermentation de Weizmann est abandonné. Cependant, vers

1920, on peut noter un nouveau recours aux bioconversions* par un champignon filamenteux, *Aspergillus niger*, dans le but de fabriquer de l'acide citrique. Le procédé est rapidement repris par le laboratoire Pfizer, puis suivi par d'autres. Le procédé microbiologique, qui utilise à présent des mélasses de betteraves, est toujours employé. Vers 1930, ces premières tentatives sont suivies par la synthèse de (*R*)-phénylacétylecarbinol, un intermédiaire de l'éphédrine,

Glossaire

Les termes suivis d'un astérisque* dans le texte sont définis ci-dessous.

Anaérobiose : vie en absence d'oxygène moléculaire.

Biocatalyse : catalyse par une substance d'origine biologique, le plus souvent un enzyme.

Bioconversion ou biotransformation : transformation de matières chimiques par des systèmes biologiques, le plus souvent des micro-organismes.

Biotechnologie blanche ou industrielle : transformation de matériaux par des procédés d'ingénierie utilisant des agents ou des systèmes biologiques pour produire des biens et services.

Clonage : introduction d'une séquence d'ADN étranger dans un organisme hôte. Une cellule ayant acquis cette séquence nouvelle pour cet organisme va se diviser et donc donner naissance à un clone dont tous les représentants posséderont cette séquence étrangère, d'où le terme de clonage.

Cofacteur : molécule non protéique associée à l'enzyme, essentielle à la catalyse de certaines réactions.

Enzyme : catalyseur de nature protéique catalysant une transformation chimique spécifique (ou un groupe spécifique de transformations).

Fermentation : réaction biochimique ou succession de réactions (voie métabolique) qui consiste à produire de l'énergie à partir de réactions d'oxydoréductions d'un substrat organique sous l'action d'enzymes microbiens, et à rejeter certains produits de ces réactions. Ces réactions se déroulent en anaérobiose et ne font donc pas intervenir d'oxygène moléculaire. La fermentation se distingue de la respiration, qui nécessite de l'oxygène et se réalise en présence d'air (aérobiose), notamment par son faible rendement énergétique et la diversité des produits synthétisés. Toutefois le terme de fermentation a été étendu à la production de métabolites, antibiotiques, etc., à partir de micro-organismes cultivés en anaérobiose ou en aérobiose.

Génie génétique : ensemble des démarches expérimentales consistant à manipuler des fragments d'ADN, afin de les analyser, d'exprimer le(s) gène(s) qu'ils portent etc., à des fins de recherche ou d'applications. Le clonage d'ADN est la manipulation la plus courante du génie génétique : il permet, en cultivant un grand nombre de cellules d'un clone portant le fragment défini, d'en obtenir de grandes quantités afin d'étudier sa structure, ses propriétés biologiques ou à des fins pratiques.

Métagénome : ensemble des génomes des micro-organismes vivant dans le même écosystème. L'analyse des métagénomes permet l'étude de toutes les bactéries d'un environnement donné, même si l'on ne sait pas les cultiver individuellement en laboratoire.

Micro-organisme : organisme uni- ou pluricellulaire (dont les cellules ne sont pas différenciées en tissu) observable au microscope. Ce terme regroupe des organismes de structure procaryote (virus, bactéries et archées) et eucaryote (algues, protozoaires et champignons).

Mutagenèse : introduction de modifications dans une molécule d'ADN (gène, chromosome, génome) par traitement à l'aide d'un agent mutagène. Les agents mutagènes sont pour l'essentiel des agents physiques ou chimiques dont l'action provoque une altération chimique de la séquence de l'ADN.

Phénotype : caractéristiques observables d'une cellule ou d'un organisme.

après qu'on ait observé (1922) que la levure était capable de catalyser la carbolygation de benzaldéhyde et de pyruvate. Le principe de ce procédé de biotransformation est toujours utilisé de nos jours, soit dans une réaction enzymatique en continu, soit dans un processus cellulaire moyennant un remplacement du pyruvate par l'acétaldéhyde et l'utilisation d'une pyruvate décarboxylase modifiée par mutagenèse*.

Ces exemples, qui illustrent les avantages que présentent les enzymes, constituent les premiers exemples de biotechnologie blanche ou industrielle* à des fins de synthèse chimique. Le cas de l'éphédrine est un cas d'école pour deux raisons. En premier lieu, le processus biocatalytique sous-jacent permet la synthèse d'une forme énantiopure d'un composé chiral. Cet avantage est à attribuer à la pyruvate décarboxylase qui catalyse la réaction de façon stéréosélective. Cette propriété remarquable des enzymes constitue aujourd'hui la première raison de leur utilisation (voir ci-après). D'autre part, il ne s'agit pas ici d'un processus de fermentation véritable à partir d'une source de carbone nutriment, mais de l'utilisation de cellules entières dans lesquelles se déroule une simple étape de la voie de synthèse à partir d'un précurseur non biologique fourni (le benzaldéhyde). Les cellules sont ici utilisées comme réacteur pour une étape de bioconversion du processus de synthèse.

Malgré ces premiers succès, la progression de la biocatalyse industrielle reste lente et rares sont les produits chimiques obtenus de micro-organismes. Il s'agit principalement de butanol (pendant un temps limité), de certains acides organiques et de quelques vitamines. La production de pénicilline par des micro-organismes à partir des années 40, suivie par celle d'autres antibiotiques par des méthodes de fermentation semblables, annonce le début d'une nouvelle ère de la fermentation industrielle. Pendant toute cette période, l'utilisation d'enzymes se pratique surtout dans l'industrie alimentaire. Les premiers procédés entièrement biocatalytiques y voient le jour vers le milieu des années 60, avec en particulier la production de sirop de fructose à partir d'amidon catalysée par des enzymes immobilisés sur un support insoluble. L'introduction du procédé d'immobilisation des enzymes marque un progrès considérable.

Vers la fin des années 70, le développement de la technologie de l'ADN recombinant marque un tournant fondamental dans la maîtrise du vivant. Assez rapidement, le génie génétique* s'impose comme une possibilité nouvelle en matière de synthèse chimique et biologique de deux manières :

- la programmation, encore balbutiante d'un micro-organisme à des fins de production ;
- l'identification par clonage* des gènes codant les activités biocatalytiques, et donc la possibilité d'une production massive d'enzymes.

Cette époque marque un tournant décisif avec la naissance d'une véritable biotechnologie industrielle accompagnée de la création de nouvelles entreprises. Mais les succès restent modestes en comparaison des attentes de certains, sans doute en raison des doutes sur les potentialités de la biocatalyse qui subsistent encore chez beaucoup.

Le statut actuel de la biocatalyse industrielle

Ses avantages

Les avantages de la biocatalyse et des bioconversions sont à présent de plus en plus recherchés dans un contexte

de chimie verte et les progrès technologiques associés à l'utilisation d'enzymes à des fins industrielles ont été très significatifs [2-7] :

- Les enzymes offrent une combinaison unique et exceptionnelle de sélectivités : chimio-, régio- et stéréosélectivité, stéréospécificité. Ces qualités limitent considérablement l'obtention de produits secondaires non désirés. L'aspect asymétrique des transformations catalysées (stéréosélectivité et stéréospécificité) prend en outre une importance de plus en plus considérable, notamment dans la production de briques élémentaires chirales pour les chimies fine et pharmaceutique [8].
- Ce sont des catalyseurs très efficaces, qui accélèrent les vitesses de réaction par des facteurs de 10^8 à 10^{10} , voire beaucoup plus. Ceci permet de les utiliser à des ratios molaires de 10^{-3} à 10^{-4} .
- Ils agissent en général dans des milieux aqueux, évitant, sauf situations particulières, l'utilisation de solvants.
- Comme ils sont aussi aisément et complètement biodégradables, ce sont des agents sans impact significatif sur l'environnement.
- Ils agissent dans des conditions douces de pH, de température et de pression. En plus de leur intérêt environnemental, ces conditions minimisent aussi les réactions secondaires indésirables.
- Comme des enzymes différents fonctionnent en général dans des conditions assez similaires, il est souvent possible de catalyser plusieurs réactions en cascade dans le même réacteur. Ceci a pour conséquence de déplacer l'équilibre vers le produit désiré et de simplifier le procédé réactionnel, en évitant éventuellement les précautions que pourrait nécessiter un intermédiaire instable.

Les inconvénients vrais ou supposés

La biocatalyse a longtemps souffert et souffre encore d'une réputation négative qui a beaucoup freiné les investissements et donc un développement du domaine. Les critiques suivantes, fondées ou infondées, ont souvent été entendues :

- La spécificité de la biocatalyse limite le choix des substrats possibles pour un enzyme donné. Mais les exemples de plus en plus nombreux indiquent au contraire que cette spécificité est souvent plutôt lâche et illustrent la relative généralité du phénomène connu sous le nom de promiscuité de substrat (voir ci-après).
- Le nombre d'enzymes dont on peut disposer en quantité industrielle est limité ; il est indéniable que ce problème a beaucoup handicapé le développement de la biocatalyse dans le passé. Le clonage de gènes codant des activités enzymatiques, qui s'est intensifié dans les années 80 et 90, a en grande partie réglé cette question. Sur plus de 4 000 activités de biocatalyse répertoriées, les gènes d'environ 3 000 d'entre elles ont été clonés et identifiés et peuvent servir de matériel de départ pour leur production. La production d'enzymes clonés a aussi fait chuter leur coût et considérablement augmenté leur pureté, supprimant le problème des activités contaminantes.
- La panoplie des réactions enzymatiques disponibles pour une utilisation en chimie de synthèse est actuellement encore restreinte. Les hydrolases (catalysant les réactions d'hydrolyse et d'estérification) sont toujours les enzymes les plus utilisés mais la part des enzymes présentant d'autres activités est de plus en plus importante. De plus, les développements actuels de la biologie moléculaire en termes d'évolution des

enzymes (voir les deux points précédents) ainsi que l'exploration systématique de la promiscuité des enzymes vis-à-vis de substrats vont permettre l'accès à des enzymes catalysant une plus grande variété de transformations.

- La stabilité et la longévité des enzymes sont limitées ; cette critique demeure d'actualité en dépit d'un certain nombre d'améliorations comme l'immobilisation sur support insoluble et l'amélioration de la stabilité par génie génétique (voir ci-après).
- La productivité volumétrique des réactions enzymatiques est faible ; pourtant les enzymes sont à l'évidence des catalyseurs rapides. Ce problème est souvent lié à la faible solubilité dans l'eau de certains substrats.
- Les enzymes sont parfois dépendants de cofacteurs* chers, souvent labiles et difficiles à manipuler. Alors qu'on observe souvent une grande flexibilité vis-à-vis du substrat, la dépendance vis-à-vis du cofacteur naturel reste très contrainte et ce problème peut être une source de complications opérationnelles. Cependant, le recours à un couplage enzymatique avec un enzyme permettant de régénérer le cofacteur ou idéalement la bioconversion *in vivo* permettent souvent de surmonter ce problème.
- L'étroitesse des conditions réactionnelles est occasionnellement un facteur limitant de rendement.
- L'activité des enzymes, optimale en milieu aqueux peut aussi bien se révéler avantageuse que désavantageuse, notamment en cas de faible solubilité dans l'eau du substrat. On peut tenter de se tourner vers l'utilisation de solvants organiques, il est vrai souvent au détriment de l'activité catalytique (sauf les lipases) et de l'intérêt environnemental.
- Les enzymes sont assez sensibles à des effets inhibiteurs par le substrat ou le produit. Dans ce dernier cas, on peut introduire de la dynamique dans le processus en couplant à la réaction une seconde réaction qui permettra un déplacement d'équilibre favorable. Ce problème peut être également contourné en réalisant les réactions en milieux biphasiques aqueux/organiques ou totalement aqueux mais compartimentés par une membrane poreuse [9]. Ces deux derniers procédés ont l'avantage de permettre une extraction en flux continu des produits, inhibiteurs ou non.
- Le temps de développement d'un procédé biocatalytique ou de son amélioration est encore trop long.

En dépit de ces inconvénients qui subsistent encore, les nombreuses améliorations apportées aux enzymes, à la diversité des réactions biocatalysées ainsi qu'à la maîtrise des procédés biocatalytiques permettent non seulement une accumulation progressive des réalisations, mais aussi une évolution culturelle.

Les procédés actuels

Comme nous l'avons vu, les premiers procédés biocatalytiques pour la chimie de synthèse font appel à des bioconversions de type « fermentation » par des micro-organismes. La possibilité ensuite d'obtenir des enzymes purifiés et de les utiliser dans une grande diversité de conditions réactionnelles a progressivement intensifié le recours à des processus en réacteurs ou à des solutions mixtes alternant les étapes chimiques *in vitro* et l'utilisation de cellules entières, comme décrit ci-avant pour l'éphédrine.

Fermentation

Les procédés de fermentation se pratiquaient à l'origine avec des souches isolées à partir de prélèvements de sources diverses (aliments contaminés, moisissures de

l'environnement, flores microbiennes de milieux naturels, etc.). Avec la compétition industrielle sur les antibiotiques, le besoin d'augmenter les rendements des procédés se fait plus pressant. On tente alors principalement d'améliorer les souches par mutation et sélection. Aujourd'hui, on utilise surtout des souches sélectionnées de micro-organismes produisant des substances naturelles (aminoacides, antibiotiques, vitamines, acides organiques) ou quelques composés pour lesquels elles ont été génétiquement reprogrammées, notamment des médicaments (alcaloïdes, stéroïdes). Mais même dans le cas de substances naturelles, on a souvent procédé à une re-ingénierie de leurs voies métaboliques ou de leurs régulations pour augmenter les rendements.

Procédés en réacteurs

La biocatalyse prend petit à petit sa place dans la chimie de synthèse pour la production industrielle. Les enzymes sont utilisés sous diverses formes, notamment sous forme de cellules entières (formes libres ou « planctoniques », fixés sur un support poreux ou en biofilms), d'extraits protéiques bruts après lyse des cellules, sous forme purifiés en solution, immobilisés ou encapsulés. L'utilisation d'enzymes immobilisés a eu une importance capitale dans le développement de processus biocatalytiques et suscite de nombreux efforts de développement pour optimiser de nouveaux supports (matrices organiques ou inorganiques) ou améliorer la fixation des enzymes. L'immobilisation des enzymes présente en effet toute une série d'avantages, tels que : la facilité de retrait du catalyseur en cours de procédé, la possibilité de régénérer aisément le biocatalyseur, la stabilité accrue des enzymes, l'amélioration/modulation des paramètres cinétiques, l'adaptation aux procédés en continu, et la compatibilité avec les solvants organiques.

Cependant, les réactions faisant appel à des biocatalyseurs immobilisés nécessitent d'opérer dans des réacteurs dans des conditions et configurations particulières dépendant de la nature du biocatalyseur, de la chimie sous-jacente et de contraintes économiques.

Bioconversion

Dans cette pratique, il s'agit de réaliser une ou plusieurs étapes de la voie de biosynthèse dans des cellules entières capables d'effectuer la bioconversion et d'obtenir un produit naturel ou non. Ce procédé est aussi connu sous le nom d'enzymation. Son choix repose sur un ensemble de facteurs tels que le type de réaction, la nécessité de recycler des cofacteurs et l'échelle à laquelle on veut effectuer la réaction, la stabilité de l'enzyme en dehors de son environnement cytoplasmique normal.

Dans l'utilisation de cellules entières, il faut aussi tenir compte d'autres facteurs pouvant affecter le rendement, en particulier la possibilité d'interférences entre le substrat et le produit de la réaction avec le métabolisme de la souche cellulaire. Ces difficultés sont de même nature que celles observées dans les souches de fermentation et nécessitent la mise en œuvre du même type de réponses d'ingénierie métabolique (voir ci-après).

La plupart des applications portent sur des molécules de la chimie fine et de la pharmacie. Il existe cependant aussi des utilisations d'enzymes pour des produits de bases et du vrac. Le *tableau I* présente les réactions les plus fréquemment utilisées à ce jour et le *tableau II* indique les produits représentant les plus forts tonnages, tous procédés confondus.

Réaction	Enzyme	
Addition	Aldolase ^a	$R-CHO + R'-CHO \longrightarrow R-CH(OH)-CH(OH)-R'$
	Hydroxynitrile lyase ^a	$R-CHO + HCN \longrightarrow R-CH(OH)-CN$
Amination réductrice	Aminotransférase ^a Transaminase ^a	$R-CHO + NH_3 \longrightarrow R-CH_2-NH_2$
Condensation acyloïne	Décarboxylase	$R-CO-CH_2-CO-R' \longrightarrow R-CO-CH(OH)-R'$
Hydrolyse	Acylase ^a Lipase ^a	$R-CO-OR' + H_2O \longrightarrow R-COOH + R'-OH$
	Amidase Lactamase	$R-CO-NH_2 + H_2O \longrightarrow R-COOH + NH_3$
	Carbamoylase	$R-CO-NH-CO-R' + H_2O \longrightarrow R-COOH + R'-NH_2$
	Époxyde hydrolase	$R-CH_2-CH_2-O \longrightarrow R-CH_2-CH_2-OH$
	Hydantoinase	$R-CH_2-CH_2-CO-NH-CO-NH_2 + H_2O \longrightarrow R-CH_2-CH_2-COOH + NH_3$
	Hydrolase	$R-CH_2-CH_2-S-CO-NH_2 + H_2O \longrightarrow R-CH_2-CH_2-S-COOH + NH_3$
	Lipase ^a Lactonase	$R-CO-OR' + H_2O \longrightarrow R-COOH + R'-OH$
	Nitrilase	$R-CN + 2H_2O \longrightarrow R-COOH + NH_3$
	Nitrile hydratase ^b	$R-CN + H_2O \longrightarrow R-COOH + NH_3$
	Phosphatase ^a Phosphotransférase	$R-OH + H_2O \longrightarrow R-OH + H_2O$
Isomérisation	Isomérase	$R-CHO \longrightarrow R-CH=O$
Oxydation	Bayer Villiger monooxygénase	$R-CHO \longrightarrow R-COOH$
	Cytochrome P450	$R-CH_2-CH_2- \longrightarrow R-CH_2-CH_2-OH$
	Aryl dioxygénase	$R-CH_2-CH_2- \longrightarrow R-CH_2-CH_2-OH$
Racémisation	Racémase	$R-CH_2-CH_2- \rightleftharpoons R-CH_2-CH_2-$
Réduction	Réductase ^a Déhydrogénase ^a	$R-CHO \longrightarrow R-CH_2-$

Tableau I - Les principaux enzymes utilisés en biocatalyse.

^aréaction réversible ; ^bla grande majorité des nitriles hydratases n'est pas stéréosélective.

Les tendances actuelles et futures en biotechnologie industrielle

Dépasser les limites de la biocatalyse courante

• Faire évoluer l'existant

Pour aborder les limitations des activités biocatalytiques, le domaine qui a connu les plus grands efforts de recherche est sans doute celui de l'ingénierie des protéines [10-13]. Plusieurs méthodes sont employées : l'évolution dirigée [14], le brassage de gènes (« gene shuffling ») [15] et la mutagenèse ciblée [16] (voir *encadré 1*). Toutes ces méthodes consistent à introduire des variations dont on suivra les effets sur les propriétés catalytiques de l'enzyme, qu'il s'agisse de son activité proprement dite, de sa sélectivité, de sa stabilité et de son activité dans des conditions particulières, de sa spécificité de substrat, etc. (voir *figure*).

Les modifications d'une protéine s'appuient aussi sur le concept de promiscuité et peuvent déboucher sur un élargissement de la spécificité à d'autres substrats (promiscuité de substrat) ou promouvoir une autre activité catalytique (promiscuité catalytique) [17-19]. En effet, le dogme « un gène

Quantité (tonnes)	Produit	Enzyme(s)
> 1 000 000	HFCS sirops de fructose concentrés	α -amylase glucose isomérase
> 10 000	6-aminopénicillinate	pénicilline acylase
	acrylamide	nitrile hydratase
> 1 000	aspartame	thermolysine
	L-aspartate	aspartase
	cyclodextrines	α -amylase cyclodextrine glycosyltransférase
	(S)-chloropropionate	(R)-2-haloacide déshydrogénase
	nicotinamide	nitrilase
	D-pantothénate	aldonolactonase
	7-aminocéphalo-sporanate	glutaryl amidase
	D-phénylglycine	hydantoinase

Tableau II - Les principales biotransformations industrielles.

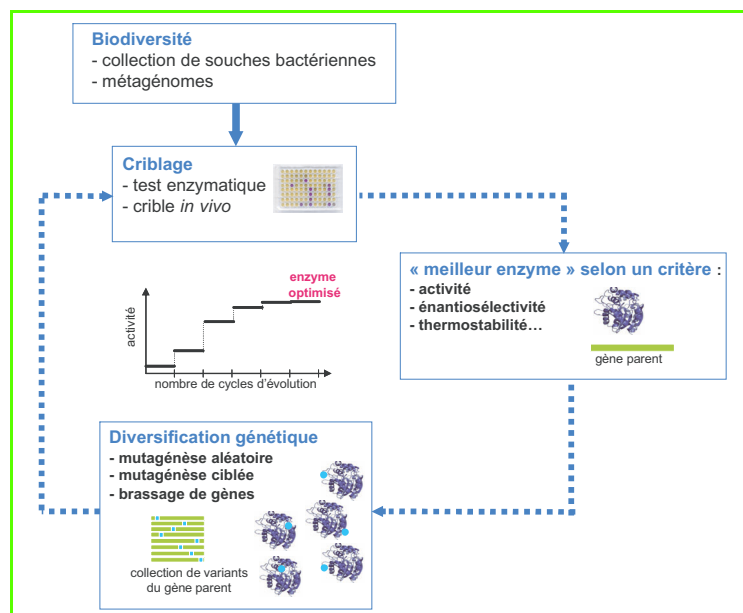
code pour une protéine qui accomplit une seule fonction » est de plus en plus bousculé et il n'est pas rare d'observer qu'un enzyme accepte un panel parfois large de molécules de structures parfois très différentes. Ce dogme a eu pour effet majeur de stopper toute investigation de nouveaux substrats une fois que l'enzyme avait été caractérisé. Il est donc nécessaire d'inclure dans l'exploration de la diversité enzymatique les enzymes dits déjà « connus ».

• Augmenter le choix des enzymes disponibles

À ce jour, on ne tire pas encore parti de toutes les capacités enzymatiques connues. On sait par exemple que parmi les plus de 4 000 activités biocatalytiques répertoriées, en grande majorité issues du métabolisme primaire, il en subsiste un bon millier dont le gène n'a pas encore été identifié. De plus, des études de métabolomiques par RMN ou LC/MS ont révélé des centaines de molécules dans les cellules que l'on ne sait pas relier à une réaction connue du métabolisme, illustrant ainsi le nombre de réactions à découvrir. De même, la grande variété structurale des substances naturelles laisse supposer que de nombreuses transformations chimiques, et donc

d'enzymes, sont encore à découvrir dans les voies de biosynthèse [20-21].

Par ailleurs, seule une toute petite partie de la biodiversité a servi comme source d'activités biocatalytiques. Les capacités de transformation chimique du vivant n'ont été explorées ni systématiquement, ni en profondeur. L'examen des données de séquence génomique indique la présence de très nombreux gènes codant pour des enzymes dont on ne connaît ni le substrat biologique, ni l'activité biocatalytique et



Accroissement de la biodiversité génétique par cycles successifs de mutagenèse.

Encadré 1

L'ingénierie protéique, introduction de diversité génétique par mutagenèse

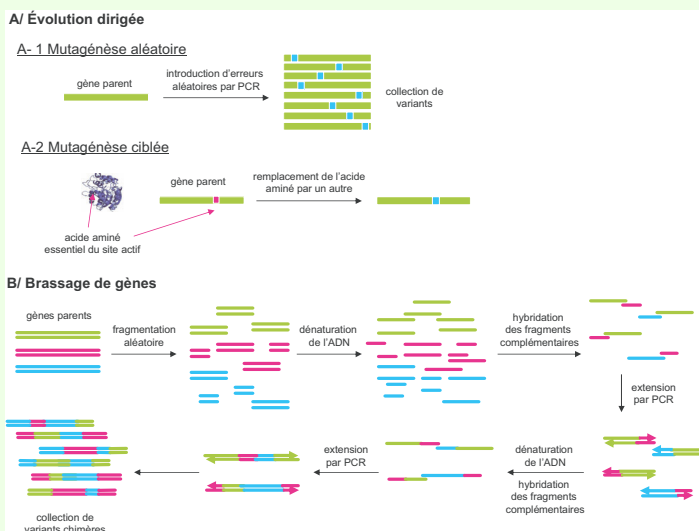
La mutagenèse est une approche génétique qui permet l'introduction de variation, dite mutation, dans la séquence d'un gène et d'obtenir ainsi des variants du gène « parent », aux propriétés que l'on espère différentes du parent. L'approche la plus classique est la mutagenèse aléatoire (figure A-1) grâce à l'utilisation d'une ADN polymérase qui lors de la PCR* va « recopier » l'ADN en faisant des erreurs (méthode dite « error prone PCR »). On se retrouve alors avec une collection de variants du gène parent. Cette méthode a l'avantage de ne pas avoir besoin de connaître la séquence du gène.

La deuxième méthode, la mutagenèse ciblée (figure A-2), est basée sur la connaissance de la séquence et parfois de la structure tridimensionnelle de la protéine. On cherche alors à remplacer un acide aminé important (site de fixation, ligand essentiel dans le site actif...) par d'autres acides aminés pour faire évoluer les propriétés de l'enzyme. En général, plusieurs cycles d'évolution sont réalisés en sélectionnant à chaque cycle le meilleur enzyme, jusqu'à aboutir à un enzyme optimisé.

Une autre approche plus récente est celle du « brassage » d'ADN ou « ADN shuffling ». Le principe de cette méthode est de recomposer un gène nouveau à partir de fragments de plusieurs gènes parents relativement proches en séquence mais qui ont des propriétés différentes, avec pour ambition que le gène chimère possède des propriétés hybrides ou différentes. On peut faire soit du brassage ciblé sur une région précise du gène, soit plus couramment du brassage

aléatoire à partir de plusieurs parents. On obtient alors une collection de variants chimères des gènes parents que l'on va cribler selon le paramètre à améliorer (figure B).

* La PCR, « polymérase chain reaction », permet d'amplifier *in vitro* une réaction spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier (www.snv.jussieu.fr).



donc pas non plus le produit. Ces séquences proviennent soit de génomes entiers, soit de métagénomes*. La recherche systématique de nouvelles activités enzymatiques – recherche qui se situe à l'interface de la chimie et de la biologie – ne retient cependant l'attention ni des biologistes ni des chimistes et progresse très lentement de ce fait.

Or une exploration plus intense de la biodiversité par des approches combinées de génomique et de bioinformatique doit mécaniquement aboutir à une augmentation considérable du nombre de gènes identifiés codant des enzymes à activité connue aussi bien qu'inconnue. Ces approches doivent évidemment ensuite se poursuivre par des tests biochimiques pour valider les prédictions. L'essai *in vitro* d'activités enzymatiques nécessite i) d'exprimer le gène en question (soit *in vivo* dans un organisme hôte, soit *in vitro*), ii) de disposer du substrat, et iii) de tester la protéine synthétisée dans un essai biochimique. Les bases de données de séquences commencent à être tellement fournies qu'il s'agit souvent de tester des centaines, voire parfois des milliers de gènes en parallèle. Des essais biochimiques systématiques à grande échelle comme les pratiquent les biologistes moléculaires commencent à apparaître [22-23].

Plusieurs objectifs sont poursuivis :

- L'amélioration des performances d'un biocatalyseur : il s'agit d'enzymes à activité et substrats connus, mais dont on recherche des qualités particulières comme une plus grande efficacité, une plus grande stabilité, la capacité de fonctionner dans des conditions spéciales (à des températures basses ou élevées, dans des solvants organiques, dans des conditions de pH extrêmes, etc.). Les micro-organismes se développant dans des conditions extrêmes de température, pH, salinité, etc. sont une source importante de tels enzymes. Dans certains cas favorables, des activités biocatalytiques peuvent conférer un phénotype ou un avantage sélectif qu'il est possible de cribler *in vivo* à grande échelle [24].
- L'élargissement sur une famille de substrats d'un enzyme connu : il s'agit d'enzymes à activité connue mais pour lesquels on souhaite élargir la gamme de substrats accessibles à la biocatalyse (promiscuité de substrat). Pour rechercher des activités de promiscuité, on pratique des essais avec des substrats partageant des éléments fonctionnels et structuraux avec le substrat connu.
- La recherche de nouvelles activités biocatalytiques : ce dernier objectif représente un défi considérable. La découverte de nouvelles triades enzyme/substrat/activité avance très lentement car elle requiert en premier lieu une multiplicité d'approches complémentaires (biologiques, bioinformatiques, biochimiques, structurales, chimiques, etc.) qui nécessitent de ce fait la collaboration étroite de chimistes et de biologistes encore trop rare.

• Améliorer les procédés réactionnels

Comme évoqué précédemment, l'immobilisation des enzymes est le fruit d'un intense effort de développement et des progrès dans les méthodes d'immobilisation devraient voir le jour. En particulier, le développement de supports améliorés issus des nanotechnologies semble prometteur. Le développement de nouveaux milieux réactionnels fait également l'objet de recherches pratiquement ininterrompues, notamment dans les solvants. On s'intéresse en effet depuis quelques années à l'utilisation de liquides ioniques et de fluides supercritiques, notamment le dioxyde de carbone supercritique. Ce dernier permet, entre autres, la solubilisation de substrats dans des conditions se prêtant à la catalyse

enzymatique et facilitant l'isolement de produits réactionnels à partir du milieu.

• Imiter le vivant

Enfin, on peut recourir au biomimétisme dans lequel on va tenter d'imiter la partie catalytique d'un enzyme issu de la sélection naturelle. Cela consiste en particulier à présenter dans une structure chimique complètement synthétique, les groupements fonctionnels du site catalytique responsables du processus catalytique [25]. Un exemple récent des potentialités de cette approche décrit la réalisation d'un catalyseur reproduisant l'activité d'une hydrogénase et susceptible de déboucher sur un mode de combustion de l'hydrogène sans recours au catalyseur au platine [26].

Dépasser les limitations des systèmes biologiques

• Ingénierie métabolique

L'efficacité des micro-organismes est de plus en plus souvent améliorée en procédant à une re-ingénierie de leur métabolisme par des méthodes de génie génétique. On tente dans ce cas, par un ensemble d'actions au niveau du génome (additions ou éliminations de gènes), d'ajuster le métabolisme du système hôte pour maximiser le résultat recherché, en général la production d'une molécule particulière [27]. Cette production consiste en un « profilage » rationnel des voies métaboliques de la cellule hôte. Cet ensemble de pratiques s'appuie sur les connaissances du métabolisme de l'hôte et des mécanismes de régulation, mais reste en grande partie empirique.

Cette reprogrammation métabolique s'avère souvent complexe. Le fait de modifier un organisme en introduisant de nouveaux gènes et/ou en inactivant des gènes résidant, peut avoir toutes sortes d'effets souvent à l'encontre du résultat recherché. Les activités enzymatiques introduites vont, elles aussi, avoir un effet qui peut être très sensible sur les équilibres et les flux métaboliques du système. Souvent la souche reprogrammée ne fonctionne pas comme espéré, elle se multiplie lentement et/ou ne produit la substance recherchée qu'en faible quantité. Il est même souvent difficile de comprendre la nature des difficultés. La voie introduite ou modifiée peut inclure la synthèse d'un métabolite inhibiteur, ou toxique ou réorienté par l'organisme vers d'autres utilisations. De multiples contrôles insoupçonnés au départ peuvent venir contrarier le but recherché. Même les systèmes les mieux étudiés restent en grande partie des boîtes noires qui, à l'évidence, ne sont pas issues de millions d'années d'évolution pour répondre aux souhaits de concepteurs humains.

Un exemple particulièrement représentatif de cette nouvelle tendance est celui du 1,3-propanediol produit par la bactérie *Escherichia coli*, à présent développé au stade industriel par Dupont. Dans ce procédé, l'essentiel du glucose utilisé par le colibacille est converti en propanediol en passant par la voie de la glycolyse jusqu'à l'obtention de dihydroxyacétone-phosphate [28].

• Biologie systémique

De grands espoirs ont été placés dans l'utilisation de la biologie systémique, qui tente de prédire un comportement ou une propriété biologique en prenant en compte la totalité des paramètres concernant le fonctionnement d'un système biologique. En s'appuyant sur les séquences de génomes complets et les inventaires qualitatifs et quantitatifs des

produits de transcription (transcriptome), des protéines (protéome) et des métabolites (métabolome), etc., on espérait pouvoir reconstituer l'ensemble du réseau métabolique d'un micro-organisme, sa régulation, modéliser son fonctionnement et de là, prédire des optimisations métaboliques à réaliser ou identifier les sources des problèmes rencontrés dans l'utilisation de souches industrielles. Il a fallu quelque peu déchanter. Les réseaux métaboliques reconstitués sont encore notoirement incomplets, parce que même des organismes modèles étudiés depuis de nombreuses décennies restent incomplètement connus. Par exemple, la fonction de 20 % des gènes d'*E. coli* ne nous est pas encore connue. En outre, de par la promiscuité des enzymes, de nombreux enzymes participent à la catalyse de plus d'une réaction du métabolisme. De même, de nombreux aspects de la régulation des systèmes cellulaires restent ignorés. De ce fait, les tentatives de modélisation restent généralement insuffisantes pour prédire l'effet de l'inactivation d'un gène et pour identifier des gènes critiques dans l'apparition d'un phénotype* particulier.

• Biologie synthétique

L'ambition de la biologie synthétique est de surmonter les difficultés inhérentes aux systèmes biologiques directement obtenus de la nature, trop complexes pour être maîtrisés, et de leur substituer des systèmes artificiellement modifiés ou reconstitués simplifiés à partir d'éléments naturels ou de synthèse, bref de construire et d'utiliser des systèmes qui n'auraient aucune chance d'apparaître du fait de la seule évolution naturelle (voir encadré 2). Dans le domaine des biotechnologies industrielles, les besoins ne manquent pas [29]. Parmi les approches les plus pratiquées ou envisagées, on peut mentionner l'ingénierie de voies métaboliques (voir précédemment), l'ingénierie des circuits de régulation de l'expression des gènes et l'introduction d'acides aminés non naturels (xéno-aminoacides) dans les protéines. D'autres directions devant aboutir à des modifications encore plus profondes, comme la réalisation de génomes à nombre de gènes réduits voire minimaux, de proto-cellules d'origine abiotique, constituent des objectifs ambitieux à plus long terme.

Le retentissant tour de force expérimental que vient de réaliser l'équipe de Craig Venter en substituant un génome complètement synthétique (copie très proche d'un génome naturel) au génome d'une cellule réceptrice préfigure une autre direction dans laquelle s'engage la biologie synthétique [30]. On peut envisager la réalisation de génomes totalement sur mesure qui laisse une grande marge de manœuvre à l'imagination de l'expérimentateur. Il reste cependant de nombreuses contraintes pour réaliser de tels génomes, qui sont loin d'être toutes connues.

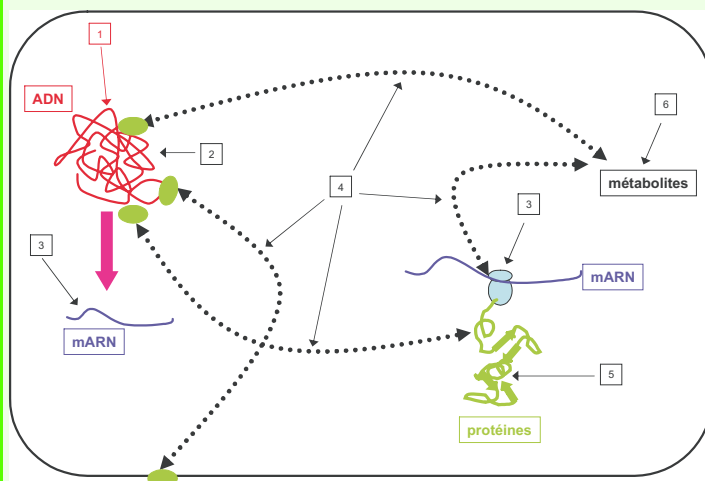
• Dérive génétique

Un système vivant n'est pas totalement stable. Le processus de réplication de l'information génétique introduit des mutations au fur et à mesure des générations. C'est le processus normal de l'évolution, où les organismes sont constamment soumis au crible de la sélection naturelle. Du fait de mutations, les constructions issues du génie génétique vont petit à petit échapper à la programmation imposée pour laquelle on ne peut pas pratiquer de sélection. Les organismes modifiés suivront alors une voie plus en adéquation avec leur logique profonde qui consiste à se reproduire au moindre coût métabolique et à faire face ou à échapper à toutes les contraintes extérieures ou intérieures venant perturber cette

Encadré 2

La biologie synthétique

La biologie synthétique essaie de constituer des systèmes biologiques cellulaires ou acellulaires, à des fins de recherche ou d'applications, qui n'ont pas encore été observés dans la nature et qui sont supposés ne pas pouvoir apparaître comme un simple résultat de l'évolution naturelle. Elle ne se distingue donc pas radicalement du génie génétique qui en constitue une pratique initiale et est, comme elle, une ingénierie de systèmes vivants. La biologie synthétique a cependant pour ambition de concevoir des systèmes dont les composants ont des propriétés exhaustivement définies.



1) synthèse d'ADN ; 2) acides xéno-nucléiques (système orthogonal) ; 3) modification du code, xéno-aminoacides (système orthogonal) ; 4) circuits de régulation ; 5) mutagenèse ciblée, évolution dirigée et ingénierie protéique ; 6) ingénierie métabolique.

[1] Toutes les actions de biologie synthétique envisagées au sein d'une cellule commencent par des modifications au niveau du génome où seront réalisées l'addition, les mutations ou l'inactivation de gènes ou de groupes de gènes. Ces modifications se font à partir de fragments d'ADN intégralement synthétisés ou provenant d'autres organismes, ou constitués de parties synthétiques et de parties d'origine naturelle. Un des objectifs principaux de ces modifications du génome tente de réaliser des génomes minimaux qui ne coderaient que pour les fonctions strictement nécessaires à l'application envisagée. Les effets de modifications [2 à 6] peuvent s'observer à différents niveaux dans la cellule.

[2] La biologie synthétique peut envisager de remplacer (en partie au moins) l'information génétique stockée sous forme d'ADN par un autre support. Cet aspect encore très peu développé permettrait de disposer d'organismes incapables d'échanger une telle information génétique avec les organismes naturels et donc de constituer un confinement biologique.

[3] Ingénierie du code : des modifications du code génétique ont été essayées. Il s'agit dans ce cas de réserver l'usage d'un ou plusieurs codons à de nouveaux acides aminés non naturels de manière à augmenter la diversité des fonctions chimiques présentes dans les protéines. Ces modifications doivent cependant demeurer compatibles avec une utilisation du code génétique naturel pour le reste des protéines de la cellule.

[4] Ingénierie de l'expression des gènes : introduction de nouveaux réseaux de régulation et modifications de réseaux existants, de manière à optimiser l'expression des gènes impliqués dans la tâche imposée par l'expérimentateur.

[5] Ingénierie des protéines (voir encadré 1).

[6] Ingénierie métabolique : introduction de nouvelles étapes et de nouvelles voies métaboliques ; modification ou suppression d'étapes ou de voies existantes.

logique. On observe donc une instabilité des systèmes biologiques utilisés en biotechnologie industrielle. À ce jour, il n'existe pas de véritable solution à cette question. Certains envisagent de modifier les enzymes de la machinerie

répliquative de manière à diminuer la fréquence des erreurs en vue de quasiment figer le génome sur le long terme.

Conclusion

La biocatalyse, la bioconversion ou plus généralement l'utilisation du vivant à des fins de production de composés chimiques sont des procédés qui ont leur avenir devant eux, malgré des débuts laborieux et chaotiques. Cet avenir dépend toutefois d'un certain nombre de progrès dans des domaines tels que : le répertoire des activités biocatalytiques, le recyclage des cofacteurs, les coûts de production des enzymes industriels, la stabilité, l'efficacité et la versatilité des biocatalyseurs, le génie des procédés enzymatiques, et l'ingénierie métabolique des systèmes biologiques.

Ces progrès techniques doivent également s'accompagner d'une évolution culturelle en ce sens pour intensifier l'effort de développement de cette approche alternative dans la chimie de synthèse. Les conditions théoriques et pratiques pour des avancées importantes dans ces domaines sont dès maintenant réunies. La biocatalyse devrait donc jouer un rôle déterminant dans la conversion de l'industrie chimique vers des pratiques tout à la fois réalistes et pleinement respectueuses de notre environnement.

Références

- [1] Anastas P.T., Warner J.C., *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, **2000**.
- [2] Kent and Riegel's Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology, J.A. Kent (ed), 11th ed., Springer Science, **2007**, et Business Media, LLC.
- [3] Ogawa J., Shimizu S., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2002**, 13, p. 367.
- [4] Breuer M., Ditrach K., Habicher T., Hauer B., Kebeler M., Stürmer R., Zelinski T., *Angew. Chem. Int. Ed. En.*, **2004**, 43, p. 788 et réf. citées.
- [5] Wohlgemuth R., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2007**, 82, p. 1055.
- [6] Patel R.N., *Coord. Chem. Rev.*, **2008**, 252, p. 659 et réf. citées.
- [7] Tao J., Xu J.-H., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2009**, 13, p. 143.
- [8] *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales (eds), Wiley-VCH, **2008**.
- [9] Monti D., Ferrandi E.E., Zanellato I., Hua L., Polentini F., Carrea G., Riva S., *Adv. Synth. Catal.*, **2009**, 351, p. 1303.
- [10] Bernhardt P., O'Connor S., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2009**, 13, p. 35.
- [11] Leonard E., Rungtaphan W., O'Connor S., Jones Prather K., *Nature Chem. Biol.*, **2009**, 5, p. 292.
- [12] Kennedy J., *Nat. Prod. Rep.*, **2008**, 25, p. 25.
- [13] Kirsching A., Taft F., Knobloch T., *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, p. 3245.
- [14] Dougherty M.J., Arnold F.H., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2009**, 20, p. 486.
- [15] Stemmer W.P., *Nature*, **1994**, 370, p. 369.
- [16] Hutschison C.A., Philipps S., Edgell M.H., Gillham S., Jahnke P., Smith M.J., *Biol. Chem.*, **1978**, 253, p. 6551.
- [17] Nobeli I., Favia A.D., Thornton J.M., *Nature Biotechnol.*, **2009**, 27, p. 157.
- [18] Khersonsky O., Tawfik D.S., *Annu. Rev. Biochem.*, **2010**, 79, p. 471.
- [19] Babbie A., Tokuriki N., Hoffelder F., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, 14, p. 1.
- [20] Zerikly M., Challis G.L., *ChemBioChem*, **2009**, 10, p. 625.
- [21] Walsh C.T., Fischbach M.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, p. 2469.
- [22] Kuznetsova E., Proudfoot M., Sanders S.A., Reinking J., Savchenko A., Arrowsmith C.H., Edwards A.M., Yakunin A.F., *FEMS Microbiology Reviews*, **2005**, 29, p. 263.
- [23] Agresti J.J., Antipov E., Abate A.R., Ahn K., Rowat A.C., Baret J.-C., Marquez M., Klibanov A.M., Griffiths A.D., Weitz D.A., *Proc. Natl Acad. Sci USA*, **2010**, 107, p. 4004.
- [24] Raymond J.-L., *Enzyme Assays*, Wiley-VCH, **2005**.
- [25] Levine L.A., Williams M.E., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2009**, 13, p. 669.
- [26] Le Goff A., Artero V., Jousset B., Dinh Tran P., Guillet N., Métayé R., Fihri A., Palacin S., Fontecave M., *Science*, **2009**, 326, p. 1384.
- [27] Ménard Szczepara F., Chandelier C., Villeret C., Masarel A., Bourrot S., Dupont C., Blanchard S., Groisillier A., Testet E., Costaglioli P., Cauet G., Degryse E., Balbuena D., Winter J., Achstetter T., Spagnoli R., Pompon D., Dumas B., *Nature Biotechnol.*, **2003**, 21, p. 143.
- [28] Nakamura C.E., Whitedy G.M., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2003**, 14, p. 454.
- [29] Keasling J.D., *ACS Chem. Biol.*, **2008**, 3, p. 64.
- [30] Gibson D.G., Glass J.I., Lartigue C., Noskov V.N., Chuang R.-Y., Algire M.A., Benders G.A., Montague M.G., Ma L., Moodie M.M., Merryman C., Vashee S., Krishnakumar R., Assad-Garcia N., Andrews-Pfannkoch C., Denisova E.A., Young L., Qi Z.-Q., Segall-Shapiro T.S., Calvey C.H., Parmar P.P., Hutchison III C.A., Smith H.O., Venter J.C., *Science*, **2010**, 329, p. 52.



A. Zaparucha



V. de Berardinis



J. Weissenbach

Professeur à l'Université d'Évry Val d'Essonne, **Anne Zaparucha** est responsable du Laboratoire de Chimie Organique et Biocatalyse (UMR 8030) au Genoscope* (CEA).

Véronique de Berardinis est chercheur au CEA, responsable du Laboratoire de Criblage des Activités de Biocatalyse au Genoscope*.

Directeur de recherche au CNRS, **Jean Weissenbach** dirige le Genoscope* – Centre national de séquençage au sein de la direction des Sciences du Vivant du CEA. Il a joué un rôle pionnier dans l'exploration et l'analyse de génomes, notamment du génome humain. Ses recherches actuelles portent sur la génomique des micro-organismes de l'environnement ; il est particulièrement intéressé par l'exploration de la diversité biocatalytique des systèmes vivants. Membre de l'Académie des sciences, Médaille d'or du CNRS, il a reçu de nombreux prix et distinctions en France et à l'étranger.

Photo Jean Weissenbach : © CNRS Photothèque/Christophe Lebedinsky.

* CEA UMR 8030, IG Genoscope, 2 rue Gaston Crémieux, CP 5706, F-91057 Évry Cedex.
Courriels : azaparuc@genoscope.cns.fr,
vberard@genoscope.cns.fr, jsbach@genoscope.cns.fr



Connaissez-vous bien le site de l'AC ?

www.lactualitechimique.org

Alors vite, à votre souris !

