

Les biotechnologies blanches : révolution... ou évolution ?

Pierre Monsan

Résumé La double conjonction des contraintes environnementales et de l'épuisement annoncé des sources de carbone fossile, d'une part, et de l'accroissement des connaissances scientifiques concernant le fonctionnement du vivant et des outils méthodologiques disponibles, d'autre part, permet la construction de véritables « usines cellulaires » pour la transformation de ressources carbonées renouvelables en produits d'intérêt pour les secteurs de la chimie, des matériaux et de l'énergie. Ces biotechnologies industrielles, ou « biotechnologies blanches », connaissent à l'heure actuelle un développement très important. Elles permettent de revisiter de nombreux procédés industriels et d'en créer de nouveaux, dans la continuité des acquis du génie biochimique au cours des cinquante dernières années.

Mots-clés **Biotechnologies, biologie de synthèse, carbone renouvelable, chimie verte.**

Abstract **White biotechnology: revolution... or evolution?**

The joint effect of environmental constraints and of the announced depletion of fossil resources on one side, and the improved scientific understanding of living systems functioning and available methodological tools on the other side, has resulted on the ability to design "cell factories" which can efficiently transform renewable carbon sources into products of interest for the fields of chemistry, materials and energy. Industrial biotechnology, also named "white biotechnology", is a fast-growing domain. It allows to develop more eco-friendly both existing and innovative industrial processes, in the direct streamline of the biochemical engineering processes implemented during the past fifty years.

Keywords **Biotechnology, synthetic biology, renewable carbon, green chemistry.**



© LISBP/Christelle Labruyère.

années 2000, afin d'attirer les investisseurs financiers vers ce domaine, en les distinguant, de manière un peu simpliste, des applications dans le secteur de la santé (biotechnologies « rouges ») et dans le secteur végétal (biotechnologies « vertes »). Effectivement, les investissements, notamment en capital-risque, étaient jusque-là focalisés sur la production de biomédicaments, du fait des retours financiers conséquents envisageables dans le domaine pharmaceutique. Les produits correspondants (insuline, érythropoïétine, anticorps thérapeutiques...) ne posent aucun problème d'acceptation par le public, contrairement à ceux obtenus par transgénèse végétale (« OGM »), du moins en Europe et en France en particulier. D'où l'intérêt de développer des applications de micro-organismes

Le contexte

Les applications industrielles des biocatalyseurs enzymatiques et microbiens se sont largement développées après la Seconde Guerre mondiale pour la production d'antibiotiques, d'acides organiques, d'acides aminés, d'édulcorants et d'intermédiaires pour la chimie (tableau I p. 18). Ces biotechnologies industrielles ont été rebaptisées « blanches » au milieu des

génétiqument modifiés par ingénierie métabolique, **utilisés en milieu confiné**, donc sans relargage volontaire dans l'environnement, pour produire des composés d'intérêt industriel. Dans un contexte double de pénurie annoncée de carbone fossile (« peak oil » : quand ?) et de prise de conscience de plus en plus marquée des problèmes environnementaux (production de gaz à effet de serre et réchauffement climatique), il devenait important de promouvoir le

Tableau I - Les principaux produits de biotechnologies industrielles.

Source : W. Soetaert, Université de Gand.

Produit	Quantité (Mt/an)
Bioéthanol	90
Isoglucose	15
Glutamate	2
Acide citrique	1
Acide lactique	0,3
Acrylamide	0,2
Antibiotiques	0,03

développement des applications industrielles des biotechnologies en attirant les investisseurs. Les biotechnologies blanches reposent en effet sur l'utilisation prioritaire de carbone renouvelable et non pas de carbone fossile. Elles permettent de développer des procédés de transformation biologique plus compatibles avec les économies d'énergie et la préservation de l'environnement, en réduisant significativement l'empreinte carbone, constituant ainsi la base d'une nouvelle bioéconomie [1].

L'objectif est donc de développer de véritables « usines cellulaires » capables de transformer des matières premières renouvelables, aussi peu en compétition que possible avec des usages alimentaires, en produits d'intérêt pour les domaines de la chimie (intermédiaires de synthèse), des matériaux (biopolymères) et de l'énergie (biocarburants). En effet, les matières premières renouvelables les plus facilement accessibles aujourd'hui, de manière économiquement fiable et viable, sont des glucides (amidon, glucose, saccharose), et des lipides (huiles végétales : colza, palme...) et leurs dérivés (glycérine, glycérol). Leur utilisation massive pour la production de biocarburants de première génération est cependant accusée d'en faire flamber les cours et d'être à l'origine de déforestations massives. Le développement à très grande échelle des biotechnologies industrielles passe donc obligatoirement par une valorisation des biomasses lignocellulosiques ne présentant pas d'usage alimentaire (produits de deuxième génération) : coproduits de l'agriculture (raffes de maïs, bagasse de canne à sucre, pulpes de betterave, son et paille de blé...) et de l'industrie agroalimentaire (drèches de brasserie...), forêts et coproduits de l'industrie du bois, cultures dédiées (miscanthus, jujoba...)

produites sur des terres impropres à un usage agricole. À terme, les cultures de microalgues en conditions auxotrophes (utilisation de l'énergie lumineuse et du dioxyde de carbone) devraient prendre le relais pour une troisième génération de produits biosourcés.

L'usine cellulaire

Le concept d'usine cellulaire n'est pas nouveau. Depuis le fond des temps, les micro-organismes et leurs catalyseurs enzymatiques ont été utilisés, de manière totalement empirique, pour transformer les matières premières d'origines végétale et animale en boissons et aliments plus facilement conservables et présentant des propriétés organoleptiques intéressantes. C'est ainsi que virent le jour la production de bière, de vin, de fromage, de pain... L'isolement et la caractérisation de plus en plus fine des souches microbiennes et des enzymes impliquées dans ces transformations ont conduit, comme indiqué en introduction (*tableau I*), à partir du milieu du XX^e siècle, au développement d'une véritable industrie de la fermentation et de la biocatalyse. La production annuelle de 90 millions de tonnes de bioéthanol et de 15 millions de tonnes d'isoglucose en est la meilleure illustration. Le concept d'usine cellulaire a été renouvelé dans les années 1980 par l'apport du génie génétique, qui a permis d'exprimer de nouveaux gènes dans des micro-organismes industriels et d'en contrôler l'expression. La production de L-thréonine par Ajinomoto à l'aide de souches recombinantes d'*Escherichia coli* depuis le début des années 90 en est un exemple. Actuellement, environ 95 % des enzymes industrielles (protéases, amylases, pectinases, phytases, cellulases...) sont produites à l'aide de micro-organismes génétiquement modifiés.

Qu'est-ce qui permet aujourd'hui de renouveler ce concept d'usine cellulaire et de lui donner une nouvelle vigueur ?

La possibilité de franchir une nouvelle étape dans le domaine du génie biochimique est liée au développement simultané des connaissances fondamentales sur le fonctionnement des systèmes biologiques et leurs mécanismes de régulation (« biologie des systèmes »), et à l'extraordinaire amélioration des méthodologies d'analyse et de synthèse (voir ci-dessous).

Lecture et écriture de l'ADN

L'efficacité des méthodes de lecture de l'ADN augmente à une vitesse supérieure à la loi de Moore pour l'informatique

Lois de Moore

Les lois de Moore sont des lois empiriques qui ont trait à l'évolution de la puissance des ordinateurs et de la complexité du matériel informatique. Il existe en fait trois « lois » de Moore, deux authentiques (au sens où elles furent émises par Gordon E. Moore), et une série de « lois » qui ont en commun de se prétendre « loi de Moore », mais qui n'en sont que des simplifications inexactes.

1. La loi de Moore a été exprimée en 1965 dans *Electronics Magazine* par Gordon E. Moore, ingénieur de Fairchild Semiconductor, l'un des trois fondateurs d'Intel. Constatant que la complexité des semi-conducteurs proposés en entrée de gamme doublait tous les ans à coût constant depuis 1959, date de leur invention, il postulait la poursuite de cette croissance (en 1965, le circuit le plus performant comportait 64 transistors). Cette augmentation exponentielle fut rapidement nommée *loi de Moore* ou, compte tenu de l'ajustement ultérieur, *première loi de Moore*.

2. En 1975, Moore réévalua sa prédiction en posant que le nombre de transistors des microprocesseurs (et non plus de simples circuits intégrés moins complexes car formés de composants *indépendants*) sur une puce de silicium double tous les deux ans. Bien qu'il ne s'agisse pas d'une loi physique mais juste d'une extrapolation empirique, cette prédiction s'est révélée étonnamment exacte. Entre 1971 et 2001, la densité des transistors a doublé chaque 1,96 année. En conséquence, les machines électroniques sont devenues de moins en moins coûteuses et de plus en plus puissantes.

3. Une version commune, variable et sans lien avec les énoncés réels de Moore, est : « quelque chose » double tous les dix-huit mois, cette chose étant « la puissance », « la capacité », « la vitesse », « la fréquence d'horloge » et bien d'autres variantes, mais très rarement la densité des transistors sur une puce. Ces pseudo lois de Moore sont celles le plus souvent diffusées, car elles fleurissent dans des publications grand public et sur de nombreux sites Internet. Leur seul point commun est donc ce nombre de dix-huit mois, qu'on ne trouve pourtant dans aucun des deux énoncés de Moore.

Glossaire

Les termes suivis d'un astérisque* dans l'article sont définis ci-dessous.

Cosmide : vecteur artificiel constitué d'un plasmide (molécule d'ADN surnuméraire distincte de l'ADN chromosomique, capable de réplication autonome et non essentielle à la survie de la cellule) auquel a été ajouté le site COS du bactériophage (virus n'infectant que des bactéries) lambda, nécessaire à l'encapsulation (empaquetage de matériel génétique à l'intérieur de la capsid virale). Il a été décrit pour la première fois par Collins et Hohn en 1978. Les séquences COS sont des séquences d'ADN simple brin, qui ont été séparées de la molécule mère par une enzyme de restriction spécifique de telle manière que les extrémités ont une affinité spécifique l'une et l'autre, et ainsi sont reconnues comme bouts cohésifs. L'intérêt des cosmides réside dans le fait qu'ils permettent le clonage de fragments d'ADN de grande taille ; ils peuvent accepter jusqu'à 45 kb (kilobase) contre 10 à 15 kb pour les plasmides normaux et sont souvent utilisés pour stocker l'ADN génomique. Une fois introduit dans la bactérie cible, ce type de vecteur se comporte comme un plasmide, c'est-à-dire qu'il ne l'infecte pas.

« **DNA shuffling** » : le « brassage » de gènes permet de générer une très grande diversité de gènes à partir d'une famille de gènes portant différentes mutations. Pour cela, les gènes sont découpés en fragments de 50 à 100 paires de bases de longueur, puis ces fragments sont mélangés par réaction d'amplification génique (PCR : « polymerase chain reaction »). Cette méthode permet de réaliser, en particulier lorsqu'elle est couplée à un criblage à haut débit, une « évolution dirigée » d'une protéine, c'est-à-dire de réaliser dans un temps limité ce que l'évolution a pu faire de manière aléatoire. Il s'agit, par exemple, d'obtenir une enzyme présentant une résistance accrue à la dénaturation thermique, ou une sensibilité différente à l'effet du pH sur son activité.

Fluxomique : mesure des vitesses réelles des réactions métaboliques dans le système biologique intègre (flux intracellulaires, intratisulaires). Il n'existe pas de méthode directe permettant de mesurer des flux dans une cellule ou un tissu intègre. L'approche indirecte la plus pertinente est basée sur des stratégies de marquage isotopique (^{13}C) couplées à l'analyse fine (mesure des « isotopomères ») de l'incorporation isotopique dans les métabolites, réalisée soit par spectrométrie de masse, soit par RMN. Elle aboutit à l'obtention de cartes de flux qui représentent la distribution quantitative des flux (ici carbonés) dans le réseau métabolique du système biologique étudié.

Fosmide : cosmide* contenant un réplicon (molécule d'ADN ou d'ARN pouvant se répliquer à partir d'une seule origine de réplication) d'*E. coli* (séquence FOS : facteur F).

Homéostasie : capacité d'un organisme vivant à maintenir à un niveau constant certaines caractéristiques internes de son corps (température, concentration des substances, composition des liquides interstitiel et intracellulaire, etc.).

Métagénomique fonctionnelle : méthode consistant à faire exprimer des fragments d'ADN métagénomique, c'est-à-dire issus de l'extraction de l'ADN total d'un échantillon provenant d'un environnement complexe (sol, intestin, océan, air...) par un vecteur hôte (généralement des banques de clones de l'espèce bactérienne *E. coli*). C'est à ce niveau que sont utilisés les cosmides* ou fosmides* comme vecteurs des fragments d'ADN. Le but de cette approche est de découvrir de nouvelles enzymes ou de nouvelles molécules sécrétées dans l'environnement d'où est issu l'échantillon. Lorsque la présence de la fonctionnalité est repérée dans un clone, on procède au séquençage du vecteur utilisé pour identifier le ou les gènes d'intérêt. Elle permet, en particulier, d'accéder à une fraction de la biodiversité microbienne nettement plus grande que les approches de microbiologie classique (culture directe de micro-organismes). Une illustration est la recherche d'enzymes permettant de dégrader la cellulose à partir d'un extrait d'ADN d'intestin de termites.

Modélisation moléculaire in silico : ensemble de méthodes à la frontière de la biologie structurale et de la bioinformatique, qui consiste à effectuer des calculs informatiques pour reconstruire les structures, effectuer des prédictions structurales ou analyser des propriétés dynamiques de macromolécules. Elle repose souvent sur l'utilisation d'une description des forces moléculaires qui agissent sur les atomes pour simuler des mouvements ou trouver des conformations d'énergie minimale. Les données sur les structures des macromolécules biologiques, obtenues essentiellement à partir de la diffraction des rayons X par leurs cristaux, sont aujourd'hui déposées sur une base de données publique, la « Protein Data Bank » (PDB). Cette base contient, sous un format standardisé, les données structurales sur les coordonnées des atomes de plus de 80 000 macromolécules ou complexes. Les données sont accessibles librement en ligne et les structures peuvent être visualisées au moyen de divers outils logiciels interactifs, dont un grand nombre sont gratuits pour un usage académique.

Opéron : unité d'ADN fonctionnelle regroupant des gènes sous le contrôle d'un signal moléculaire régulateur. Les gènes sont transcrits en ARN messager ensemble et concourent à la réalisation d'une même fonction physiologique. Ainsi, les gènes d'un opéron sont soit transcrits tous ensemble, soit aucun n'est transcrit puisqu'ils sont tous sous le contrôle du même régulateur.

(voir encadré p. 18) : le coût du séquençage d'un génome est passé en dix ans de 0,250 \$ à 0,317 x 10⁻⁵ \$ par paire de bases [2]. En conséquence, le séquençage d'un génome bactérien est devenu tout à fait accessible pour un laboratoire académique. C'est une source fabuleuse d'informations et permet de découvrir non seulement de nouveaux gènes, mais également des voies métaboliques devenues silencieuses. Il devient plus simple de re-séquencer un fragment d'ADN plutôt que de stocker les données correspondantes !

Parallèlement, le coût de la synthèse de séquences d'ADN s'est effondré. Il est passé en dix ans de 25 \$ à 0,35 \$ par base [2]. Là aussi, il est devenu plus simple de commander une séquence d'ADN synthétique (un gène contenant des mutations ponctuelles, par exemple), plutôt que de la produire par construction en utilisant les méthodes de biologie moléculaire. Au passage, on pourra toujours élaborer sur le fait que l'emploi d'un tel gène « synthétique » relève plus de la « biologie de synthèse » que celui d'un gène obtenu par biologie moléculaire seule. On peut rappeler que le couplage de telles méthodes de synthèse à des méthodes d'amplification et d'assemblage *in vivo* a permis à l'équipe de Craig Venter de construire le génome de *Mycobacterium*

mycoïdes, soit 1,08 millions de paires de bases, sans oublier d'y apposer sa signature (avec une erreur !), qui a été introduit dans une cellule de *M. capricolum* pour la transformer finalement en bactérie « synthétique » (on peut discuter le terme, puisque toute la machinerie moléculaire de la cellule préexistait) de *M. mycoïdes* [3].

Métagénomique fonctionnelle

L'extraction de l'ADN à partir de biotopes microbiens (sols, intestin humain, rumen...), suivie du clonage de grands fragments de 40 à 70 000 paires de bases dans des cosmides* ou des fosmides* et leur expression dans des hôtes tels que *E. coli*, a fortement renouvelé et élargi les possibilités d'accès à la biodiversité microbienne. En effet, les méthodes de microbiologie classique (culture de souches isolées) ne permettent d'isoler qu'une fraction limitée (0,1 % à quelques %) des espèces présentes. La caractérisation et la compréhension du fonctionnement du microbiote intestinal humain, dont le rôle dans l'homéostasie* est très important, en sont l'un des meilleurs exemples : le corps humain contient dix fois plus de cellules microbiennes (10¹⁴) que de cellules humaines (10¹³).

En particulier, la métagenomique fonctionnelle* a pour objet la recherche d'une fonctionnalité particulière, telle que la dégradation de la cellulose, par exemple, dans un biotope donné. Cette approche permet d'aller au-delà de la simple annotation putative de gènes, en étant certain que le fragment d'ADN isolé, cloné et exprimé contient effectivement un ou plusieurs gènes codant l'activité enzymatique recherchée [4]. Il est ainsi également possible, du fait de la taille élevée des fragments d'ADN clonés, d'isoler de nouvelles voies métaboliques impliquant plusieurs gènes présents au sein d'un opéron*.

Ingénierie enzymatique moléculaire

Jusqu'au début des années 1980, seules les enzymes provenant de sources « naturelles », animales, végétales ou microbiennes (dans ce dernier cas, améliorées éventuellement par mutagenèse des souches productrices), étaient disponibles. La conjonction des données structurales obtenues par diffraction des rayons X par les cristaux d'enzymes et des possibilités offertes par le génie génétique a conduit à l'amélioration des biocatalyseurs par mutagenèse dirigée, c'est-à-dire par le remplacement d'un acide aminé par un autre dans la séquence correspondante. Un exemple est l'amélioration de la résistance des enzymes utilisées dans les lessives (subtilisine) aux agents chimiques oxydants par la société Genencor dans les années 80. Dans les années 90, ont été mises au point des méthodes de mutagenèse aléatoire, par exemple par copie et amplification à erreur des gènes correspondants (« error prone polymerase chain reaction ») et de brassage des fragments de gènes modifiés (« DNA shuffling »*), couplées à des méthodes de clonage, d'expression et de criblage à haut débit des gènes ainsi mutés. Il est ainsi possible, en procédant à des cycles successifs de mutagenèse couplés à une sélection/criblage à haut débit sous pression déterminée (par exemple, la résistance à la dénaturation thermique) d'obtenir une « évolution dirigée » des propriétés d'un catalyseur enzymatique. Une telle approche mime, en fait, ce qu'a réalisé le processus d'évolution au cours des millénaires. Ceci a débouché sur la mise à disposition d'enzymes de plus en plus performantes. Aujourd'hui, la combinaison des méthodes de modélisation moléculaire *in silico** basées sur les données structurales, de dynamique moléculaire, de mutagenèse dirigée massive (remplacement d'un acide aminé par les 19 autres) et de criblage à haut débit, permet de créer de nouvelles activités enzymatiques non décrites dans la nature, telles que le greffage régiospécifique d'une unité α -D-glucopyranose sur le carbone C3 d'un méthyl-rhamnoside pour la synthèse chimio-enzymatique d'oligosaccharides antigéniques [5] (figure 1). L'équipe de David Baker (Université de Washington, Seattle) a réussi à créer *ex nihilo* des activités enzymatiques catalysant des réactions n'existant pas dans le métabolisme cellulaire (réactions d'élimination de Kemp, de

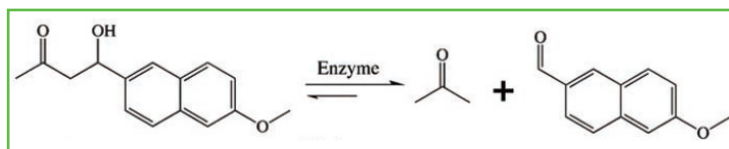


Figure 2 - Réaction de rétro-aldolisation [6].

rétro-aldolisation et de Diels-Alder), par modélisation moléculaire à partir de l'état de transition des réactions chimiques correspondantes [6] (figure 2).

Métabolomique et fluxomique*

La conjonction des améliorations de disponibilité et de performance des techniques analytiques permettant d'identifier et de quantifier les molécules présentes au temps t dans une cellule (chromatographie liquide, spectrométrie de masse, RMN...) a abouti à la possibilité de déterminer avec précision le profil métabolique d'une cellule cultivée dans des conditions données, ainsi que les différents flux correspondants. Cette approche est essentielle, en lien étroit avec la modélisation mathématique de ces flux (il n'existe pas de modèle mathématique particulier), notamment pour optimiser la construction d'une souche destinée à produire une molécule d'intérêt, en obtenant le taux de conversion du carbone le plus élevé possible. De plus, grâce à la précision des méthodes de spectrométrie de masse, il est possible d'évaluer une voie métabolique en utilisant des molécules marquées à l'aide d'isotopes froids (isotopes stables non radioactifs : ^{13}C , D, ^{15}N).

Biologie de synthèse

La biologie de synthèse est définie par l'OCDE comme « l'ingénierie de composants et de systèmes biologiques qui n'existent pas dans la nature et la ré-ingénierie d'éléments biologiques existants ; elle porte sur la conception intentionnelle de systèmes biologiques artificiels. » Elle est le résultat de avancées des connaissances en biologie des systèmes et des progrès en capacités de modélisation informatique et moyens de calcul, couplés aux possibilités de criblage à haut débit issues notamment des nanotechnologies et de la microfluidique. La frontière avec l'ingénierie métabolique n'est pas toujours évidente dans les exemples qui sont décrits. Le rapport du groupe de travail « Biologie de synthèse » du Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (MESR) distingue deux approches de ce nouveau domaine [7] :

- la construction de systèmes métaboliques minimaux, de dispositifs ou de systèmes artificiels biochimiques, ou biomécaniques ayant un comportement spécifié, par l'assemblage de « briques » réutilisables et standardisées ;
- la synthèse de génomes minimaux afin de mieux appréhender le fonctionnement des cellules, et afin de créer des cellules-hôtes (châssis) capables d'une bioproduction efficace ou de fonctions simples prédéterminées.

Il est évident qu'une réflexion éthique doit accompagner le développement de ces approches pouvant être perçues comme une « artificialisation » du vivant. C'est ce qui a conduit à la mise en place d'un « Observatoire de la biologie de synthèse » dans le cadre du Conservatoire national des arts et métiers (Cnam), sous l'égide du MESR, afin de rassembler et de mettre à la disposition des citoyens l'ensemble des informations disponibles sur ce domaine [8].

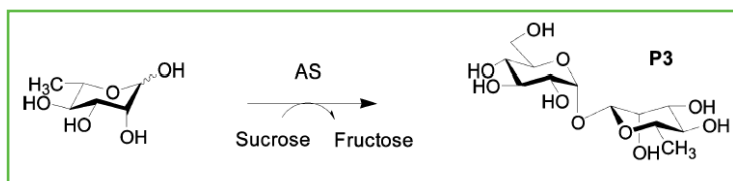


Figure 1 - Greffage régiospécifique d'un α -D-glucopyranose sur le C3 d'un méthyl-rhamnoside pour la synthèse d'oligosaccharides antigéniques [5].

Les applications industrielles

Les principaux procédés qui ont atteint ou sont en cours de passage à l'échelle industrielle sont décrits ci-après.

1,3-PDO à partir de glucose (DuPont Tate & Lyle BioProducts)

Les travaux d'ingénierie métabolique réalisés par Genencor entre 1995 et 2002 pour DuPont ont abouti à la construction d'une souche d'*E. coli* produisant le propane-1,3-diol (1,3-PDO) à partir de D-glucose. La voie métabolique implémentée implique une enzyme du type glycérol déshydratase utilisant la vitamine B12 comme cofacteur. Ces travaux ont mobilisé 200 ETP (éq. temps plein) pour un coût total de construction de la souche microbienne de 40 M\$. Une usine ayant une capacité de production de 50 kt/an fonctionne depuis novembre 2006 à Loudon (Tennessee). La concentration finale de PDO est de 135 g/L, avec un rendement de 51 g de PDO/g de glucose (pour un rendement théorique maximal de 54 g/g), avec une productivité de 3,5 g/L.h [9]. L'association de DuPont à Tate & Lyle permet de sécuriser l'apport de matière première, le glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon de maïs.

Ce bioprocédé permet d'économiser environ 40 % d'énergie par rapport au procédé de synthèse du 1,3-PDO par voie chimique.

Les applications du Bio-PDO[®] se situent notamment au niveau de la production de fibres textiles polyester (Sorona[®]), de résines polyester insaturées (Susterra[®]) et de formulations cosmétiques et détergentes, en remplacement du propylène et du butylène glycol (Zemea[®]).

1,3-PDO à partir de glycérol (Metabolic Explorer)

Ce procédé utilise le glycérol comme point de départ pour une biotransformation par une bactérie anaérobie, *Clostridium acetobutylicum*, impliquant une glycérol déshydratase non-vitamine B12 dépendante. La construction de la souche microbienne a mobilisé 32 ETP de 1997 à 2012. Une usine ayant une capacité de production de 8 kt/an est en cours de construction en Malaisie afin de disposer, comme matière première, de la glycérine (glycérol brut) provenant de la production de biodiesel à partir d'huile de palme. Le retard du démarrage de cette unité a obligé MetEx à supprimer 35 postes en décembre 2012, pour revenir à un effectif de 76 personnes.

PLA (Cargill)

Depuis 2002, NatureWorks LLC, filiale de Cargill, produit, à partir d'acide lactique provenant de la fermentation du D-glucose du PLA, un polylactide dans son usine de Blair (Nebraska) dont la capacité est de 140 kt/an. L'acide lactique est transformé par voie chimique en lactides, dont la polymérisation conduit au PLA (Ingeo[®]). Un point essentiel du procédé est la purification du mélange de lactides par distillation. En 2003, Cargill a construit la plus grande capacité mondiale de fermentation lactique au monde pour approvisionner la production de PLA. En octobre 2012, un co-investissement de 150 M\$ de PTT Global Chemical a été annoncé pour construire une deuxième unité de production en Thaïlande.

Les applications du PLA vont des fibres textiles aux emballages. On peut noter un avantage très significatif au

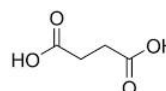
plan environnemental du PLA par rapport au PET (polyéthylène téréphthalate) (tableau II).

Tableau II - Comparaison des éco-profilés du PLA (Ingeo[®]) et du PET.
*1G : 1^{ère} génération ; 2G : 2^e génération.
Source : <http://natureworksllc.com>.

Produit	Émission CO ₂ équivalent (kg CO ₂ éq./kg polymère)	Consommation d'énergie non renouvelable (MJ/kg polymère)
PET	3,2	80,3
PLA 1G*	2,0	50,2
PLA 2G*	1,3	42,2

Acide succinique

L'acide succinique est un acide dicarboxylique tétracarboné :



Il est utilisé directement comme agent aromatisant ou comme intermédiaire dans la synthèse de nombreux produits chimiques, notamment de fibres polyesters.

Deux projets de production d'acide succinique biosourcé sont en cours de passage à l'échelle industrielle :

• BioAmber

À l'origine partenariat entre DNP Green Technology et ARD, BioAmber a développé la production d'acide succinique par biotransformation du D-glucose par voie bactérienne initialement, puis par levure (collaboration avec Cargill). En effet, la levure ayant un pH optimal plus bas, il est possible d'obtenir directement la forme acide et non pas le sel, ce qui est le cas à pH neutre. DNP Green Technology a obtenu un financement de 12 M\$ en 2009 et est devenue BioAmber Inc. en 2010. Une usine est en cours de construction à Sarnia (Ontario), en collaboration avec Mitsui pour la production de 17 kt/an d'acide succinique biosourcé à partir de 2013. Elle devrait produire à terme 34 kt/an d'acide succinique et 23 kt/an de butane-1,4-diol (BDO), obtenu par hydrogénation de l'acide succinique (technologie DuPont). Deux autres usines sont envisagées, l'une en Thaïlande et l'autre au Brésil, ayant chacune une capacité de production de 65 kt/an d'acide succinique et de 50 kt/an de butanediol.

• Roquette/DSM (Reverdia)

Depuis 2008, Roquette Frères a développé avec DSM une voie de production d'acide succinique à l'aide de levure (Biosuccinium[®]) opérant à bas pH. Cette association 50/50 a donné naissance à la société Reverdia. Une unité de production de 10 kt/an de capacité a été implémentée sur le site de Roquette à Cassano Spinola (Italie). Elle a démarré sa production fin 2012.

Farnésane (Amyris)

La société Amyris Biotechnologies a été fondée en 2003 par Jay D. Keasling (Université de Berkeley) et quatre de ses étudiants postdoctoraux. Son premier projet a été la production de l'acide artémisinique, précurseur de l'artémisinine, un

antipaludéen produit par l'armoise, grâce à un financement de la fondation Bill et Melinda Gates à hauteur de 2,4 M\$. Pour cela, il a fallu réussir à cloner la voie du mévalonate (figure 3), aboutissant à l'isopentényl-pyrophosphate, chez *E. coli*, puis chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ce produit a été licencié à Sanofi, qui en développe la production industrielle en Italie. Forte de ce succès, Amyris a recruté comme PDG John Melo, ancien PDG de BP USA, et a installé une division au Brésil pour produire un « drop-in » biodiesel, le farnésane, c'est-à-dire un produit directement substituable au diesel. Le remplacement des trois dernières étapes de la synthèse de l'acide artémisinique par une seule étape catalysée par une farnésène synthase (figure 3) conduit en effet au trimère insaturé de l'isoprène, le farnésène (Biofene®). Sa réduction par hydrogénation mène directement au farnésane. L'objectif était la construction de deux usines ayant chacune une capacité de production de 150 ML/an de farnésène, avec un point d'étape correspondant à la production de 40 à 50 Mt en 2012. Ce résultat n'ayant pas été atteint, la sanction du marché a été une perte de 90 % de la valeur de l'action en mai 2012. Total, qui détient 21 % du capital d'Amyris, va débloquer 82 M\$ sur trois ans pour poursuivre le projet.

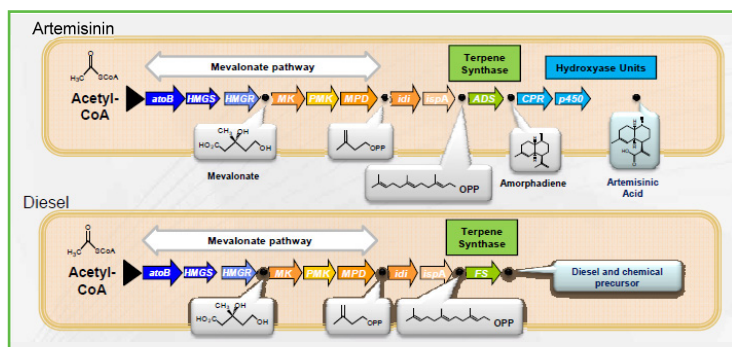
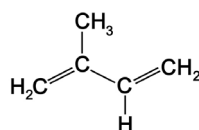


Figure 3 - Voies de synthèse de l'acide artémisinique et du farnésène.
Source : www.amyris.com.

Ceci montre à la fois la possibilité de mettre en œuvre des approches d'ingénierie métabolique semblables pour les domaines des biotechnologies rouges (santé) et des biotechnologies blanches, et la marge de manœuvre nettement plus étroite lorsque l'on vise des produits de commodité pour lesquels le rendement, le titre final et la productivité sont essentiels.

Isoprène (GoodYear/Genencor)

La firme de pneumatiques GoodYear a lancé en 2007 un partenariat avec Genencor pour produire de l'isoprène à partir de D-glucose à l'aide de souches d'*E. coli* modifiées génétiquement par clonage de l'isoprène synthase. L'isoprène est le monomère de base pour l'obtention du latex :



Initialement prévue en 2013, l'industrialisation de ce procédé a été retardée du fait de l'acquisition de Danisco et sa filiale Genencor par DuPont en 2011. Elle est actuellement en attente de décision d'investissement.

Commentaire

On constate que les entreprises qui ont fait le choix de devenir des producteurs industriels ont connu des difficultés significatives et des retards importants à l'industrialisation, soit du fait de performances insuffisantes pour atteindre les seuils de rentabilité (Amyris, Gevo) lors du passage du pilote à l'usine, soit de problèmes de construction de telles usines (Metabolic Explorer). Ceci souligne le caractère incontournable de l'expérience industrielle, sous tous ses aspects.

Et demain ?

Il est évident que la vitesse et l'étendue du développement des biotechnologies blanches seront intimement liées à la viabilité économique des procédés correspondants, et seulement à cette viabilité. Les arguments concernant l'origine « biosourcée » des matières premières utilisées, le caractère renouvelable du carbone, les économies d'énergie réalisées, ne valent que si le prix de revient final du produit est inférieur à celui du produit obtenu par les procédés traditionnels à partir de carbone fossile dans des installations industrielles largement amorties.

Pourra-t-on longtemps assister à la promotion en Europe d'emballages en PET « biosourcé », produits en Inde à partir d'éthylène fabriqué au Brésil à partir de bioéthanol provenant de la fermentation de sucre de canne ?

L'avenir des biotechnologies industrielles dépend donc de plusieurs paramètres :

- La disponibilité de carbone renouvelable de manière fiable et à un prix compétitif et stable par rapport au carbone fossile : aujourd'hui, seules les matières premières de première génération (glucose, saccharose, huiles végétales, glycérol) sont effectivement disponibles à l'échelle industrielle. Le débat sur leurs conditions de production (huile de palme, sucre brésilien) et sur la compétition entre usages alimentaires et usages non alimentaires oblige à rechercher des solutions du côté de la biomasse lignocellulosique, même si aucune solution simple n'existe à l'heure actuelle. Faut-il privilégier la dégradation thermo-chimique ou bien l'attaque chimique ou chimio-enzymatique ? Faut-il utiliser les coproduits de l'agriculture (bagasse, rafles de maïs, son...) ou la filière forestière (la seule qui soit à peu près organisée), plutôt que des cultures dédiées (quelle rémunération pour les agriculteurs) ? On observe, par exemple, que la société Coskata, qui avait basé ses bioprocédés sur l'utilisation de gaz de synthèse produits par gazéification de biomasse, a récemment décidé d'utiliser le gaz de schistes abondamment disponibles aux États-Unis, et de faire ainsi l'économie de l'étape de gazéification [10].
 - La capacité de développer des biocatalyseurs (enzymes, micro-organismes, consortia microbiens) performants permettant d'atteindre des rendements, des productivités et des concentrations finales de produit assurant la compétitivité des procédés correspondants : c'est l'objectif du démonstrateur préindustriel Toulouse White Biotechnology, financé en 2011 par l'ANR dans le cadre des Investissements d'avenir [11]. L'utilisation conjointe d'approches d'ingénierie enzymatique, d'ingénierie métabolique, de biologie de synthèse et de génie biochimique, de plus en plus performantes, permettra d'atteindre cet objectif.
- Il s'agit donc, pour l'instant, d'une évolution de l'existant, grâce à des connaissances fondamentales de plus en plus approfondies, des méthodologies de plus en plus performantes, un contexte favorable lié à une prise de conscience

des contraintes environnementales et de la raréfaction des ressources fossiles.

La véritable révolution des biotechnologies industrielles passera par la capacité des chercheurs et des ingénieurs non seulement à produire plus efficacement les composés aujourd'hui issus du carbone fossile, mais surtout, à créer de nouveaux produits dont les fonctionnalités justifient le coût de production, en intégrant de manière de plus en plus étroite des étapes biologiques dans des procédés chimiques. Cette révolution implique également la formation de chercheurs et d'ingénieurs ayant une appréhension plus large des outils disponibles, afin de trouver les solutions optimales.

Références

- [1] OECD, *Biotechnology for Sustainable Growth and Development*, 2004.
- [2] Carlson R., The changing economics of DNA synthesis, *Nature Biotechnol.*, **2009**, 27(12), p. 1091.
- [3] Gibson D.G. *et al.*, Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome, *Science*, **2010**, 359, p. 52.
- [4] Tasse L., Bercovici J., Pizzut-Serin S., Robe P., Tap J., Klopp C., Cantarel B.L., Coutinho P.M., Henrissat B., Leclerc M., Doré J., Monsan P., Remaud-Siméon M., Potocki-Véronèse G., Functional metagenomics to mine the human gut microbiome for dietary fiber catabolic enzymes, *Genome Res.*, **2010**, 20, p. 1605.
- [5] Champion E., André I., Moulis C., Boutet J., Descroix K., Morel S., Monsan P., Mulard L., Remaud-Siméon M., Design of α -transglucosidases of controlled specificities for programmed chemo-enzymatic

synthesis of antigenic oligosaccharides, *J. Amer. Chem. Soc.*, **2009**, 131, p. 7379.

- [6] Rothlisberger D., Khersonsky O., Wollacott A.M., Jiang L., De Chancie J., Betker J., Gallaher J., Althoff E.A., Zanghellini A, Dym O., Albeck S., Houk K.N., Tawfik D.S., Baker D., Kemp elimination catalysts by computational enzyme design, *Nature*, **2008**, 453, p.190.
- [7] SNRI, « Biologie de synthèse : développements, potentialités et défis », Rapport du Groupe de travail « Biologie de synthèse », **2011**.
- [8] <http://biologie-synthese.cnam.fr>
- [9] Soucaille P., communication personnelle, **2012**.
- [10] www.biofuelsdigest.com/bdigest/2012/07/20/coskata-switches-from-biomass-to-natural-gas-to-raise-100m-in-natgas-oriented-private-placement
- [11] www.toulouse-white-biotechnology.com

© Gilles Cattiau/Inra



Pierre Monsan

est professeur à l'INSA Toulouse et Mines ParisTech et directeur de Toulouse White Biotechnology*

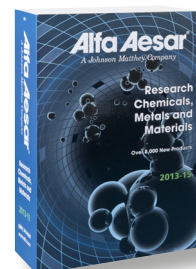
* Toulouse White Biotechnology, UMS INRA 1337, UMS CNRS 3582, 135 avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse Cedex 4.
Courriel : Pierre.Monsan@insa-toulouse.fr



Mise à jour du catalogue plus de 8 000 nouveaux produits

Alfa Aesar, a Johnson Matthey Company, annonce la sortie de son catalogue 2013-2015 de produits chimiques, métaux et matériaux pour la recherche. Ce nouveau catalogue inclut plus de 8000 nouveaux produits parmi lesquels :

- des benzène sulfonamides,
- des benzamides,
- des catalyseurs homogènes à base de métaux précieux,
- des ligands chiraux,
- des thiourées,
- des composés hétérocycliques,
- des réactifs de click chemistry,
- des chlorures de sulfonyle,
- des acides carboxyliques,
- des acides boroniques,
- des organofluorés,
- des réactifs de Grignard,
- et bien d'autres encore.



Un grand nombre de ces nouveaux produits sont uniques et disponibles exclusivement auprès d'Alfa Aesar.

Demandez votre catalogue www.alfa.com

www.alfa.com

Alfa Aesar[®]
A Johnson Matthey Company