

La chimie du végétal et les nouveaux synthons accessibles par les biotechnologies

Paul Colonna

Résumé Le carbone d'origine biologique est invité à être l'une des solutions pour la transition énergétique en France, et plus généralement le développement de la bioéconomie dans le monde. La biomasse a différentes origines : produits d'origines agricole, algale et forestière, coproduits et effluents des industries de transformation des matières biologiques et autres déchets organiques. Un grand nombre de solutions, espèces et systèmes de cultures, ont été analysées dans l'atelier de réflexion prospective Véga (végétaux du futur). Le passage d'un carbone d'origine biologique à celui renouvelable impose de considérer les impacts environnementaux, économiques et sociaux sur le développement de la bioéconomie. Trois changements de paradigme sont clés pour accomplir ce basculement : les biotechnologies blanches et vertes, la conception de systèmes chimique et énergétique en articulation avec le système alimentaire. Les bioraffineries sont une opportunité de développement industriel au-delà des territoires et des systèmes culturels.

Mots-clés Biomasse, biotechnologies vertes et industrielles, durabilité, système, bioraffinerie.

Abstract **Bio-based chemistry and new platform molecules from biotechnologies** Biobased carbon is considered to be one of the solutions for the energy transition in France, and more generally the development of the bioeconomy in the world. Biomass could have different origins: agricultural products, algae and forestry, as well as co-products and by-products from industries processing of biological materials and other organic wastes. A large number of plants, algae, and cropping systems were analyzed in the foresight exercise Véga. Shift from a biobased carbon source to a strictly sustainable one requires considering the environmental, economic and social pillars of the bioeconomy. Three paradigm changes should help to realize this transition: white and green biotechnologies, design of chemical and energy systems in relation with the food system. Biorefineries represent an opportunity for industrial development beyond territories and cropping systems.

Keywords Biomass, green and industrial biotechnologies, sustainability, system, biorefinery.

La biomasse a joué un rôle important dans le développement des sociétés humaines. Dès le néolithique [1], les civilisations se sont développées, en particulier dans le croissant fertile et en Égypte, en modifiant leur environnement et en employant les ressources naturelles pour leurs besoins fondamentaux : l'alimentation (blé, seigle...), l'habillement (laine, coton, chanvre, lin, cuir...), l'habitation (bois, paille...), plus tard l'hygiène (savons végétaux) et avec l'aide d'une force motrice animale (bœuf, cheval...). Puis très rapidement, l'Homme a utilisé les biotechnologies pour transformer certaines matières : fermentation alcoolique, biotransformation du vin en vinaigre, rouissage du lin.

La particularité de cette époque pré-carbone fossile est que les matières biologiques étaient peu transformées.

Après une période où les produits dérivés du carbone fossile se sont imposés, la biomasse revient sur le devant de la scène. Elle est même considérée dans les douze règles d'Anastas et Warner [2] pour la chimie verte (règle 4 : « *Use renewable feedstock* »). Une nouvelle appellation plus rigoureuse sur le plan sémantique serait alors celle de « chimie verte du carbone renouvelable ».

Le débat national sur la transition énergétique est lancé en France. Or la chimie du végétal constitue l'un des piliers d'une transition globale, assurant le passage d'une économie basée sur les ressources fossiles à une économie du

renouvelable. En particulier, la valorisation de la biomasse constitue l'un des leviers les plus forts pour contribuer à la réalisation de l'objectif français de réduction des gaz à effet de serre et de maîtrise de l'approvisionnement énergétique.

Le potentiel de la bioéconomie a été reconnu aussi dans le cadre de la stratégie Europe 2020. À ce titre, limiter le travail de la Commission européenne à la recherche et à l'innovation s'est avéré insuffisant ; la promotion de l'utilisation des ressources renouvelables de la terre et de la mer afin de mettre en place une économie post-pétrolière en Europe recouvre l'ensemble de la recherche, du développement et de l'innovation.

La biomasse

Dans ce paysage, les sources de biomasse se sont considérablement élargies depuis les plantes industrielles du début du XX^e siècle. La biomasse est la source de matière organique carbonée produite par des organismes vivants ou par leur décomposition. Elle est essentiellement formée de carbone, d'hydrogène et d'oxygène, et à un moindre degré d'azote, provenant de divers types de ressources :

- les produits d'origine agricole, subdivisés d'une part entre les cultures traditionnelles de plantes annuelles (céréales, oléagineux), recherchées principalement pour leurs parties

Tableau I - Les solutions végétales pour les différentes familles biochimiques.

Famille biochimique	Plantes strictement lignocellulosiques	Plantes à réserve glucidique	Plantes à réserve lipidique
lignocellulose	ylviculture (peuplier, saule, pin, eucalyptus, robinier...), miscanthus, lin, chanvre, ramie, sorgho, triticale, macroalgues	tiges de canne à sucre, tiges et enveloppes des grains	tiges et enveloppes des graines
amidon		grains de céréales (blé, maïs, orge, riz, sorgho), graines de protéagineux	
saccharose		racines de betterave, tiges de canne à sucre	
oligosaccharides		graines de légumineuses, topinambour, chicorée (inuline), sons de seigle	
lipides			graines d'oléagineux : colza, tournesol, soja, ricin, coton, cameline, palmier, micro-algues
protéines		grains de céréales (gluten de blé, de maïs...)	graines d'oléagineux (tourteaux), microalgues

nobles (grains, graines et tubercules), et d'autre part les cultures dédiées à la bioraffinerie (*Miscanthus*, panic érigée, etc.), ainsi que les résidus de cultures (pailles, tiges, feuilles) et d'élevages ;

- les produits d'origine forestière : bûches, granulés, plaquettes et résidus de l'exploitation forestière ou de cultures sylvicoles spécifiques (taillis à courte ou à très courte rotation de peupliers et d'eucalyptus) ;
- les produits d'origine aquatique : algues, résidus de la pêche et de la pisciculture ;
- les coproduits et effluents des industries de transformation des matières biologiques : scieries, papeteries, industries agroalimentaires, élevages industriels ;
- les autres déchets organiques : déchets urbains, boues issues des stations d'épuration, ordures ménagères, déchets verts provenant de parcs et jardins.

Passer de la famille biochimique à la plante conduit à considérer alors l'organe cible. Les végétaux renferment une très grande diversité biochimique : au sein de chaque plante, entre les plantes d'une même espèce et entre les espèces. Toutefois, une classification simple peut être mise en place avec trois familles : les plantes lignocellulosiques, les végétaux à réserve glucidique et les végétaux à réserve lipidique (tableau I).

Pour toutes ces espèces, des analyses « menaces, opportunités, forces, faiblesses » ont été réalisées dans l'atelier de réflexion prospective Véga/végétaux du futur en 2010-2011 [3].

Quatre familles biochimiques principales sont identifiées :

- **L'amidon**, qui est un réservoir de deux polymères, l'amylose et l'amylopectine, eux-mêmes polymères de glucose (comme la cellulose). Le glucose peut ainsi être transformé en plusieurs molécules plateformes, chacune étant à l'origine d'une nouvelle famille de (macro)molécules.
- **Le saccharose**, qui joue le même rôle que le glucose.
- **Les biopolymères constitutifs des parois végétales**, qui peuvent être considérés de deux manières :
 - soit comme un réservoir de structures organisées, aux propriétés fonctionnelles avérées, que l'on souhaite utiliser en l'état (c'est le cas du bois massif et fragmenté, du bambou,

des fibres). Le bois-matériau a des propriétés liées d'une part à l'organisation multi-échelles des constituants élémentaires que sont les fibres, et d'autre part à l'architecture alvéolaire optimisée du matériau bois ; le bois en tant que tissu de soutien est conçu pour s'adapter aux conditions environnementales variées et aux agressions biologiques (insectes, champignons, etc.). En tant que matériau, le bois est remarquable pour la conjonction de ses propriétés : forte rigidité, fort module de rupture en compression et en traction, très faible retrait longitudinal, capacité de régulation hygroscopique, faible conductivité thermique, faible effusivité thermique, rôle esthétique, etc. Il devient ainsi incontournable pour la conception de maisons à basse consommation énergétique.

- soit comme un réservoir de polymères, d'oligomères, d'hexoses et de pentoses, qui peuvent servir directement ou après modification(s) dans diverses applications de la chimie, à l'instar de l'amidon et du saccharose.

- **Les lipides** : les acides carboxyliques (acides gras libres), produits actuellement à l'échelle industrielle à partir de matières premières renouvelables, ont des longueurs de chaîne bien définies (C18-C22 pour les produits d'origine de zone tempérée ; C8-C18 pour les dérivés des huiles de palme, palmiste et coprah d'origine tropicale), à nombre pair d'atomes de carbone. En réalité, cette famille biochimique recouvre une diversité moléculaire méconnue, où la présence de doubles liaisons, de fonctions époxydes sont des atouts à renforcer.

Outre ces quatre familles majeures, il faut mentionner les protéines végétales de réserve en tant que biopolymères, le caoutchouc naturel, qui est un biopolymère isoprénique, et les métabolites secondaires, ces derniers étant très nombreux (180 000 molécules déjà décrites et environ 4 000 nouvelles répertoriées chaque année). Ils présentent une variété structurale extraordinaire, répartie en trois classes : les terpénoïdes, les composés aromatiques (phénoliques), les composés azotés ou alcaloïdes.

Ces biomasses végétales, qu'elles soient issues de graines, de tubercules, de racines ou de tiges, comportent différentes échelles d'organisation, ce qui induit des propriétés

d'intérêt (bois par exemple), mais peut aussi constituer un verrou pour la bioraffinerie (lignocellulose difficile à dégrader). Une particularité consiste en l'existence de plusieurs niveaux d'organisation. La structure de chaque niveau et ses propriétés constituent des propriétés émergentes (figure 1). Les propriétés mécaniques sont fortement déterminées par les organisations intermoléculaires et ne sont pas déductibles de la seule composition biochimique.

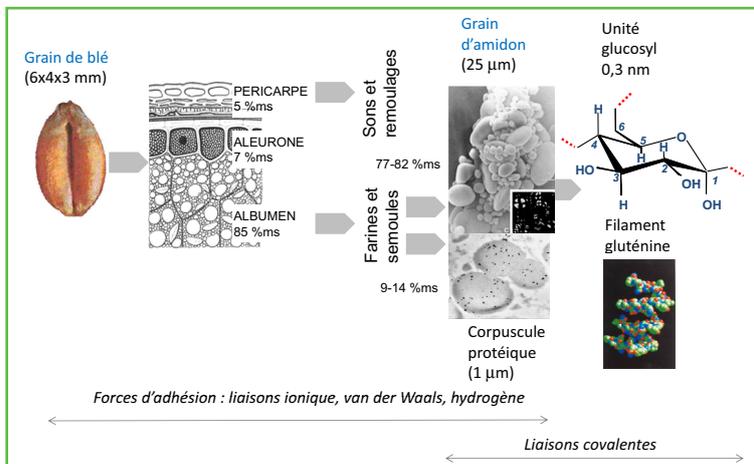


Figure 1 - Niveaux structuraux du blé. Les structures et interactions à une échelle déterminent les propriétés et comportements à l'échelle supérieure.

De ce point de vue, l'hétérogénéité compositionnelle des matières premières végétales peut être considérée comme un atout pour donner à la fois des produits à forte valeur ajoutée sur des segments à faible volume (chimie fine), des produits de masse à faible valeur ajoutée (carburants), des produits intermédiaires en termes de volume et de prix (polymères, tensioactifs, etc.), et enfin des résidus qui peuvent répondre aux besoins énergétiques des bioraffineries.

Chimiquement, la différence majeure entre les molécules issues des carbones fossiles et des carbones biologiques réside dans le degré d'oxydation plus élevé dans celles d'origine biologique. C'est l'une des faiblesses des biocarburants, dont le pouvoir calorifique supérieur (PCS) est encore inférieur à celui des carburants fossiles.

Les polysaccharides ont une formule générale $[C_6(HOH)_5]_n$, la lignine $[C_{10}H_{12}O_3]_n$, les lipides à base de glycérol $(C_nH_mO_6)$ avec n entre 50 et 60, à la différence du méthane CH_4 et du pétrole $[CH_2]_n$.

Les enzymes : premier volet des biotechnologies blanches

L'origine biologique des molécules considérées repose sur l'action d'enzymes, adaptées à chacune des familles précitées, actives dans le métabolisme des êtres vivants. Les biotechnologies blanches consistent à adapter l'activité de ces enzymes pour élargir la palette des molécules issues du vivant (tableau II).

La biocatalyse présente plusieurs avantages :

- des conditions douces de réaction (température et solvant) en raison de la nature protéique des enzymes. Dans les textiles, le remplacement des traitements alcalins à chaud par des enzymes a permis de réaliser des gains importants sur les besoins en énergie et en termes de pollution de l'eau ;
- l'usage d'un solvant - l'eau - qui peut être plus éco-compatible que les solvants organiques ;
- des activités de catalyse élevées ;

Tableau II - Principales enzymes mises en œuvre pour des synthèses moléculaires.

Réactions	Enzymes
Hydrolyse	hydrolases
Isomérisation, addition, élimination	isomérase, lyases, hydratases
Création de liaison C-N	transaminases
Formation d'esters sulfate	sulfotransférases
Formation et hydrolyse d'ester phosphate	phosphorylases, phosphatases
Formation d'ester ATP-dépendant	kinases
Formation de liaison glucoside	glycosyltransférases, glucosidases
Formation de liaison C-C	aldolases, transcétolases
Oxydation	oxydases, peroxydases
Oxydoréduction des alcools et des cétones	déshydrogénases
Liaison amide	amidases (protéases, acylases)
Liaison ester	estérase, lipase

- des régio-, stéréo- et chimiosélectivités élevées ;
- la possibilité d'éviter des réactions de protection et de déprotection dans la synthèse multiphase des molécules complexes. Par exemple, la déacylation de la pénicilline G est ainsi assurée par voie biocatalytique par la pen-acylase en solution aqueuse plutôt qu'en cinq étapes par voie chimique [4] (figure 2).

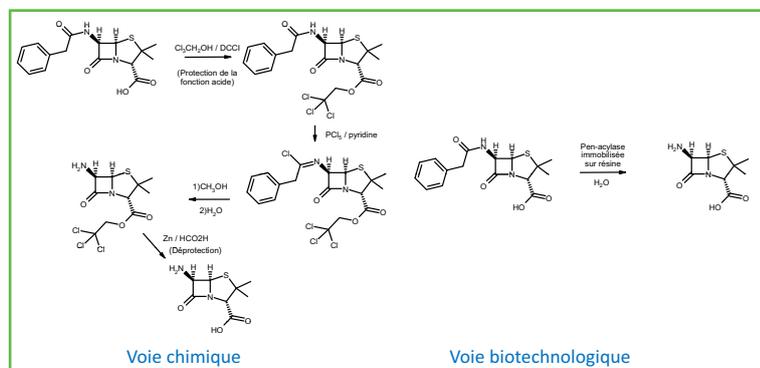


Figure 2 - Voies chimique et biotechnologique de déacylation de la pénicilline G.

Les enzymes ont été de grands bénéficiaires des nouvelles méthodes de génie génétique pour une profonde évolution qualitative. Les deux progrès sont d'une part la découverte de nouveaux gènes disponibles, d'autre part la modification de ces gènes pour améliorer les performances des enzymes. Les objectifs des recherches sur les enzymes sont d'abord l'accroissement de leurs performances (stabilité, température, pH, solvants non aqueux...), l'efficacité (par réduction des réactions compétitives), et enfin l'élargissement du potentiel applicatif (adaptation à de nouveaux substrats, non naturels, adaptation à la catalyse de nouvelles réactions chimiques).

Par exemple, les enzymes présentes dans les lessives (protéases et lipases) ont été rendues plus résistantes aux agents oxydants. Les glucane-saccharases ont vu leurs

Glossaire

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

Endophyte : qui vit en endosymbiose avec une plante, à l'intérieur d'un organe ; cas des bactéries ou des champignons.

Organisme autotrophe : organisme capable d'utiliser des éléments inorganiques pour synthétiser ses propres constituants organiques. Les principaux sont phototrophes à partir de l'énergie lumineuse : plantes, microalgues, cyanobactéries.

Organisme hétérotrophe : organisme incapable de synthétiser l'ensemble de ses constituants à partir d'éléments minéraux : animaux, champignons.

Nucléases à domaine en doigt de Zn (ZFN) : facteurs de transcription de l'ADN. Ces protéines comportent des éléments répétitifs avec une forme de doigts de gant, stabilisée par un ion Zn^{2+} qui sert à stabiliser le motif sous forme de doigt.

Physiome : description dynamique complète du fonctionnement d'un organisme depuis l'expression des gènes jusqu'à l'échelle de l'organisme, en intégrant les réactions adaptatives aux modifications et les stress apportés par l'environnement.

spécificités améliorées avec un élargissement des structures moléculaires synthétisées par ces transférases.

L'enzymologie s'est développée à partir de l'exploration des enzymes des espèces sauvages, depuis Anselme Payen (1833). Ces approches ont acquis une vigueur nouvelle avec la métagénomique, où 10^5 à 10^6 clones peuvent être obtenus à partir d'une banque sans culture préalable des micro-organismes. Au-delà de ces progrès majeurs, le criblage fonctionnel à haut débit des banques issues de métagénomiques accélère encore la découverte de nouvelles enzymes provenant de biotopes originaux (système digestif de l'Homme, des ruminants, des termites, etc.) et l'isolement de nouveaux opérons associant de manière originale différentes activités enzymatiques en une action concertée.

Le coût de la lecture et de l'écriture de l'ADN a connu une diminution considérable (de 10 000 € en 2001 à un ordre de 0,1 €/mégabase en 2012 [5]), et la plupart des laboratoires académiques peuvent aujourd'hui avoir accès au séquençage d'un micro-organisme. La métagénomique fonctionnelle ne cherche pas seulement des séquences de gènes, mais permet d'extraire, de cloner et de séquencer l'ADN sans culture du micro-organisme.

Grâce aux données de structure, des mutations ponctuelles peuvent ensuite être apportées afin d'améliorer l'efficacité des enzymes. Ces techniques de mutagenèse, aléatoire puis dirigée [6], ont permis d'obtenir de l'ordre de 10 à 20 variants à partir d'un gène. Dans les années 1990, les techniques d'évolution moléculaire dirigée [7] ont conduit à mimer, *in vitro* et en accéléré, les principes darwiniens d'évolution des protéines, conduisant à 10^3 - 10^4 variants à partir d'un gène. En contrepoint de ces approches empiriques, les travaux de Baker [8] ont débouché sur la conception rationnelle par modélisation et « screening » virtuel. Aujourd'hui, les nouvelles méthodologies d'ingénierie offrent des opportunités inégalées de création à façon de nouvelles enzymes. Les techniques purement combinatoires d'ingénierie reposant sur un processus itératif de génération de diversité (création de bibliothèques de mutants), couplé à un tri par sélection ou criblage, sont suffisamment génériques pour pouvoir être appliquées à tous types d'enzymes. Elles ont conduit à l'obtention de catalyseurs très efficaces, stables aux températures extrêmes ou en milieu organique, de profil pH modifié et/ou de sélectivité renforcée. Le développement de cribles spécifiques, robustes, fiables et à haut débit, utilisant des automates ou des méthodes appropriées (cytométrie en flux, microfluidique), permet incontestablement de repousser les limites du criblage, en autorisant le tri de plusieurs millions de variants à chaque tour d'évolution, et d'accroître la probabilité d'isolement des enzymes d'intérêt.

La tendance actuelle s'oriente néanmoins vers la construction intelligente de bibliothèques généralement focalisées sur le site actif de la protéine. Leur construction peut être non seulement guidée par l'analyse bio-informatique des structures primaire, secondaire et tertiaire, mais aussi enrichie par les techniques prédictives de modélisation moléculaire et d'analyse statistique des résultats d'évolution. Ces différentes méthodologies tirent parti des progrès de la biologie computationnelle (modélisation moléculaire, analyse statistique, bio-informatique) pour réconcilier les approches rationnelle et combinatoire, et permettre de programmer la construction efficace de catalyseurs dotés de nouvelles fonctions.

Ces approches sont très efficaces pour créer à façon ou découvrir de nouveaux catalyseurs. De multiples exemples, récemment publiés, témoignent de leur intérêt et de leur

puissance pour le changement de spécificité, de sélectivité, et la création de nouvelles activités catalytiques. Des nouvelles enzymes Diels-alderases capables de catalyser la réaction diène + diénophile \rightarrow cyclohexènes chiraux à partir de la connaissance du mécanisme enzymatique dans le site actif ont été mises au point [9].

Les biotechnologies végétales

Les ressources végétales mobilisables sont d'abord celles des plantes de grande culture (céréales, tubercules) et des forêts (peupliers, eucalyptus) dont les capacités métaboliques sont élevées et les systèmes de production simples et bien établis. Rappelons d'abord que sur les 350 000 espèces végétales recensées, seules neuf assurent 75 % de l'alimentation et continueront à assurer cette base. Ces espèces végétales produisent aussi des fractions anatomiques (tiges, feuilles) non utilisables en alimentation humaine, et donc susceptibles d'être employées en chimie ou en bioénergies.

De nouvelles espèces sont explorées en parallèle. Ainsi le genre *Miscanthus* et le « switchgrass » (*Panicum virgatum*), *Jatropha curcas* L., le jojoba (*Simmondsia chinensis*), le genre *Cuphea*, le crambe (*Crambe abyssinica*), la guayule (*Parthenium argentatum* Gray) et le pissenlit russe (*Taraxacum kok-saghyz*) sont représentatifs de ces plantes qui ouvriraient le spectre des plantes mobilisables. Ces plantes associent plusieurs caractéristiques :

- elles poussent dans des milieux difficiles non utilisables pour l'alimentation humaine,
- elles ont une très forte productivité,
- elles ne sont pas comestibles,
- elles comportent une fraction biochimique dont l'utilité est déjà bien cernée.

La surface limitée des terres arables conduit à rechercher des plantes susceptibles de croître sur des sols pollués ou non adaptés à l'agriculture alimentaire. Les approches de phytoremédiation relèvent principalement d'une problématique d'« aménagement écologique ». L'enjeu est alors de trouver l'espèce végétale appropriée et de déterminer les conditions dans lesquelles l'implanter.

Les plantes peuvent métaboliser les polluants organiques au niveau de leurs racines. La voie des bactéries endophytes*, partenaires habituelles des plantes, semble être une approche prometteuse.

Les microalgues représentent une dernière solution originale. Elles connaissent actuellement un très grand succès, en

raison de leur productivité et de leur implantation potentielle en dehors des terres arables. La grande diversité biologique qui existe chez les microalgues répond sans doute à une exceptionnelle adaptabilité, et laisse préjuger d'une richesse proportionnelle en molécules originales (lipides, protéines, sucres, métabolites, etc.). De plus, le rendement des diatomées et des chlorophycées est nettement supérieur à celui des plantes terrestres, car ce sont des organismes unicellulaires et leur croissance en suspension dans un milieu aqueux leur permet un meilleur accès aux ressources (eau, CO₂ ou minéraux). Lorsqu'elles sont soumises à un « stress », leur production de lipides augmente et peut atteindre plus de 50 % de la biomasse totale. Une étude récente s'appuyant sur des données de terrain a ainsi estimé le potentiel de productivité en lipides des cultures de micro-algues autour de 40 t/ha/an en l'état actuel de la pratique, et a évalué un optimum réaliste autour de 20 t/ha/an [10]. À ce titre, elles seraient les premières alternatives biologiques au photovoltaïque de dernière génération.

Les avantages des biotechnologies vertes sont multiples :

- mieux exploiter la diversité végétale,
- faciliter les croisements interspécifiques,
- maîtriser l'apport de nouveaux caractères par la connaissance du génome,
- diminuer les durées de création variétale et d'évaluation agronomique.

Au cours des soixante dernières années, les rendements des principales cultures ont été multipliés par 5, avec une contribution de l'amélioration génétique pour plus de 50 %.

L'objet des biotechnologies réside dans la manipulation des gènes. Il convient de souligner qu'au sein de chaque espèce existe une énorme variabilité génétique, qui constitue un réservoir de gènes qui sont indispensables à la survie de cette espèce et est d'un grand intérêt pour améliorer les espèces élevées ou cultivées. Les mutations sont à la base de l'évolution, de l'adaptation des espèces, de la domestication comme de la sélection. Les données génomiques montrent que le monde vivant constitue un pool de gènes qui évolue en permanence. Enfin, la quasi-unicité du code génétique permet des transferts « horizontaux » nombreux et variés :

- cas des α -protobactéries \Rightarrow mitochondries ... \Rightarrow champignons, animaux ;
- cas des cyanobactéries (photosynthétiques) \Rightarrow chloroplastes \Rightarrow plantes.

À la différence des méthodes antérieures de modifications génétiques, les nouvelles méthodes de biologie moléculaire conduisent à une maîtrise du site d'insertion du gène dans le génome (effet de position sur l'expression du transgène ou création de mutations), avec des technologies d'ingénierie moléculaires [11] comme les nucléases à domaine en doigt de Zn* (ZFN), les méganucléases et les protéines TALEs (« transcription activator-like effectors »).

Ces biotechnologies offrent de nouvelles voies pour répondre au besoin de doubler la production végétale attendu pour 2050, avec une optimisation des performances de la photosynthèse, aux plans énergétique et de la gestion de l'eau. De nouvelles cibles paraissent envisageables : le doublement du potentiel théorique des plantes de grandes cultures, avec l'optimisation des parties aériennes, l'ingénierie des carboxylases en prévision des concentrations plus élevées en CO₂, l'optimisation moléculaire des réactions de la photosynthèse, et le management des terres arables pour préserver ce capital environnemental.

L'amélioration des plantes consiste à exploiter la variabilité, naturelle ou induite par mutation, en croisant des plantes dont on va ensuite sélectionner la descendance sur la base d'un phénotype. Plusieurs méthodes sont disponibles : la variation génétique spontanée ou induite (mutagenèse), la transgénèse, l'hybridation. On peut dans ces cas développer des stratégies de génétique d'association, encore peu utilisées chez les plantes car elles nécessitent d'importantes ressources moléculaires. On peut cependant présumer que ces approches vont se développer dans un avenir proche avec l'acquisition des données de génomique, y compris chez les arbres. Les deux façons de suppléer une variabilité naturelle insuffisante sont la transgénèse et la mutagenèse associées au « tilling » (« targeted induced local lesions in genomes ») – voir l'article de Denis Pompon *et coll.*, p. 24. À la différence de la cisgénèse, où le gène introduit provient de la même espèce, la transgénèse rassemble les méthodes de transfert dans le génome d'un organisme, d'un gène d'un autre organisme plus ou moins éloigné (autre espèce ou autre règne). Cependant, ce type de stratégie ne dispense pas d'un lourd travail de rétrocroisement pour éliminer ensuite les autres mutations présentes dans le génome.

L'amélioration des propriétés des plantes cultivées passe aussi par des outils de criblage pour identifier des individus intéressants parmi des centaines, voire des milliers de plantes, ou par des méthodes de reproduction par multiplication végétative et par culture *in vitro*. Ces techniques s'inscrivent dans un processus permanent de variation et de recombinaison des génomes des plantes au fil des croisements, processus naturel bien éloigné de la vision « fixiste » de la nature sous-jacente à certains discours.

Bien que l'attention se soit portée ces dernières années sur l'acquisition de résistance aux contraintes biotiques (maladies, prédateurs) et abiotiques (phytosanitaires), de nouveaux objectifs de qualité et de durabilité s'inscrivent à l'ordre du jour des amélioreurs (*tableau III*).

L'ingénierie métabolique demeure complexe sur les plantes supérieures. Les méthodes classiques de sélection restent nécessaires, en particulier pour les caractères quantitatifs et multigéniques. Le développement de la génomique facilite et augmente la puissance de ces approches et ouvre de nouvelles perspectives de sélection « génomique ». Les biotechnologies permettent d'élargir la base génétique utilisable (ex. : gènes bactériens ou de levures) et, en faisant progresser les connaissances, d'envisager une véritable ingénierie génétique. Elles permettent également de réduire considérablement le temps d'introduction des caractères d'intérêt dans de nombreuses variétés localement adaptées. Les biotechnologies vertes ne modifient pas les contraintes classiques qui s'imposent à l'amélioration des plantes et à l'agriculture (maintien de la biodiversité, apparitions de résistances aux herbicides, maladies, prédateurs ou d'effets non attendus), mais elles offrent des outils supplémentaires pour y répondre. Que cela soit pour l'amélioration conventionnelle ou reposant sur les biotechnologies, la disponibilité/diffusion des ressources génétiques reste un facteur clef et stratégique.

La bioraffinerie

Hormis le latex de l'hévéa, aucun végétal ne donne une biomasse directement utilisable en chimie ou en fermentation sans un traitement préalable de purification et de fractionnement. Mais toutes ces molécules d'intérêt sont

Tableau III - Exemples d'amélioration qualitative des plantes pour répondre à des besoins énergétiques et chimiques.

Cible moléculaire	Caractère modifié	Plantes modifiées
Amidon	Uniquement de l'amylopectine (Amflora TM , BASF, inactivation de la granule « bound starch synthase »)	Pomme de terre
	Amylase endogène facilitant l'hydrolyse	Maïs
Saccharose	Doublément de la teneur en sucre par expression d'une isomérase bactérienne	Canne à sucre
Lipides	Augmentation de la teneur en huile de la graine (+ 40 %), par surexpression d'une glycérol 3P déshydrogénase de levure	Colza
	Augmentation de la teneur en acide laurique	Colza
Lignocellulose	Diminution de la teneur en lignine	Arabidopsis, luzerne, panic érigée, peuplier
	Affaiblissement de l'incrustation par la lignine en modifiant l'activité « cinnamyl alcohol dehydrogenase » (CAD)	Brachypodium, peuplier

présentes dans des organes de réserve (les grains et tubercules) ou de soutien (les tiges). La déconstruction des matières végétales est un verrou central dans les usages de la biomasse. Il a conduit à une industrie particulière, la bioraffinerie, fondée sur une valorisation complète de chacune des fractions récoltées de la plante.

La bioraffinerie est en fait une technologie ancienne. Après la première génération (papeterie, moulin, huilerie), elle a évolué grâce à l'incorporation d'outils chimiques vers la bioraffinerie de deuxième génération (acides gras, glycérol, polysaccharides, isolats de protéines). L'arrivée d'outils biotechnologiques a permis l'approfondissement du fractionnement vers les oses et les peptides, en troisième génération. La gazéification conduisant au gaz de synthèse (syngaz) est le stade ultime de la quatrième génération, avec un éclatement des molécules constitutives en CO et H₂ (figure 3).

premières agricoles ou forestières produites localement ;

- les bioraffineries portuaires, qui traitent principalement des matières premières importées ;
- les bioraffineries environnementales, qui traitent des déchets.

Ces trois bioraffineries apportent des solutions différentes à la question de leur approvisionnement. Une bioraffinerie standard territoriale avec un objectif de 180 ML d'éthanol par an aura un rayon d'approvisionnement d'environ 40 km en s'appuyant sur des cultures lignocellulosiques à 20 t matière sèche/ha sur 10 % des terres environnantes.

Les biotechnologies fermentaires

Au-delà des enzymes, biocatalyseurs sur une réaction définie, l'intégration d'enzymes dans un micro-organisme conduit à une usine cellulaire.

À la différence des organismes autotrophes*, comme les végétaux, les micro-organismes dédiés – éventuellement modifiés génétiquement – apportent une solution technologique de conversion qui repose sur une alimentation des micro-organismes par des nutriments d'origine végétale. Cette orientation revient à combiner en fait deux usines cellulaires, la plante et le micro-organisme, le second se développant en hétérotrophie* sur la base des productions des plantes. Les trois atouts des biotechnologies blanches sont la spécificité, commune aux enzymes et aux micro-organismes, l'adaptation métabolique et la flexibilité moléculaire, ces deux dernières étant particulières aux micro-organismes.

La problématique globale des biotechnologies fermentaires doit être étendue à la récupération des métabolites d'intérêt (« downstream technology »), soit par l'éclatement des cellules et un fractionnement physico-chimique – la voie classique –, soit par la récupération d'un métabolite excrété, indépendamment de la vie du lot de culture en cours. Il convient de souligner que le coproduit de fermentation,

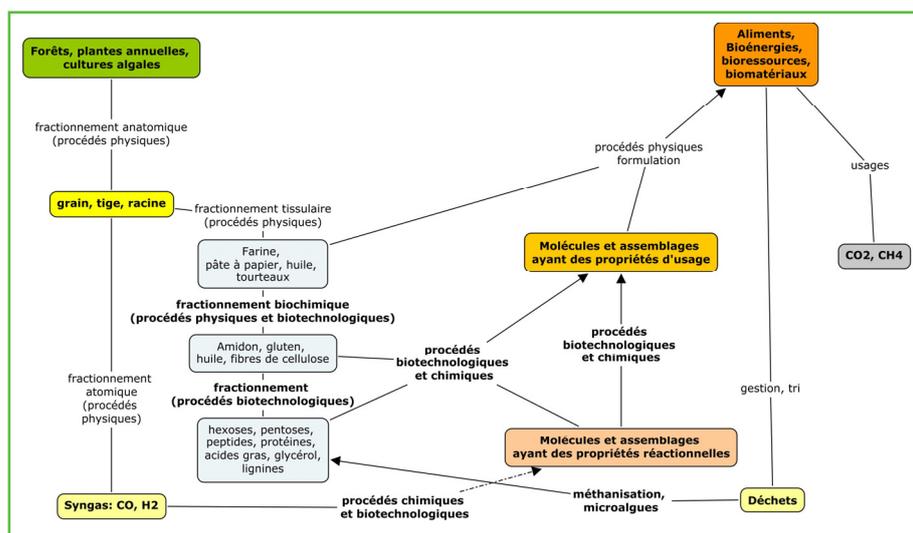


Figure 3 - Les différentes générations de la bioraffinerie.

Cette évolution peut être relue depuis un fractionnement donnant d'abord des molécules ou des assemblages (fibres, grains d'amidon, gluten), eux-mêmes porteurs de propriétés d'usage directement valorisables, vers des molécules ou synthons porteurs de réactivité.

Trois types de bioraffineries coexistent actuellement :

- les bioraffineries territoriales, qui traitent des matières

lorsqu'il peut être utilisé en agriculture ou en alimentation animale, représente une source azotée et énergétique significative à prendre en compte dans la durabilité des systèmes industriels.

Les biotechnologies blanches présentent deux avantages :

- la possibilité de réaliser, en une seule étape de fermentation, tout un ensemble de réactions qui devraient être mises en œuvre successivement selon les procédés chimiques classiques ;
- la capacité de partir de matières premières non purifiées (mélasses).

Leurs mises en œuvre apportent aussi l'avantage [12] de réduire les consommations d'énergie de 20 à 30 % par rapport aux procédés pétroliers et les émissions de CO₂ de 20 à 30 %. WWF avance qu'entre 1 et 2,5 milliards de tonnes éq. CO₂ pourraient être économisées vers 2030, ce qui équivaut aux émissions totales de l'Allemagne en 1990.

Les principaux enjeux pour la biotechnologie fermentaire consistent à préserver les atomes de la biomasse, à avoir recours à des milieux plus concentrés, à simplifier les procédés de purification, et à augmenter les rendements de fermentation et de purification.

Peu de micro-organismes sauvages produisent des métabolites d'intérêt avec des rendements optimaux dans des conditions de production industrielle, sans modifications génétiques pour améliorer le taux de bioconversion. L'ingénierie métabolique a pour objectif de concevoir, par des outils bio-informatiques, de nouvelles voies métaboliques, afin de les adapter à l'existant. Sur cette base, des modifications génétiques seront élaborées par la biologie moléculaire, avant d'être testées. Si les tests s'avèrent inadéquats, un nouveau cycle sera engagé. Le développement de souches hyper-productrices, obtenues initialement par des stratégies de mutagenèse aléatoire puis par des cribles de sélection, a progressivement cédé la place aux stratégies plus rationnelles d'ingénierie métabolique, fondées sur une connaissance croissante des fonctionnalités des réseaux métaboliques et sur l'aptitude à moduler finement l'expression des gènes. Depuis la fin des années 1990, les techniques de rupture en biologie à haut débit ont émergé, que ce soit pour l'analyse des génomes, des protéomes, des métabolomes ou des réseaux métaboliques ; à cela s'est ajoutée la vague des fluxomes, des physiomes* et de la bio-informatique pour traiter la surproduction de données expérimentales et proposer une modélisation intégrative. Les outils de tri à haut débit (50-500 métabolismes complets/jour) se perfectionnent avec l'apparition de « lab-on-chip » capables de démonter des métabolismes en recourant à la microfluidique [13]. Ces approches globales ont donné accès à l'ensemble du potentiel métabolique des micro-organismes, et ont notamment mis en valeur les conséquences indirectes d'une modification du génome suite à des stratégies ciblées de génie génétique. La compréhension des voies de synthèse d'alcane dans une cyanobactérie a permis le transfert des gènes responsables pour la production et la sécrétion de mélanges d'alcane et d'alcènes C13 à C17 dans *E. coli* [14].

La biologie de synthèse

La biologie de synthèse est l'extension de cette logique finalisée, en partant d'un objectif défini : quelles molécules cibles, quelles molécules sources et substrats ? La biologie de synthèse a été définie par le consortium européen

Synbiology comme « *l'ingénierie de composants et systèmes biologiques qui n'existent pas dans la nature* ». Elle débute par la conception rationnelle *in silico* d'un nouveau système biologique ; cette approche, qui s'appuie sur les données disponibles (biologie, génomique, protéomique, etc.), permet d'explorer par avance les propriétés de ce nouveau système. Par exemple, certaines souches de levures construites possèdent jusqu'à douze gènes codant des enzymes ajoutées pour reproduire une voie métabolique entière.

L'étape suivante est la construction de l'objet ainsi conçu, en faisant appel au génie génétique, à la chimie de synthèse, à la microfluidique, en général à une combinaison de ces approches. Intégrées *in vivo* dans des voies métaboliques, les enzymes générées à façon peuvent également permettre de créer de nouvelles séquences métaboliques. Cette orientation marque la convergence entre le génie enzymatique, le génie métabolique et le génie du procédé (ou génie microbiologique). La dernière étape est la caractérisation de l'objet ainsi construit au moyen de toute méthode adaptée, et l'évaluation de ses impacts sur la santé, l'environnement et la société.

On distingue deux démarches :

- 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 de créer des cellules-hôtes (châssis) capables d'une bioproduction efficace ou de fonctions simples prédéterminées.

Signalons cependant que la synthèse complète d'un petit génome bactérien et sa transplantation dans une bactérie-hôte [15] n'est pas un exemple de création de vie, mais seulement la démonstration qu'un acide nucléique *de novo* peut remplacer un acide nucléique original.

Les nouvelles molécules dans ce paysage

En chimie verte du carbone renouvelable, pour la chimie et l'énergie, deux principales approches sont possibles pour identifier les biomolécules d'intérêt :

• **L'approche structurale** consiste à identifier des biomolécules ressemblant à celles utilisées dans la chimie du carbone fossile, et à adapter le procédé pour opérer la substitution. Seule la lignine présente une analogie structurale directe avec les motifs structuraux présents dans le pétrole et ses dérivés. Toutefois, l'incrustation de la lignine dans les structures lignocellulosiques rend sa mobilisation délicate et coûteuse, avec pour conséquence un faible éventail d'usages de la lignine et de ses dérivés.

L'hydrogène d'origine végétale est une piste de recherche et, en cas de succès, pourrait être une source moléculaire directement utilisable en chimie et en énergie. Le plus original dans la littérature scientifique est certainement le couplage biotechnologie-chimie, pour aboutir à des molécules élaborées traditionnellement à partir du pétrole. *Clostridium acetobutylicum* est connu pour produire un mélange acétone-butanol-éthanol dans les proportions 2,3 ; 3,7 ; 7,1. Le mélange acétone-n-butanol-éthanol [16] peut ensuite être modifié par chimie organique classique pour donner des cétones en C5-C11, elles-mêmes transformables par déshydrogénation en paraffines.

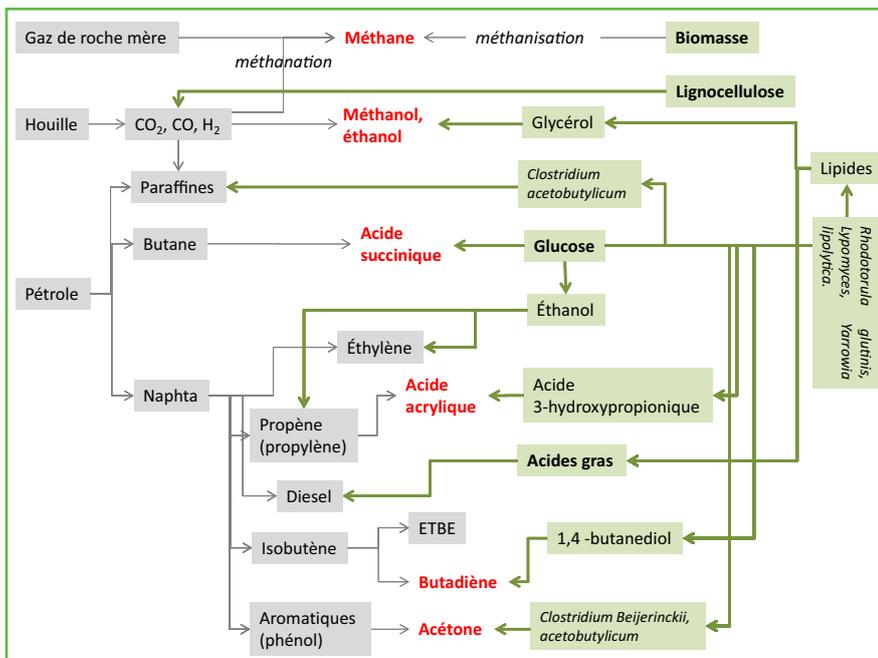


Figure 4 - Place des molécules biosourcées dans les dérivés du pétrole.

Il est ainsi possible de passer de molécules biosourcées à des molécules hémisynthétiques identiques à celles issues de pétrole (figure 4).

• **L'approche fonctionnelle**, plus innovante et plus en adéquation avec les principes de la chimie verte, consiste à explorer les molécules existantes dans le domaine vivant pour y trouver des fonctions semblables à celles recherchées (même si ces fonctions sont portées par des molécules de structures différentes de celles actuellement utilisées), et à les valoriser. Des solutions d'équivalence fonctionnelle existent, surtout lorsque des opérations ultérieures de transformation, en biotechnologie(s) ou en hémisynthèse, viennent conforter la diversité des solutions végétales. La panoplie des

des stratégies industrielles sous-jacentes. L'essentiel de ces choix de molécules plateformes reste confidentiel en raison

Il convient de souligner que certaines molécules d'origine biologique possèdent des capacités d'auto-assemblage à la base des structures biologiques *in vivo*. Ces propriétés commencent à être mises en valeur dans les nanobiotechnologies et inspirent la conception de systèmes biomimétiques.

Appropriation de ces nouvelles molécules et technologies

L'origine biologique des molécules biosourcées n'apporte aucun gain en termes d'impact sur la santé et l'environnement, comparativement aux molécules pétrosourcées, et leur industrialisation est aussi soumise aux procédures REACH. Face à des molécules d'origine fossile, les analyses de cycle de vie des molécules biosourcées sont sans appel. Cependant, la nature des procédés biotechnologiques conduit à revisiter les analyses coûts-bénéfices, avec des questions relatives à l'appréciation et à la gestion des risques.

La propriété intellectuelle est une dimension à considérer dans la valorisation de l'innovation. Les chimistes producteurs de molécules, lorsqu'elles sont nouvelles, vont privilégier les usages. À l'inverse, les fermenteurs pourront préserver une part de secret sur leurs technologies, par analogie aux acteurs de la chimie. Ces deux premières interrogations conduisent à des réflexions sur les fossés technologiques qui pourraient se mettre en place au niveau mondial.

Les biotechnologies suscitent des interrogations complémentaires pour lesquelles des visions différentes sont présentes dans nos sociétés. Les principales interrogations sont celles de la **brevetabilité du vivant** et de notre rapport au vivant

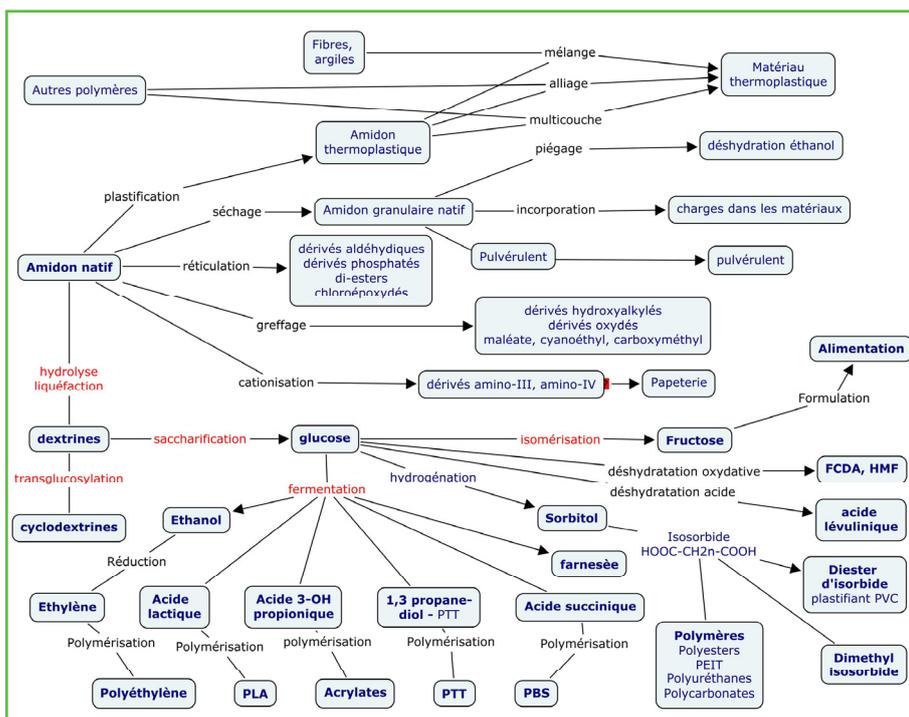


Figure 5 - Les dérivés de l'amidon.

