

Valorisation biologique des agro- ressources

Pierre Monsan est docteur d'État, professeur et ingénieur en génie biochimique de l'Institut national des sciences appliquées (INSA) de Toulouse et professeur aux Mines ParisTech (option Biotechnologie). Il est membre Senior de l'Institut universitaire de France et l'un des membres fondateurs de l'Académie des Technologies. Il travaille essentiellement dans le domaine d'approches enzymatiques et biochimiques au niveau de la création de nouveaux composés.

Une pénurie de ressources est annoncée pour toute une série d'éléments (voir le **Chapitre de B. Goffé**), en particulier pour le carbone fossile. Celui-ci est utilisé par les activités de la chimie, et en constitue actuellement, à plus de 90 %, la principale ressource pour construire les molécules (voir le **Chapitre d'après la conférence de C. Rupp-Dalhem**).

Il est donc temps de trouver d'autres sources de carbone. On pense en particulier au carbone renouvelable d'origine agricole, que ce soient les matières premières agricoles ou leurs sous-produits. Il est clair que nous ne remplace-

rons pas du jour au lendemain le carbone fossile par du carbone renouvelable, mais il s'agit de nous préparer à cette pénurie qui est inéluctable. Cette préparation, qui passe par de la recherche alliant en particulier des biologistes, chimistes et agronomes, nous aidera à résister au choc lorsque le baril de pétrole deviendra trop cher.

Il est également indispensable de développer des procédés aussi éco-compatibles que possible, ce qui est une caractéristique assez générale des procédés biologiques.

Comment nous préparons-nous à l'ère du carbone renouvelable ?

1 La valorisation des agro-ressources : où en sommes-nous ?

1.1. Une réalité industrielle

La valorisation biologique du carbone renouvelable à partir de la biomasse est déjà une réalité industrielle aujourd'hui.¹ De nombreux procédés ont été développés permettant de fabriquer à partir d'agro-ressources des composés d'intérêt industriel à des échelles qui sont tout à fait conséquentes.

Citons par exemple le bioéthanol pour les carburants, produit à 30 millions de tonnes par an, voire davantage. Les isoglucoses, qui sont des sucres produits essentiellement à partir d'amidon de maïs, s'élèvent quant à eux à 15 millions de tonnes de production par an. Ces chiffres sont représentatifs d'une véritable biochimie lourde, loin déjà de l'échelle du laboratoire. Pour d'autres intermédiaires, nous passons à des échelles plus modestes : le glutamate est produit à 1,5 millions de tonnes par an, l'acide citrique à 1 million de tonnes, tandis que l'acide lactique est à 0,25 million de tonnes, et pour les antibiotiques, on descend à 30 000 tonnes par an (**Tableau 1**).

1.2. Les défis du carbone renouvelable

Le premier enjeu concerne les produits bio-sourcés dits

1. Voir aussi : Dinh-Audouin M.-T., Le végétal, un relais pour le pétrole ? (2011). *L'Act. Chim.*, **351** : 24-27.

de **première génération**, qui sont obtenus à partir de la biomasse immédiatement disponible, c'est-à-dire l'amidon, ou le glucose obtenu par hydrolyse de l'amidon, le sucre de betterave ou de canne (saccharose), les huiles végétales (colza, tournesol, palme). Toute cette matière première industrielle de première génération est cependant en compétition avec des usages alimentaires, avec la priorité de nourrir la population planétaire en croissance continue, comme rappelé dans le **Chapitre de J.-L. Morel**.

La recherche se penche donc aujourd'hui sur la **deuxième génération**, ce qui consiste à utiliser la plante entière, et en particulier tous les co-produits de l'industrie agricole. Ainsi, à côté du blé, on récoltera du son et de la paille. L'exploitation du bois est également en vue, s'il est issu d'une exploitation rationnelle des forêts, constituant aussi dans ce cadre une source de carbone renouvelable.

Tableau 1

Production industrielle d'intermédiaires chimiques bio-sourcés par des procédés de biotechnologie industrielle (en millions de tonnes par an). Source : Pr. Wim Soetaert, 2006.

Bioéthanol	30
Isoglucose	15
Glutamate	1,5
Acide citrique	1
Acide lactique	0,25
Acrylamide	0,20
Antibiotiques	0,03

À partir de l'ensemble de ces sources de carbone, on cherche à accéder à toute une série de composés d'intérêt industriel, dont certains sont déjà largement produits aujourd'hui. On peut citer entre autres les intermédiaires cités précédemment pour la chimie, des antibiotiques, des acides aminés, des enzymes, des matériaux plastiques, des édulcorants, ou encore des tensioactifs (peintures, colles, etc.).

2 Les biotechnologies blanches face au défi du carbone renouvelable

2.1. Classification des biotechnologies

Les enjeux du carbone renouvelable issu de la biomasse ont conduit à l'émergence de ce qu'on appelle aujourd'hui les biotechnologies industrielles ou *biotechnologies*

blanches. Rappelons que les biotechnologies regroupent plusieurs domaines, que l'on a distingués par des couleurs : ainsi les biotechnologies médicales sont dites biotechnologies rouges, celles concernant le végétal (par exemple les recherches sur les OGM) sont des biotechnologies vertes ; en bleu correspond le milieu de la mer, et en jaune l'environnement (*Figure 1*).

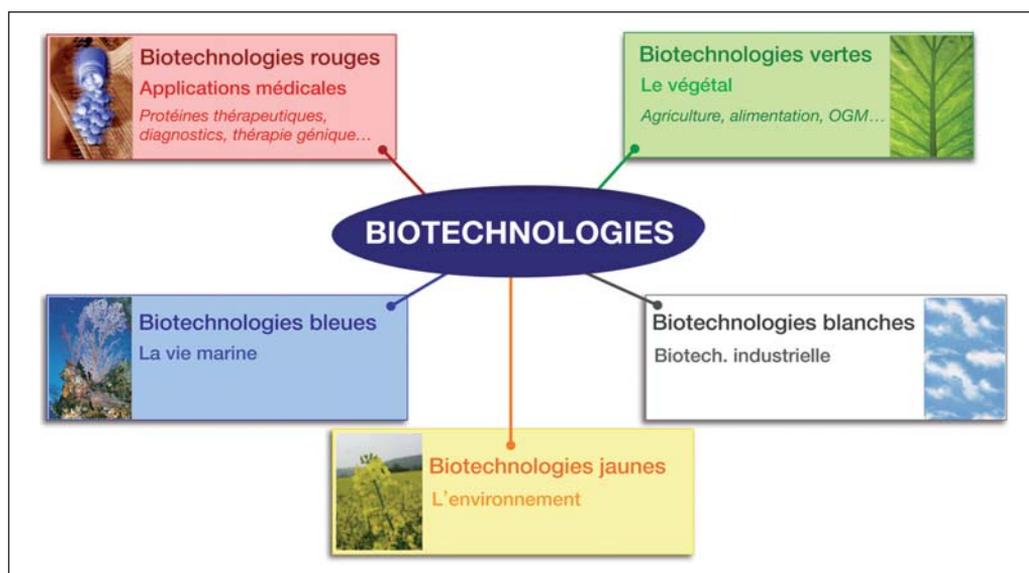
2.2. Les biotechnologies blanches

Les biotechnologies blanches ont pour objet la fabrication de produits chimiques et de bioénergie à l'échelle industrielle par l'utilisation de la biomasse végétale comme matière première renouvelable (*Figure 2*).

À ces fins, les chercheurs ont recours à des procédés utilisant des enzymes ou des mi-

Figure 1

Les couleurs des biotechnologies.



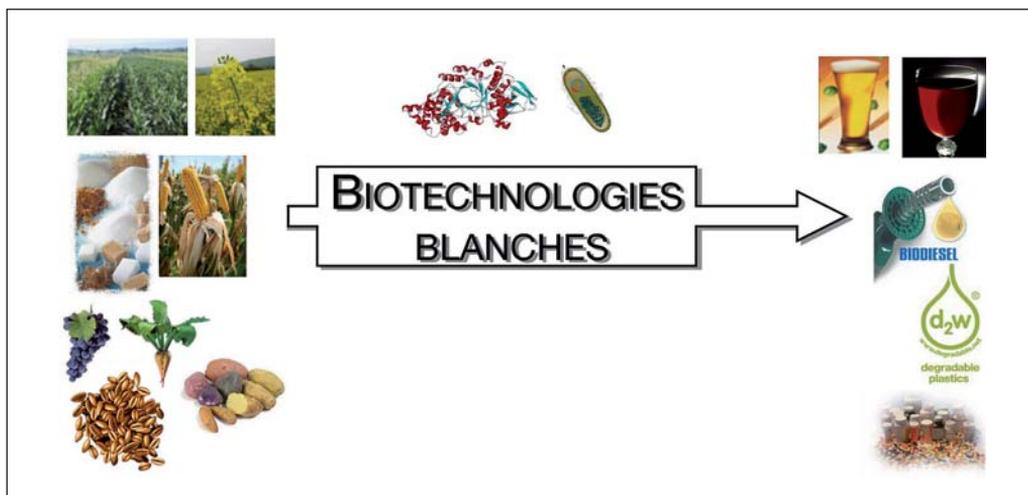


Figure 2

Les biotechnologies blanches ont pour objet la fabrication de produits chimiques, de matériaux et de bioénergie à l'échelle industrielle par l'utilisation de la biomasse comme matière première renouvelable. Leur principe de base est l'utilisation confinée de micro-organismes et/ou d'enzymes.

cro-organismes « sauvages » ou génétiquement modifiés, c'est-à-dire recombinants² (voir le paragraphe 6.1). La condition primordiale est, dans ce dernier cas, qu'ils soient utilisés dans des réacteurs de manière confinée, sans conduire à un relargage dans l'environnement. Cela est déjà réalisé, par exemple, dans la fabrication industrielle d'acides aminés comme la thréonine.

Dans ce cadre, les **bioraffineries** sont amenées à se développer de plus en plus (voir la fin du chapitre) : leur concept repose sur une exploitation maximum des matières premières végétales ; au-delà de l'amidon ou du sucre, ce sont également les matières premières ligno-cellulosiques

(lignine, cellulose et hémicellulose) qui sont concernées.

Les enjeux du carbone renouvelable ont conduit à l'émergence des biotechnologies blanches, qui ont pour objet la fabrication industrielle de produits chimiques, de matériaux et de bioénergie à partir de la biomasse végétale.

2.3. Un domaine de recherche en plein essor

Les biotechnologies blanches sont un domaine qui s'est considérablement développé, grâce aux nombreux progrès réalisés en **ingénierie métabolique** (développée dans la partie 3), où les techniques sont aujourd'hui très au point pour concevoir et construire de nouveaux micro-organismes. Les chercheurs sont en effet dotés de nouveaux outils, en particulier informatiques : on peut aujourd'hui modéliser les voies métaboliques de

2. La technologie dite de l'ADN recombinant est largement utilisée dans des recherches en biotechnologie, où des molécules d'ADN provenant de plusieurs sources sont clonées, par exemple pour être exprimées dans des cultures cellulaires qui vont synthétiser des protéines d'intérêt (par exemple thérapeutique).

manière très approfondie et les optimiser *in silico* de manière à voir sur ordinateur les effets des productions de composés d'intérêt, comme nous allons le décrire dans le paragraphe 6.1. Cette modélisation métabolique aboutit ainsi à une véritable ingénierie des micro-organismes pour les transformer en « usines cellulaires » (biologie de synthèse).

Grâce à ces nouveaux outils, la recherche connaît une évolution tellement importante que l'on est, notamment, en train de dépasser la loi de Moore pour l'informatique dans le domaine du séquençage de l'ADN et de sa synthèse (Figure 3). Très récemment a été annoncée par des fabricants la mise sur le marché de deux machines de séquençage d'ADN pour fin 2012 qui vont permettre de séquencer des génomes

humains en un jour pour 1000 dollars... Quelques années plus tôt, le biologiste américain Craig Venter avait séquencé le premier génome humain en plus de cinq ans, avec un coût de trois milliards de dollars. On réalise que l'évolution a été extraordinaire, puisqu'aujourd'hui on se demande même s'il ne vaut pas mieux re-séquencer des génomes, plutôt que de stocker systématiquement d'énormes quantités de données dans un ordinateur. Le prix du séquençage diminue tellement que cela devient facilement envisageable.

Dans le même temps, le prix de la synthèse purement chimique de gènes diminue également de manière très significative. Ainsi, même dans des laboratoires qui sont en pénurie de crédits de fonctionnement, on peut aujourd'hui se permettre de

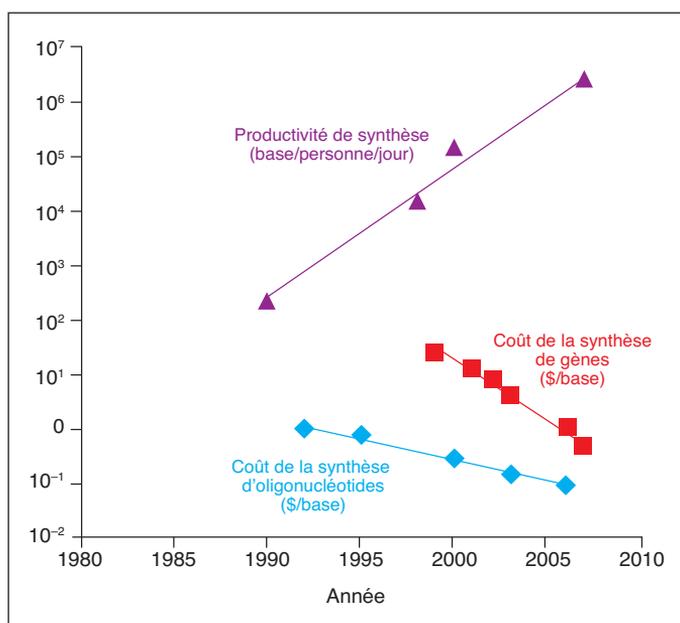


Figure 3

Productivité de la synthèse d'oligomères (fragments d'ADN) et coûts des oligomères et gènes.

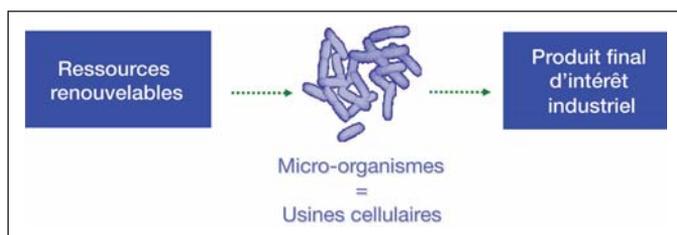


Figure 4

L'ingénierie métabolique, ou comment concevoir de nouveaux micro-organismes comme usines cellulaires ?

commander des gènes au lieu de les bricoler avec des enzymes de polymérisation !

Avec ces outils à disposition des chercheurs, où en est aujourd'hui la recherche en ingénierie métabolique ?

3 L'ingénierie métabolique

3.1. Les enjeux pour développer l'utilisation de carbone durable

L'ingénierie métabolique est un outil essentiel pour les biotechnologies blanches, car c'est elle qui permet, à partir de ressources renouvelables, de fabriquer des produits d'intérêt industriel, et en particulier des intermédiaires pour la chimie. Il s'agit donc de *transformer les micro-organismes en véritables usines cellulaires* capables de fabriquer tel ou tel composé qui nous intéresse (Figure 4).

Le souci majeur des industriels est de développer des procédés dans des conditions économiquement viables. Le problème se pose notamment dans le cas de certains biocarburants. Il s'agit d'assurer un rendement en carbone qui soit aussi élevé que possible, de maximiser la vitesse de production, ainsi que les concentrations des composés

dans les milieux de production, de manière à diminuer les coûts de purification en aval. Notons, en particulier, que les réactions s'effectuent quasiment toujours dans des milieux aqueux, ce qui implique des coûts élevés lorsqu'il faut évaporer et traiter l'eau.

3.2. Une démarche cyclique et itérative

L'ingénierie métabolique est pratiquée dans une démarche cyclique et itérative, avec pour objectif une amélioration dirigée de la synthèse d'un produit par la modification de voies métaboliques existantes ou l'introduction de nouvelles voies métaboliques.

Pour cela, on va modéliser les flux métaboliques grâce à l'outil bioinformatique (abordé dans la partie 5), puis construire le micro-organisme dans lequel on aura ajouté de nouveaux **catalyseurs enzymatiques** (partie 6) pour catalyser les différentes étapes nouvelles de ce métabolisme, et dont on aura éventuellement enlevé des étapes gênantes qui diminueraient le rendement de carbone. Puis on va tester ces nouvelles souches dans un fermenteur et mesurer les flux métaboliques. Si les résultats sont satisfaisants, on passera à l'échelle réactionnelle supérieure, et, dans le cas contraire, on repartira de manière itérative dans une analyse informatique, et ainsi de suite. Ainsi, de manière progressive, on adaptera un micro-organisme à ce rôle d'usine cellulaire recherché (Figure 5).

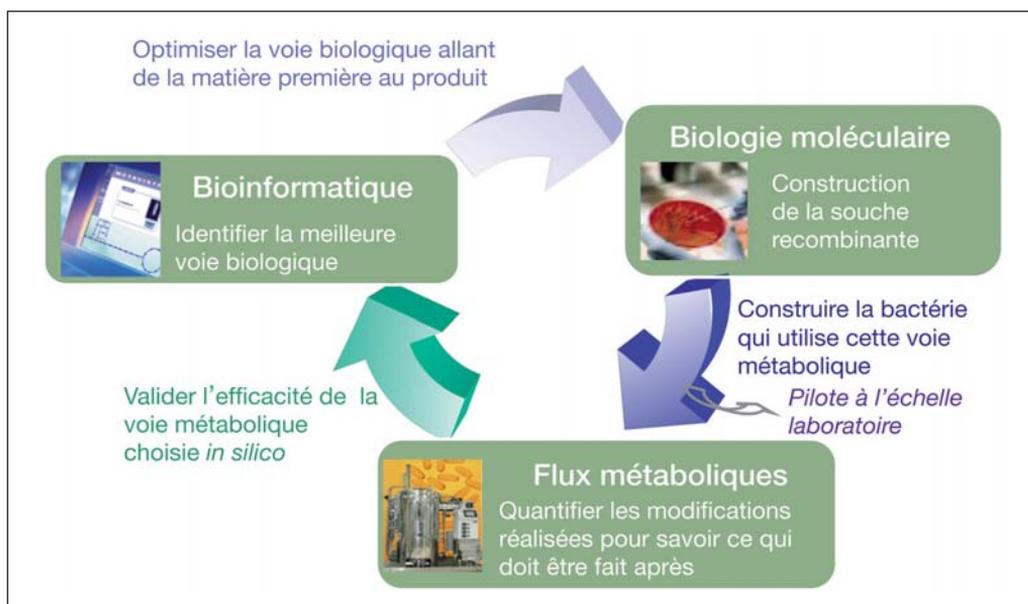


Figure 5

Outils et stratégie de l'ingénierie métabolique : du produit à la bactérie, une démarche cyclique et itérative alternant prédictions informatiques et expériences *in vivo* dans des cultures cellulaires.

3.3. Un exemple d'ingénierie métabolique dans les biotechnologies rouges : synthèse d'un antipaludéen, l'artémisinine

Citons un exemple d'ingénierie métabolique, celle développée par la société Amyris, fondée en 2004 par le pro-

fesseur Jay D. Keasling et ses quatre chercheurs post-doctorants de l'Université de Berkeley. Cette société s'est intéressée à l'artémisinine, molécule naturelle aux propriétés antipaludéennes synthétisée par l'armoise (*Figure 6*) selon la voie de biosynthèse bien connue du mévalo-

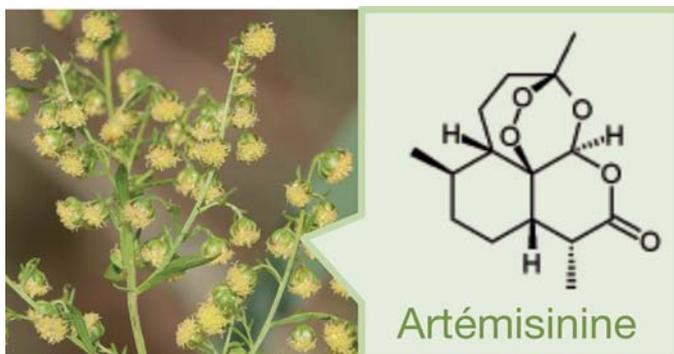


Figure 6

L'artémisinine est un antipaludéen issu de l'armoise. Grâce à l'ingénierie métabolique et aux connaissances de la chimie de biosynthèse de cette molécule par la plante, il a été possible de développer un procédé pour synthétiser dans un bioréacteur jusqu'à plusieurs dizaines de g par litre de milieu de culture (alors que la concentration initiale avant optimisation était de 1 µg par litre).

nate (décrite dans le **Chapitre de M. Rohmer**).

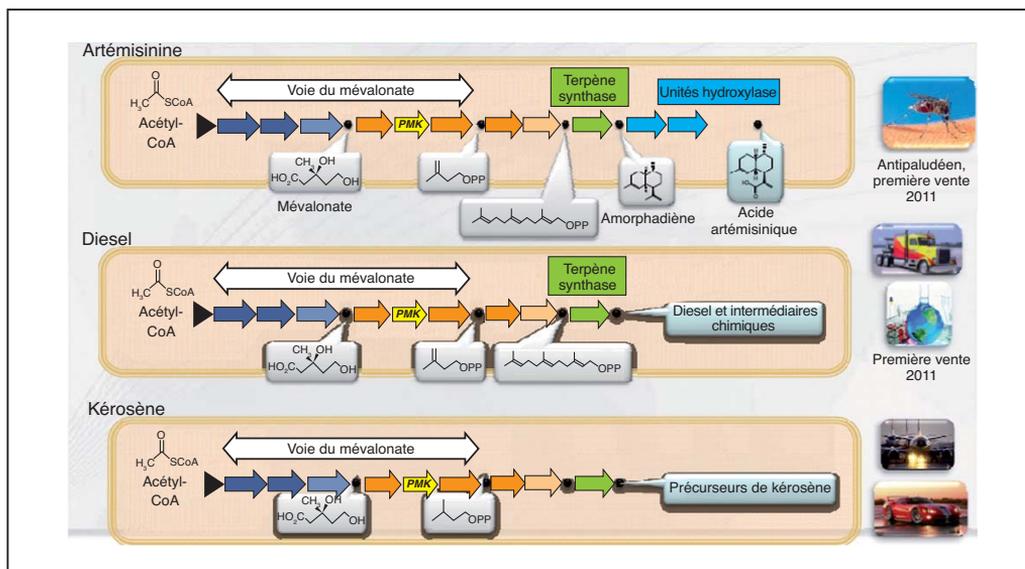
Comme dans le cas de nombreuses molécules thérapeutiques naturelles, telles que le taxol (voir le **Chapitre de F. Guéritte**), sa concentration dans la plante est très faible, ce qui empêche d'envisager son extraction industrielle. L'équipe de Jay D. Keasling a donc utilisé la voie du mévalonate afin d'accéder à l'acide artémisinique, précurseur de l'artémisinine, grâce à un clonage dans une bactérie *Escherichia coli*, puis dans une levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui s'est chargée de réaliser cette biosynthèse à grande échelle, au cours des années 2004-2006.³ Pour cela, l'équipe a bénéficié d'un financement la Fondation Bill et Melinda Gates à hauteur de quelques centaines de millions de dollars pour la société Amyris. Cela a permis de mettre au point ce procédé, qui a alors été licencié à Sanofi où il est actuellement développé à l'échelle industrielle.

3.4. Un transfert réussi des biotechnologies rouges aux blanches

Suite à ce succès de synthèse de l'acide artémisinique, la société Amyris a recruté John Melo, ancien président de BP aux États-Unis, puis s'est

installée au Brésil, pays bien connu pour sa production à bas prix de sucre (canne à sucre). Elle y a alors exploité le sucre, non pas pour produire de l'acide artémisinique, mais pour utiliser cette même voie du mévalonate en modifiant les dernières étapes afin d'accéder à une autre molécule intéressante : le farnésène. Ce triterpène (molécule à quinze carbones, voir le **Chapitre de M. Rohmer, Encart « Dans la famille des isoprénoides »**) peut être hydrogéné (voir la partie bleue de la **Figure 7**) pour former le farnésène, qui se trouve être un excellent substitut du diesel. Il est peut être utilisé pour faire ce qu'on appelle un « drop-in », c'est-à-dire qu'il peut remplacer directement le diesel en le versant dans le réservoir d'une automobile sans problème d'adaptation. Le projet est actuellement développé de manière conséquente, avec la visée de la construction de deux usines de 150 millions de litres de farnésène de capacité ! Cette industrialisation, initialement annoncée pour 2012 avec la production de 40 à 50 millions de tonnes de produit, a été récemment retardée, et la mise en place d'associations avec Total et Cosan pour la production industrielle a été annoncée. La même voie peut d'ailleurs être utilisée pour accéder également à de nombreux autres composés, dont on peut adapter les caractéristiques pour en faire non pas du diesel, mais un substitut du kérosène. Ainsi il a été possible d'utiliser un même procédé issu d'une ingénierie métabolique pour développer un produit du

3. Ro D.-K., Paradise E.M., Ouellet M., Kisher K.J., Newman K.L., Ndungu J.M., Ho K.A., Eachus R.A., Ham T.S., Kirby J., Chang M.C. Y., Withers S.T., Shiba Y., Sarpong R., Keasling J.D. (2006). Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast, *Nature*, **440** : 940-943.



domaine des biotechnologies rouges (santé), tout autant que pour celui des biotechnologies blanches pour faire du biocarburant (**Figure 7**).

Pour développer cette plateforme technologique, le recours à toute une série de robots a été essentiel pour pouvoir construire des micro-organismes (ici, des levures) en les optimisant dans un premier temps au niveau de microplaques à 96 puits, avant de passer au petit fermenteur, suivi d'un fermenteur de 5 m³, puis pour terminer à grande échelle (**Figure 8**). Cette démarche cyclique (voir aussi la **Figure 5**) sera détaillée dans le paragraphe 6.1.

3.5. L'ingénierie métabolique pour produire des intermédiaires et des polymères

Les progrès en ingénierie métabolique ont également donné lieu à de nombreux développements industriels

en biotechnologies blanches pour accéder à des intermédiaires chimiques variés, tels que des polymères, à partir de sources végétales. Citons la synthèse de l'acide lactique par la société Cargill/NatureWorks, pour fabriquer de l'acide polylactique (PLA, « polylactic acid ») dans la production de fibres textiles. De son côté, DuPont a développé avec Genencor et Tate&Lyle la production de l'isobutanol et du 1,3-propanediol (PDO), ce dernier étant un monomère précurseur de fibres polyesters Sorona®. Les sociétés Cargill et Novozymes fabriquent quant à elles de l'hydroxypropionate pour le même type d'application. GoodYear et Genencor développent un procédé d'accès à l'isoprène, molécule à la base des isoprénoïdes, ces composés naturels bien connus aux propriétés biologiques souvent intéressantes [décrits dans le **Chapitre de M. Rohmer**]. Dans le même

Figure 7

Une plateforme technologique développée par la société Amyris pour la production de multiples produits.

Figure 8

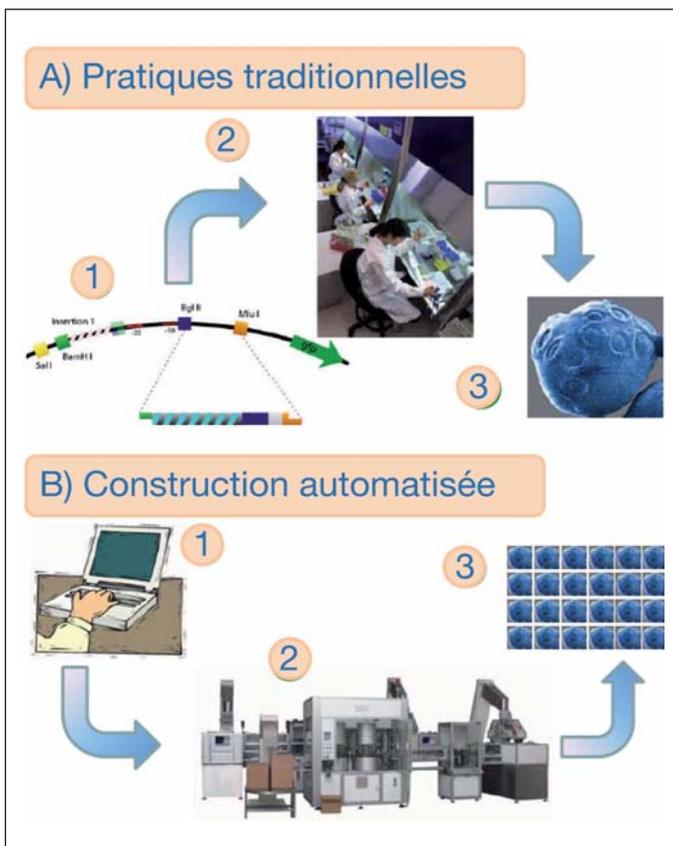
La standardisation et l'automatisation a permis aux biotechnologies de faire un bond considérable dans le développement de procédés d'ingénierie métabolique.

A) pratiques traditionnelles (relativement lentes, chères et propices aux erreurs :

1) planification de main-d'œuvre, 2) constructions à la main ; 3) obtention de 40 souches par cycle (cycle de 4 semaines avec 4 équivalents temps plein).

B) Construction

automatisée (rapide, peu cher et fiable) : 1) assisté par ordinateur ; 2) plateforme de conception robotique ; 3) obtention de 5000 souches par cycle (cycle de 6 semaines avec 4 équivalents temps plein).



créneau, le groupe Michelin a signé des accords avec la société Amyris. Par ailleurs, Roquette (voir le **Chapitre d'après la conférence de C. Rupp-Dahlem**) produit de l'acide succinique avec DSM, et de la méthionine avec Metabolic Explorer, une jeune start-up dynamique qui est en train de construire une usine en Malaisie pour faire du 1,3-propanediol. Genomatica s'intéresse de son côté au 1,4-butanediol pour faire du butadiène, etc. (**Tableau 2**). Ainsi l'industrie des intermédiaires chimiques bio-sourcés est en plein essor, avec à la fois des usines en construc-

tion et des usines qui tournent actuellement pour fabriquer ces produits.

Les recherches en ingénierie métabolique conduisent au domaine de la biologie de synthèse, dont l'objet est la construction d'usines cellulaires microbiennes.

4 La biologie de synthèse

4.1. Où en est la recherche ?

Dans ce domaine, il faut évoquer les recherches du biologiste américain Craig Venter, qui a publié en juillet 2010 ses travaux sur la synthèse d'un

Tableau 2

L'ingénierie métabolique dans les entreprises de la chimie.

Entreprise	Produits développés par ingénierie métabolique			
Cargill/ NatureWorks	acide lactique pour les polymères (acide polylactique)			
DuPont	1,3-propanediol		isobutanol	
Cargill/ Novozymes	3-hydroxypropionate			
GoodYear – Genencor	isoprène			
DSM/ Roquette	acide succinique			
Metabolic Explorer	méthionine	acide glycolique	1,3-propanediol	Butanol
Genomatica	1,4-butanediol			

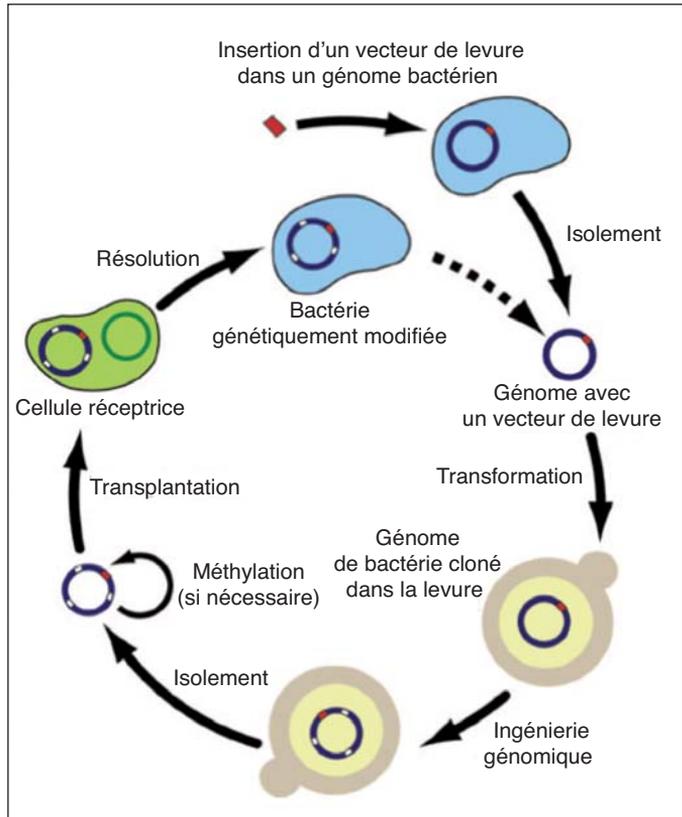
chromosome totalisant plus de 1 million de paires de bases mises bout à bout chimiquement – chromosome où il a d'ailleurs signé son propre nom grâce à une séquence de nucléotides ! –, et qu'il a introduit dans une bactérie (*Mycoplasma capricolum*) pour la transformer en une autre (*Mycoplasma mycoides*). Il a ainsi pu faire vivre pour la première fois un micro-organisme comportant un chromosome synthétique... de là à dire qu'il a créé du vivant, nous en sommes encore loin, voire très loin (**Figure 9**).

4.2. Le vivant pose encore un défi aux biologistes

L'un des rêves de Craig Venter serait de créer ce qu'on appelle le « bug minimal », c'est-à-dire le micro-organisme le plus simple possible, la cellule minimale qui contiendrait juste l'information génétique nécessaire pour se reproduire et dans laquelle on pourrait injecter à volonté telle ou telle voie métabolique qui permettrait d'accéder à tel ou tel composé chimique... Cela relève bien encore du « rêve », car le vivant pose encore des

Figure 9

Travaux de J. Craig Venter, où un chromosome a été entièrement synthétisé chimiquement pour être inséré dans une bactérie.



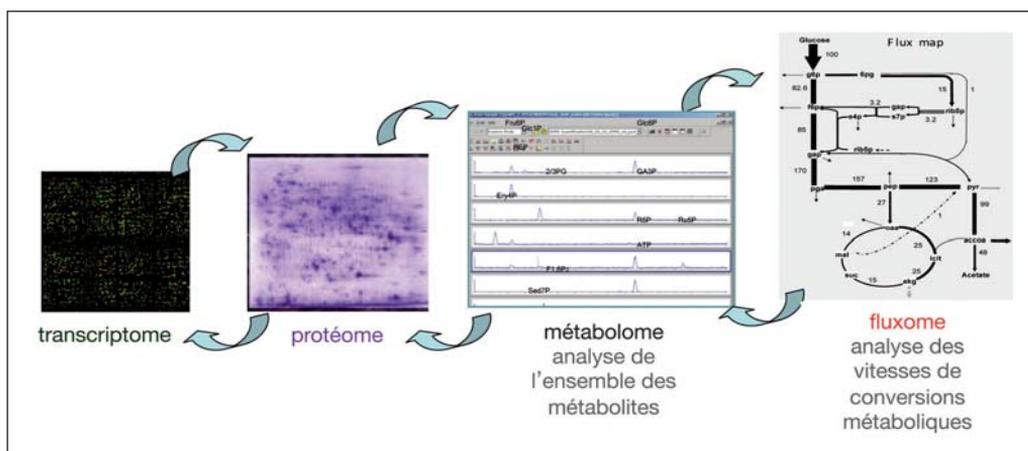
mystères à l'homme, et ne se comporte pas complètement comme on le souhaiterait. Le vivant possède certes une information génétique, mais il dispose aussi de tout un codage de la régulation du contrôle de cette information, que l'on ne connaît pas encore complètement. Il y a quelques années encore, personne ne parlait de micro-ARN ni d'épigénétique⁴ ; aujourd'hui, on sait qu'il existe un contrôle très concret et précis de l'ex-

pression du patrimoine génétique, à la base d'ailleurs d'un certain nombre de pathologies. Les biologistes ont donc là un défi de taille à relever.

Les recherches sur la compréhension du vivant sont depuis la fin du XX^e siècle menées selon l'approche globale des « -omiques »⁵, qui se combinent avec les modélisations réalisées en ingénierie métabolique. En amont, la génomique consiste en l'analyse du patrimoine génomique

4. À propos des phénomènes de régulations épigénétiques, voir *La chimie et la santé, au service de l'homme*, coordonné par M.-T. Dinh-Audouin, R.A. Jacquesy, D. Olivier et P. Rigny, EDP Sciences, 2010.

5. À propos des « -omiques », voir *La chimie et la santé, au service de l'homme*, chapitre de D. Mansuy, coordonné par M.-T. Dinh-Audouin, R.A. Jacquesy, D. Olivier et P. Rigny, EDP Sciences, 2010.



(l'ADN), puis la transcriptomique s'intéresse à l'expression de ces gènes (à travers l'ARN), la protéomique analyse les protéines dans une cellule, et la métabolomique couplée à la fluxomique étudient les métabolites et leurs flux dans l'organisme, et vont être l'outil-clé de la biologie de synthèse pour construire des usines cellulaires, comme nous allons le voir à présent (voir la [Figure 10](#)).

de ces gènes, et les molécules chimiques issues du métabolisme réalisé par ces protéines, on va pouvoir mettre en évidence des flux : c'est l'objet de la **fluxomique** ([Figure 10](#)). Cette étude intégrative, considérant l'organisme vivant dans sa globalité, doit permettre de répondre à la question : dans quelle voie métabolique vont les flux de carbone, dans telle ou telle condition de culture ?

Figure 10

La métabolomique, une approche intégrative dédiée à l'analyse du métabolisme à l'échelle du système biologique.

5 La métabolomique et la fluxomique

5.1. Définitions

La **métabolomique** s'intéresse à l'étude des molécules chimiques qui se trouvent dans les cellules vivantes à un temps donné. L'étude peut aussi bien concerner une cellule de notre corps qu'une cellule de levure dans un fermenteur.

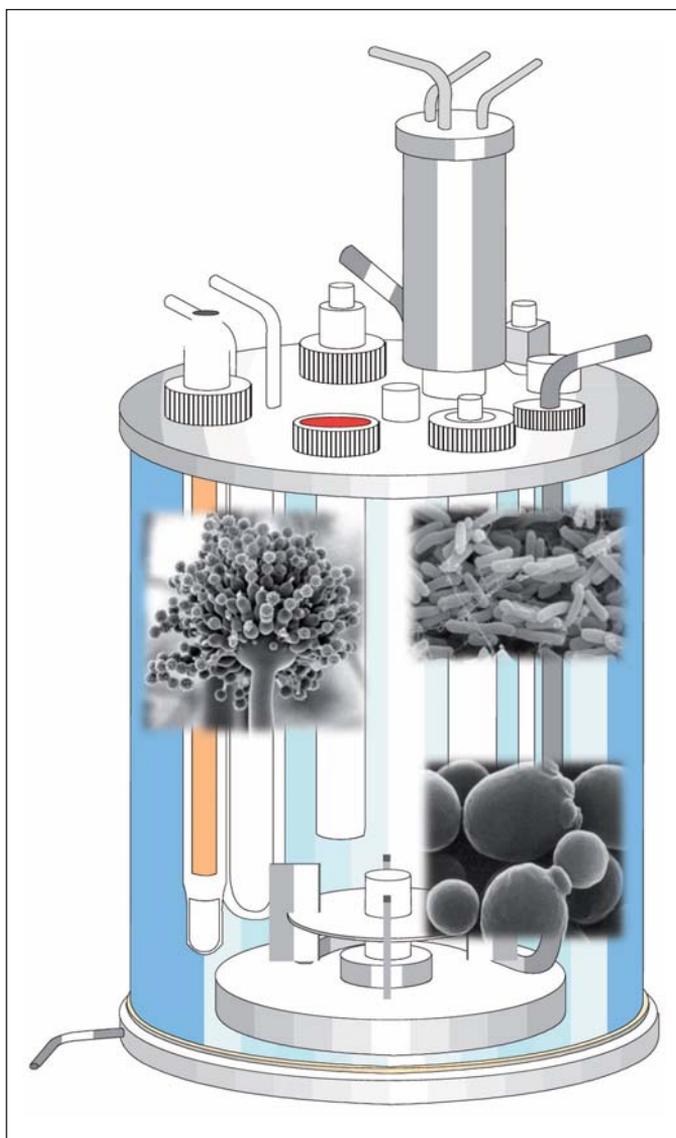
En analysant conjointement, et à des temps différents, l'expression des gènes, les protéines synthétisées à partir

5.2. Développement de bioprocédés : les usines cellulaires

Les connaissances des micro-organismes et de leur physiologie issues des études de la métabolomique vont permettre de concevoir des usines cellulaires, ces micro-organismes qui synthétisent des molécules d'intérêt pour la recherche et l'industrie. Pour cela, les biologistes disposent de fermenteurs dans lesquels ils mettent en œuvre ces micro-organismes dans des conditions confinées et contrôlées au niveau du pH,

Figure 11

Un fermenteur, pour mettre en œuvre de manière confinée et contrôlée des micro-organismes pour la synthèse de molécules par culture microbienne.



de la température, du milieu nutritif, etc., conditions qu'ils optimisent afin d'orienter la culture de ces micro-organismes en vue de la production souhaitée (Figure 11).

Dans le cadre du développement de micro-organismes comme usines cellulaires, les biologistes mettent éga-

lement au point de nouvelles enzymes comme catalyseurs biologiques dans leurs procédés de production : c'est l'objet de l'ingénierie enzymatique.

6 L'ingénierie enzymatique

Les enzymes sont des protéines jouant un rôle-clé de catalyseurs dans les réactions du métabolisme. Pour cela, les chercheurs disposent aujourd'hui de toute une série de technologies et de méthodologies novatrices qui permettent de développer de nouveaux catalyseurs biologiques, qui pourront être utilisés soit de manière isolée, soit en les intégrant dans les voies métaboliques mises au point. Deux méthodologies sont aujourd'hui couramment développées : la **métagénomique**, pour augmenter l'accès à la biodiversité et isoler les gènes codant pour des biocatalyseurs originaux, et l'**ingénierie moléculaire** par mutagenèse dirigée ou par approche combinatoire et criblage à haut débit (évoquée au paragraphe 6.1).

6.1. Les sources d'enzymes

Autrefois, seules les protéines issues directement de la nature étaient utilisées dans les procédés de catalyse enzymatique. C'est ainsi qu'ont été développées dans les années 1960 les célèbres « enzymes glutons » produites par des bactéries et utilisées dans les détergents. Puis la bioinformatique a été introduite dans les années 1970-1980 suite au développement

des techniques de diffraction de rayons X, qui ont permis d'accéder à la structure tridimensionnelle des enzymes. Les chercheurs ont alors commencé à faire de la mutagenèse dirigée, c'est-à-dire à modifier les enzymes en changeant un acide aminé bien précis dans leur structure, par la modification d'une séquence bien précise de l'ADN qui code pour cet acide aminé ; puis l'on observe les conséquences de ce changement. Au bout de plusieurs essais, on finit par savoir améliorer les enzymes en les rendant par exemple plus spécifiques, plus thermostables, etc.

Cette révolution qualitative a bénéficié d'un saut quantitatif dans les années 1990 grâce au développement de **techniques combinatoires** automatisées. Il s'agit dans un premier temps de constituer une banque de gènes à partir d'un gène de départ naturel, que l'on copie une multitude de fois en introduisant à chaque fois des erreurs de copie, par mutagenèse aléatoire. On constitue ainsi une librairie de variants qui peut contenir jusqu'à dix mille, voire un million de gènes ou plus ! Ces gènes sont clonés dans des vecteurs et exprimés dans des cellules hôtes. Des robots se chargent ainsi de tester tous ces gènes dans des cultures cellulaires où ils vont conduire à la synthèse de nouvelles enzymes ; des cycles successifs de tests, dits de criblage à haut débit, sont réalisés en parallèle à des tests par modélisation moléculaire informatique (criblage virtuel), au bout desquels les enzymes vont être triées afin de sé-

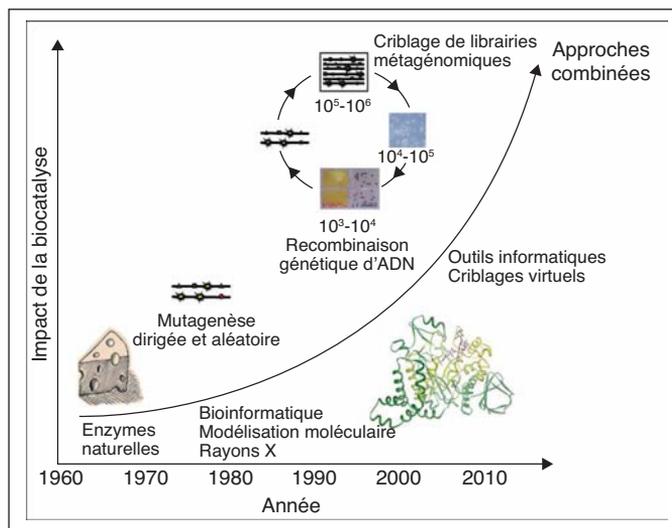


Figure 12

Des enzymes « naturelles » à l'approche combinée rationnelle/aléatoire, en passant par la mutagenèse dirigée : à la recherche de l'enzyme « parfaite ».

Cette approche part d'un gène identifié à l'origine d'une enzyme dans la nature, caractérisée au plan structural grâce aux analyses par diffraction de rayons X. Ce gène est copié de multiples fois avec des erreurs (mutagenèse dirigée et aléatoire), et les copies (bibliothèques de variants) sont testées par criblage, à la fois in vivo (cultures cellulaires) et virtuellement (outils informatiques). La combinaison de ces deux approches, combinatoire et rationnelle, conduit à la sélection d'une enzyme répondant au maximum de critères choisis, voire à créer des enzymes originales.

lectionner les plus efficaces, spécifiques et performantes (Figure 12).

Aujourd'hui, les techniques de la bioinformatique sont très sophistiquées et offrent des moyens de calcul infiniment plus puissants qu'au siècle dernier, permettant aux chercheurs de développer une approche combinatoire et rationnelle, capable aujourd'hui de trouver une aiguille dans une botte de foin ! Un exemple sera décrit plus loin.

Ces sources naturelles des enzymes ont été renouvelées dans les années 1990 : on est

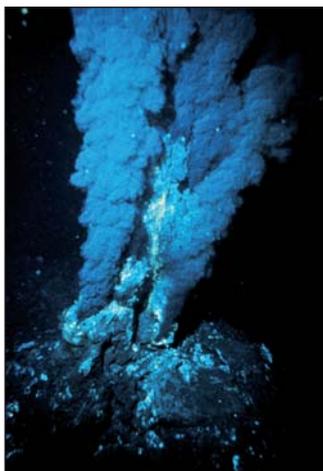


Figure 13

Les sources hydrothermales profondes foisonnent de bactéries extrémophiles, sources d'enzymes intéressantes pour le développement de biocatalyseurs, notamment d'ADN polymérases pour l'amplification génique (PCR).

allé chercher ces enzymes dans des micro-organismes extrémophiles, ces souches microbiennes qui poussent dans des conditions extrêmes, telles que dans les geysers ou dans des fumeurs qui se trouvent à 3000 mètres sous la surface de l'eau⁶. Le liquide qui en sort est à 350 °C et génère la présence de toute une colonie d'archae ; on trouve également des bactéries extrémophiles dans des lacs très salés, des lacs alcalins ou très acides (Figure 13).

Aujourd'hui, l'approche s'est tournée vers les nouvelles techniques de la métagénomique, qui permettent d'accéder à une plus grande diversité de micro-organismes sans avoir à aller les chercher dans les profondeurs sous-marines, et avec des activités enzymatiques inédites, ou qui n'ont du moins pas encore été identifiées dans la nature.

6.2. La métagénomique

6.2.1. Principes

Si nous nous penchons déjà sur notre propre organisme, nous réalisons que nous sommes des fermenteurs très performants, puisque notre corps contient, essentiellement au niveau du microbiote intestinal, dix fois plus de cellules bactériennes que de cellules humaines, et nous avons ainsi mille fois plus de gènes bactériens que de gènes humains ! On en vient donc à se demander si l'humain n'est

finalement pas juste là pour abriter des micro-organismes et faire en sorte qu'ils puissent vivre paisiblement ? Ils sont aujourd'hui en effet suspectés de contrôler notre santé, notre obésité et toute une série d'états inflammatoires qui conduiraient par exemple au diabète, aux problèmes cardiovasculaires, etc. L'explication serait-elle donc que lorsque ces micro-organismes « ne nous aiment plus », ils se débarrasseraient de nous ?

Le côlon est en particulier très riche en micro-organismes (environ mille espèces différentes), et l'on pourrait aller extraire ce qui nous intéresse dans nos recherches, par exemple en vue de dégrader des biomasses ligno-cellulosiques, qui sont constituées de fibres végétales difficiles à scinder. Cela éviterait d'essayer de cultiver ces micro-organismes, ce que l'on ne sait pas faire dans la plupart des cas. On peut donc extraire l'ADN de ces micro-organismes, le couper en grands morceaux, que l'on met dans des vecteurs (cosmides, fosmides) qui vont permettre de les intégrer dans une bactérie ou une levure (par exemple *Escherichia coli*). On réalise de cette manière des banques de cellules que l'on va pouvoir tester par criblage, par exemple en les faisant pousser sur de la cellulose. Or on sait qu'*Escherichia coli* est une bactérie totalement incapable de pousser sur la cellulose ; si l'on observe donc sa croissance, cela indique qu'on lui a apporté l'information génétique qui le permet. Ces études de fonctions en

⁶. Voir aussi *La chimie et la mer, ensemble au service de l'homme*, coordonné par M.-T. Dinh-Audouin, EDP Sciences, 2010.

lien avec l'information génétique s'appellent : la **métagénomique fonctionnelle** (Figure 14).

6.2.2. Exemple de développement en métagénomique

Au cours d'une étude, 156 000 clones ont été cultivés, et leurs activités ont été testées sur des polysaccharides⁷ végétaux. Les tests ont permis d'identifier 311 « touches », c'est-à-dire 311 cas de dégradations de polysaccharides, ce qui a permis d'identifier les enzymes associées comme étant intéressantes en vue d'exploiter la biomasse ; ces clones ont été isolés, puis il a suffi de remonter dans la séquence des gènes correspondants pour connaître la « formule de ces enzymes » (Figure 15).

Cette méthode présente l'intérêt majeur de permettre de cloner de grands morceaux d'ADN, représentant environ 40 000 paires de bases, ce qui représente plusieurs gènes à la fois. Cela peut être très utile quand on veut dégrader des molécules aussi complexes que les hémicelluloses, pour lesquelles on a besoin non pas d'une seule enzyme pour attaquer ces polysaccharides complexes, mais de toute une famille d'enzymes complémentaires qui vont les attaquer de manière synergique. C'est ainsi que l'on tire le bénéfice de familles entières de gènes (opérons) au lieu d'un

7. Un polysaccharide est une macromolécule polymère constituée de l'enchaînement d'unités d'« oses » ou sucres, telles que le glucose, le fructose, le rhamnose, etc.

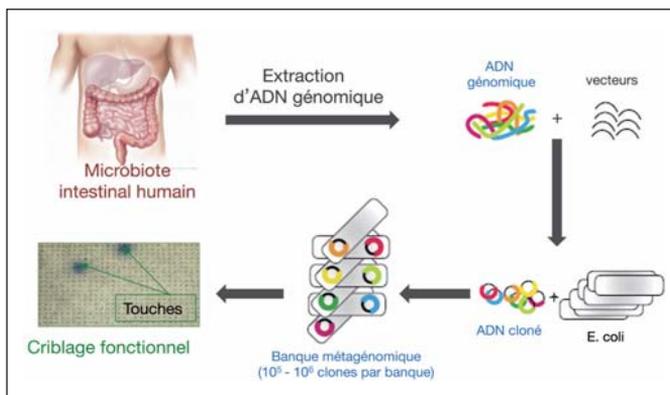


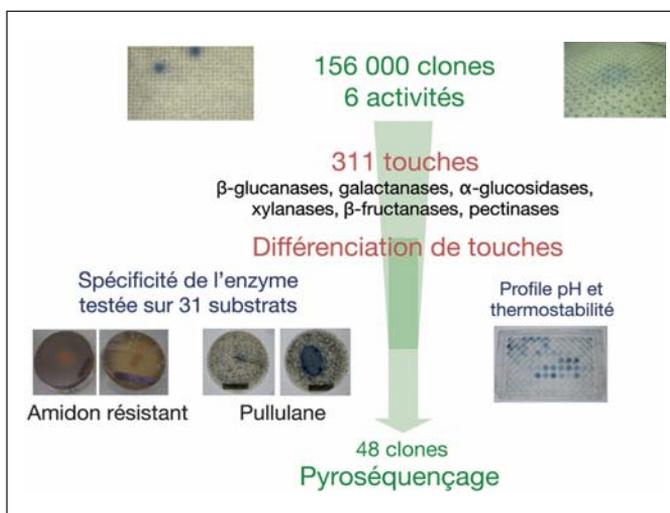
Figure 14

Méthode de la métagénomique fonctionnelle pour accéder à de nouvelles enzymes.

De grands fragments d'ADN sont extraits de bactéries de l'intestin humain, pour être clonés via des vecteurs dans un micro-organisme tel que *E. coli*. On constitue ainsi une banque de micro-organismes nouveaux dont on peut exploiter la biodiversité en vue de découvrir de nouvelles enzymes (Projet ANR PNRA Alimintest).

Figure 15

Méthodologie de criblage fonctionnel sur des clones exprimant des familles de gènes, en vue de dégrader des polysaccharides complexes (amidon, pullulane, etc.). Suite aux tests des 156 000 clones sur 31 substrats, 331 enzymes ont été identifiées, capables de dégrader ces polysaccharides (311 touches). On sélectionne ensuite les enzymes les plus performantes et les plus stables (aux variations de pH, de température...), ce qui conduit à une sélection de 48 clones, pour lesquels il reste à déterminer les séquences d'ADN à l'origine des activités enzymatiques intéressantes (par pyroséquençage).



porte plusieurs groupements hydroxyles (-OH) qu'il faut pouvoir différencier ; d'autre part, le glucose possède deux formes dites anomères en équilibre, dont une seule des deux nous intéresse, et il est souvent difficile de les isoler l'une de l'autre.

Pour résoudre ce problème, l'équipe s'est tournée vers la voie biologique, et l'INSA de Toulouse, qui a recherché des enzymes qui soient capables de réaliser efficacement cette synthèse d'oligosaccharides, en particulier une étape de la synthèse qui pose des difficultés en chimie. N'en ayant pas trouvé, elle est partie d'une enzyme connue, l'amylosucrase, synthétisée par la bactérie *Neisseria polysaccharea*, et dont la structure est parfaitement connue grâce aux analyses par diffraction de rayons X, qui permettent en particulier de savoir de manière précise comment son site catalytique se lie avec des polysaccharides : les modélisations informatiques montrent qu'il se lie notamment avec deux sucres, le glucose et le fructose (dont l'association forme le sucrose) (**Figure 17**).

Avec cette connaissance, on a cherché à remodeler ce site catalytique de sorte qu'au lieu de se lier avec un fructose et un glucose, il se lie de manière régiosélective avec un rhamnose et/ou une *N*-acétylglucosamine, deux des sucres de l'unité de répétition identifiée sur la **Figure 16**, dans la structure du mime des déterminants antigéniques.

Ce remodelage a été possible, encore une fois, grâce au couplage de tests *in vivo* avec l'outil de modélisation bio-

informatique, permettant une ingénierie enzymatique semi-rationnelle : on construit d'abord rationnellement un modèle *in silico*, puis l'on teste *in vivo* selon une approche combinatoire (décrite dans le paragraphe 6.1). Il s'agit d'un véritable travail de mécanicien, où l'on identifie sur le site catalytique de l'enzyme les acides aminés à changer, puis on les remplace en tâtonnant avec plusieurs acides aminés, et l'on observe qu'à certains changements, apparaît une nouvelle activité de l'enzyme. Il se pourrait même que cette activité n'existe pas dans la nature, ou du moins n'y ait pas encore été identifiée.

Cet exemple montre bien comment on peut non seulement créer une nouvelle spécificité enzymatique, mais également l'améliorer, jusqu'à atteindre des efficacités quatre cents fois plus importantes, comme c'est le cas dans cet exemple. À la grande surprise des chercheurs, alors qu'ils s'attendaient à visualiser une structure d'enzyme significativement différente de celle de départ – puisque son efficacité

Figure 17

Modélage de la sous-unité +1 de l'enzyme amylosucrase de Neisseria polysaccharea. La modélisation moléculaire informatique permet de cartographier le site de liaisons important pour la plasticité fonctionnelle de l'enzyme, en vue d'identifier les positions les plus prometteuses pour une modification en faveur d'une reconnaissance, sans interférence avec la liaison avec le saccharose.

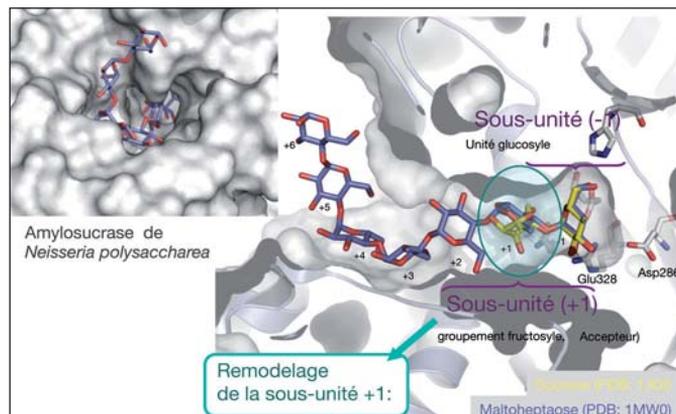
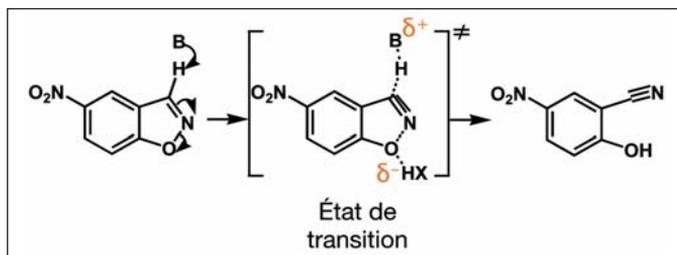


Figure 18

Schéma de la réaction d'élimination de Kemp. La réaction a lieu en passant théoriquement par un état de transition unique qui peut être modélisé par informatique. Au cours de la transformation, une base (B) déprotonne le réactif pour conduire à un état de transition caractérisé par une distribution de charges partielles qui se répartissent entre la base et un acide XH, et qui doit évoluer vers le produit représenté à droite.



est quatre cents fois supérieure –, celle-ci s'est en fait révélée sensiblement identique après cristallisation et analyse par diffraction de rayons X... ce qui relativise la compréhension que nous avons jusqu'à présent du phénomène, et montre qu'il reste encore beaucoup à comprendre sur le fonctionnement des enzymes !

Si bien qu'aujourd'hui, la recherche se penche sur le phénomène de **dynamique moléculaire**, en essayant d'abord de le comprendre par modélisation sur ordinateur, puis expérimentalement. Le défi est de pouvoir suivre en temps réel comment un substrat entre dans un site catalytique, interagit avec, et en ressort transformé en produit. On réalise combien la « magie » de la catalyse enzymatique réside dans le fait que tout se joue dans une certaine dynamique, ce qui s'avère essentiel à comprendre et maîtriser une telle réaction.

6.4. L'ingénierie enzymatique moléculaire pour catalyser des réactions inédites

Un autre exemple montre toute la puissance de l'outil de l'ingénierie enzymatique avec une bonne compréhension du phénomène catalytique au niveau moléculaire. L'équipe

de D. Baker à l'Université de Washington (Seattle) est parvenue à créer des enzymes pour catalyser des réactions qui n'ont jusqu'à présent pas encore été identifiées dans la nature⁸, telle que la réaction d'élimination de Kemp (Figure 18), et les réactions de rétro-aldolisation ou de Diels-Alder.

Pour cela, les chercheurs sont partis de l'état de transition de la réaction, c'est-à-dire l'état non isolable par lequel un composé A doit théoriquement passer, moyennant une énergie d'activation, pour être transformé en composé B. Les conditions de la réaction ont une influence cruciale sur cet état de transition où se trouve le mélange en cours de transformation, en interaction avec son environnement ; ces conditions vont déterminer si la réaction va se réaliser ou non.

L'équipe s'est donc penchée sur les conditions permettant de favoriser cette réaction. Spécialiste de prédiction de structures tridimensionnelles de protéines, D. Baker a mis au point des logiciels (cf. Rosetta) permettant de balayer toutes les structures se trouvant dans des banques de données. Utilisant l'approche semi-rationnelle précédemment décrite (itération modélisation *in silico*, expérimentation *in vivo*), il a ainsi sélectionné des structures de protéines capables de favoriser au mieux la formation de l'état de transition par des

8. Röhrlisberger D., Khersonsky O., Wollacott A.M., Jiang L., DeChancie J., Betker J., Gallaher J.L., Althoff E.A., Zanghellini A., Dym O., Albeck S., Houk K.N., Tawfik D.S., Baker D. (2008). Kemp elimination catalysts by computational enzyme design, *Nature*, **453** : 190-195.

interactions avec les acides aminés de leurs sites catalytiques. Disposant ainsi de « la formule qu'il faut construire », il est remonté à la séquence d'ADN codant pour cet enchaînement d'acides aminés, puis cette séquence a été introduite dans une bactérie qui l'a exprimé et a permis d'obtenir une enzyme qui joue un rôle de biocatalyseur de la réaction de Kemp.

La même approche a été également réalisée avec succès pour d'autres réactions chimiques telle que la réaction de rétro-aldolisation ou encore une réaction de Diels-Alder. Les activités catalytiques des enzymes ne sont pour l'instant pas conséquentes, mais ces premiers résultats sont un début prometteur pour une démarche originale.

Les nouvelles enzymes conçues grâce à l'ingénierie enzymatique vont être les outils des biotechnologies blanches pour réaliser notamment la biosynthèse de molécules d'intérêt industriel. C'est dans cet objectif que se développent les bioraffineries dans le monde entier.

7 Mise en œuvre des enzymes dans les biotechnologies blanches

7.1. Avantages de la catalyse enzymatique

L'utilisation des enzymes dans des réactions biocatalytiques comporte des avantages industriels notables par rapport à certaines réactions chimiques. Ces procédés sont en effet généralement compatibles avec l'environnement pour les raisons suivantes :

- compatibilité de températures et pH ;
- production de sels limitée ;
- pas d'utilisation de solvants ;
- utilisation de membranes ;
- consommations d'eau et d'énergie réduites.

7.2. Mise en œuvre dans les bioraffineries

Pour mettre en œuvre une enzyme opérationnelle dans des réacteurs de biosynthèse, il faut d'abord éventuellement la purifier, avant de l'immobiliser sur un support (*Figure 19*). La mise au point de

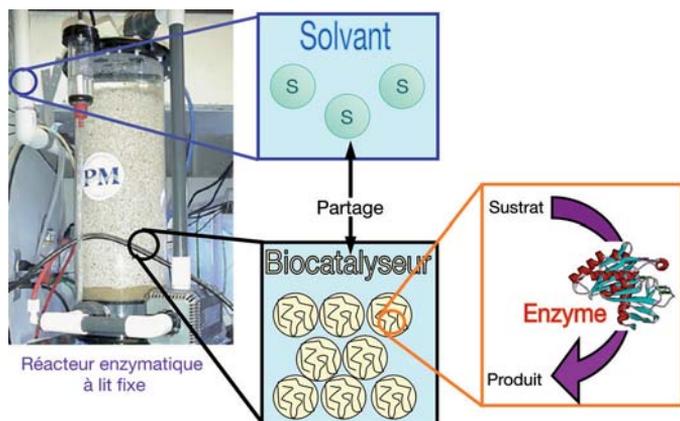


Figure 19

Immobilisation d'enzymes (biocatalyseur) dans un réacteur à lit fixe. Il faut optimiser l'enzyme aux niveaux moléculaire (nanomètre), microscopique (support) et macroscopique (milieu réactionnel),

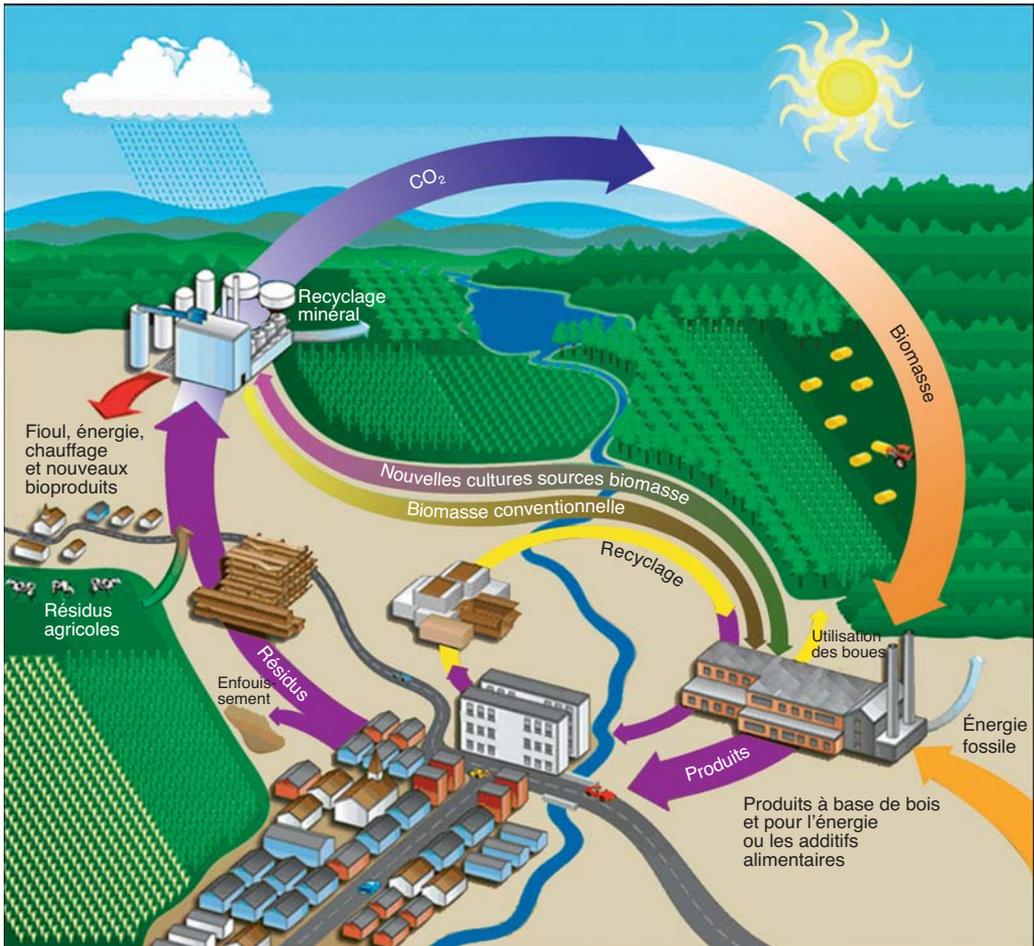


Figure 20

Schéma du principe de fonctionnement d'une bioraffinerie : une démarche systémique, intégrant les cycles de vie de la matière (carbone...). Les bioraffineries ont pour objet l'exploitation du carbone renouvelable issu de la biomasse, en prenant en compte les domaines de l'agriculture et de l'industrie. Elles réalisent un « craquage » végétal en vue d'exploiter la plante entière, pour des applications alimentaires et non-alimentaires (intermédiaires chimiques, biocarburant).

ces procédés est notamment le souci quotidien des bioraffineries (Figure 20 et développement en détail dans le Chapitre d'après la conférence de C. Rupp-Dahlem), ainsi que celle des procédés de fermentation.

7.3. Quel horizon pour le carbone renouvelable ?

Aujourd'hui, nous produisons dans le monde moins de 10 % de matières premières bio-

sourcées pour la chimie. Des investissements conséquents sont dédiés à ces développements dans de nombreux pays, et l'Europe s'est fixée pour objectif de passer les 15 % en 2020 (Encart : « Des investissements conséquents pour le carbone renouvelable »).

Encore beaucoup de progrès sont attendus pour exploiter les ressources de première et deuxième génération, et des recherches ont déjà en vue l'exploitation de troisièmes

DES INVESTISSEMENTS CONSÉQUENTS POUR LE CARBONE RENOUVELABLE

La compétition internationale

- USA Department of Energy (DOE) : 3 laboratoires de bio-énergie
- Japon, Université de Kobe : 70 millions d'euros
- Belgique, Université de Gand : 21 millions d'euros
- Pays-Bas, Kluiver Center, Bio-Base
- Allemagne : CLIB 2021

Les investissements en France

- BioHub (90 millions d'euros, 6 ans)/AlgoHub (28,4 millions d'euros, 5 ans), Roquette
- Osiris (77 millions d'euros, 8 ans), Soufflet
- OSEO-ISI : Futurol (11 partenaires, 74 millions d'euros dont 30 millions d'euros OSEO, 8 ans)
- Plateforme BioDémo (Bio amber DNP/ARD : acide succinique)
- Pôle de compétitivité IAR (Picardie-Champagne-Ardennes) : 200 millions d'euros

générations, constituées par les micro-algues, par exemple pour la production d'hydrogène comme biocarburant. Il est essentiel, en effet, d'éviter toute compétition avec l'usage de ces mêmes matières premières en alimentation humaine, dans la perspective d'un monde comptant plus de 9 milliards d'humains au milieu du XXI^e siècle.

À Toulouse, un nouveau centre de démonstration préindus-

trielle intitulé « Toulouse White Biotechnology⁹ » vient d'être mis en place avec une trentaine de partenaires. Tous les projets qui sont développés sont accompagnés d'une réflexion bioéthique et de développement durable avec les collectivités territoriales et les pôles de compétitivité. De nombreux investisseurs espèrent pouvoir financer des start-ups à partir de ces recherches.

Valoriser les agro-ressources, une opportunité pour le développement durable

Les nombreux exemples d'ingénierie enzymatique qui ont été décrits montrent bien les progrès considérables en moins de vingt ans dans la compréhension et la conception de biocatalyseurs fonctionnels, grâce à l'utilisation des nouveaux outils à disposition des

9. http://www.inra.fr/presse/lancement_du_projet_toulouse_white_biotechnology

chercheurs : analyse par diffraction de rayons X, séquenceurs d'ADN, modélisation moléculaire par informatique, robots pour le criblage fonctionnel à haut débit, etc.

Ces nouvelles enzymes et ces nouveaux micro-organismes vont permettre aux biotechnologies blanches de se développer à travers le principe des bioraffineries et permettront de renforcer nos compétences à exploiter les molécules complexes issues de la biomasse (protéines, polysaccharides (amidon, cellulose, etc.), lipides, etc.), et de développer nos potentiels d'exploitation du carbone renouvelable.

Ils montrent également, à travers les projets de recherche, l'importance d'allier des compétences multiples, dans des domaines variés : ingénierie métabolique, biologie de synthèse, bioinformatique, analyse chimique, synthèses chimique et biochimique, génie des procédés, etc. Ces travaux pluridisciplinaires contribueront à stimuler de plus en plus la créativité nécessaire pour relever les défis de demain.

Valoriser ainsi les agro-ressources constitue une opportunité à saisir pour le développement durable, en répondant à la définition donnée en 1987 par la Commission mondiale sur l'environnement et le développement dans le rapport Brundland : « *Le développement soutenable [sustainable development] est un développement qui répond aux besoins des générations du présent sans compromettre la capacité des générations futures à répondre aux leurs* ».

Crédits photographiques

Fig. 5 : d'après P. Soucaille, LISBP, INSA Toulouse.

Fig. 9 : d'après Science, août 2009.

Fig. 10 : d'après J.-C. Portais, LISBP, INSA Toulouse.

Fig. 11 : d'après C. Jouve, LISBP, INSA Toulouse.

Fig. 12 : d'après M. Remaud-Siméon, LISBP, INSA Toulouse.

Figs. 14 et 15 : d'après G. Véronèse, LISBP, INRA.

Fig. 15 : référence : 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. (2010). Functional metagenomics to mine the human

gut microbiome for dietary fiber catabolic enzymes, *Genome Res.*, **20** : 1605-1612.

Figs. 16 et 17 : d'après I. André, LISBP, CNRS.

Fig. 17 : reprinted with permission from Champion E., André I., Moulis C., Boutet J., Descroix K., Morel S., Monsan P., Mulard L., Remaud-Siméon M. (2009). Design of α -transglucosidases of controlled specificities for programmed chemo-enzymatic synthesis of antigenic oligosaccharides, *J. Am. Chem. Soc.*, **131** : 7379-7389. Copyright 2012 American Chemical Society.

Fig. 19 : d'après A. Marty, LISBP, INSA Toulouse.