

DES ENZYMES POUR L'INDUSTRIE

Joël Quérellou,
Yannick Guéguen, Georges
Barbier et Jacques Dietrich

Les facultés de résistance des extrémophiles n'ont pas dit leur dernier mot

JOËL QUÉRELLOU, directeur du centre IFREMER de Brest, et **YANNICK GUÉGUEN**, sont chercheurs au laboratoire de biotechnologie des micro-organismes hydrothermaux du centre IFREMER de Brest dont **JACQUES DIETRICH** est le responsable. **GEORGES BARBIER** est chef du laboratoire de caractérisation des micro-organismes marins. (www.Europa.biotech)

*PCR
réaction de polymérisation en chaîne.

Indifférentes au chaud ou au froid, à l'acide ou au sel, les bactéries de l'extrême sont une aubaine pour les industries consommatrices d'enzymes et autres composés organiques. Et pour les chercheurs, qui bénéficient de nombreuses sources de financement.

L'extraordinaire succès de la PCR* est loin de refléter la variété des perspectives industrielles ouvertes par les bactéries extrémophiles (voir notre article p. 34). Leurs facultés de résistance en font des outils prometteurs, parfois déjà exploités, dans des domaines aussi divers que l'agroalimentaire, les lessives, le papier ou l'industrie pharmaceutique. Elles ont investi plusieurs filières traditionnellement fondées sur l'exploitation de produits naturels issus d'organismes vivant dans des conditions « normales » (plantes, animaux, micro-organismes).

Tous domaines confondus, les enzymes et composés organiques issus d'organismes extrémophiles drainent un marché mondial potentiel de 17 milliards de dollars, estime la société américaine

Diversa. Dont 5 milliards pour la filière pharmaceutique. Gain de rentabilité, mise au point de nouveaux produits, réduction de la pollution liée à l'utilisation de produits chimiques, tels sont les atouts escomptés de ces molécules.

Dans le secteur agroalimentaire, on attend beaucoup, par exemple, de bactéries hyperthermophiles du genre *Pyrococcus furiosus*, pour simplifier le processus de conversion de l'amidon en dérivés sucrés (maltose, glucose, fructose). Les enzymes dont l'action combinée assure cette conversion (amylases, pullulanases, glucosidases), interviennent après une étape initiale de solubilisation de l'amidon, à une température supérieure à 100 °C. On dispose déjà, pour cet usage, d'une α -amylase issue d'une bactérie thermophile modifiée par génie génétique pour agir entre 95 et

105 °C. Les chercheurs s'efforcent d'améliorer la rentabilité de ce processus à l'aide d'enzymes qui, en supportant la température de solubilisation de l'amidon, minimiseraient le nombre d'étapes d'ajustement des conditions de pH et de température.



UN FESTIVAL D'APPLICATIONS

ORGANISMES EXTRÊMOPHILES	ENZYMES & COMPOSÉS ORGANIQUES	APPLICATIONS & PRODUITS
Thermophiles 50-110 °C	Amylases Xylanases Protéases adn polymérasés Intéines	Glucose, fructose, édulcorants Blanchiment du papier Production d'acides aminés à partir de kératine, détergents, agroalimentaire Ingénierie génétique
Psychrophiles 0-20 °C	Protéases neutres Protéases, lipases Acides gras polyinsaturés Déshydrogénases	Industrie laitière Additifs pour détergents Industrie pharmaceutique Biocapteurs
Acidophiles pH < 2 Alcalophiles pH > 9	Oxydation des sulfures Cellulases, protéases, amylases, lipases Cyclodextrines Antibiotiques	Désulfuration des charbons et des minerais Additifs de dégradation de polymères pour détergents Stabilisation de substances volatiles Industrie pharmaceutique
Halophiles 3-20% sel	Carotène Additifs de conservation soluble Membranes	Agroalimentaire Industrie pharmaceutique Surfactants pour l'industrie pharmaceutique
Barophiles	Amylases protéases	Agroalimentaire Industrie pétrolière

La première lessive

aux « enzymes gloutons » fut lancée par Lever en 1969. Elle fit peur aux ménagères qui craignirent pour leur linge... (© Modes de Paris, 1969)

Aujourd'hui près de 90 % des lessives contiennent des enzymes (protéases, lipases, amylases), pour une production annuelle de 13 milliards de tonnes. La course aux économies d'énergie se traduit par une évolution des programmes de lavage vers des températures décroissantes et des conditions fortement alcalines. D'où l'intérêt pour des bactéries psychrophiles (qui aiment le froid)⁽¹⁾ et aussi alcalophiles⁽²⁾, comme l'illustre l'introduction récente à grande échelle dans les détergents, par la société Genencor International (Rochester), d'une extrêmoenzyme isolée à partir d'une bactérie alcalophile, la cellulase 103. Pour leur part, les industriels du papier recher-

... chent des produits de substitution des composés chlorés, fortement polluants, utilisés dans le blanchiment de la pâte à papier. C'est pourquoi, les enzymes telles que les xylanases, sont de plus en plus utilisées, les dernières en date étant capables de fonctionner dans des conditions de forte alcalinité et à une température de 70 °C.

Les industriels de la chimie et de la pharmacie convoitent, quant à eux, les extrêmoenzymes pour la biosynthèse de molécules, laquelle tend à remplacer la synthèse chimique. Ces extrêmophiles acceptent en effet de fonctionner dans des solvants non aqueux, qui autorisent des rendements élevés. C'est ainsi que la bioconversion par réactions enzymatiques de l'acide 6-aminopenicillanique (6-APA), un intermédiaire commun à la fabrication de nombreux antibiotiques, ne nécessite plus qu'une seule étape, menée dans des conditions réactionnelles douces, sans autres réactifs que les enzymes et leurs substrats.

philes et hyperthermophiles en divers points du Globe.

Aux Etats-Unis, plusieurs grands organismes de recherche ont développé leur programme sur les extrêmophiles : le Scripps Institute (San Diego, Californie), l'institut océanographique de Woods Hole (Massachusetts), l'Institut national du cancer à Bethesda. La NSF (Fondation nationale des sciences) a lancé en 1998 un appel d'offres de 6 millions de dollars sur la vie dans les environnements extrêmes. D'autres programmes ont été lancés au Japon, impliquant différents organismes de recherche dont le Centre maritime japonais de la science et de la technologie (Tokyo), et les universités de Tsukuba et de Kyoto⁽³⁾.

Du côté des entreprises, Amersham Pharmacia Biotech (Cleveland) développe une phosphatase alcaline thermostable, destinée à être incorporée dans des systèmes non radioactifs de détection de l'activité enzymatique. La société israé-

des micro-organismes. Cette approche comporte des limites, toutes les protéines n'étant pas exprimées.

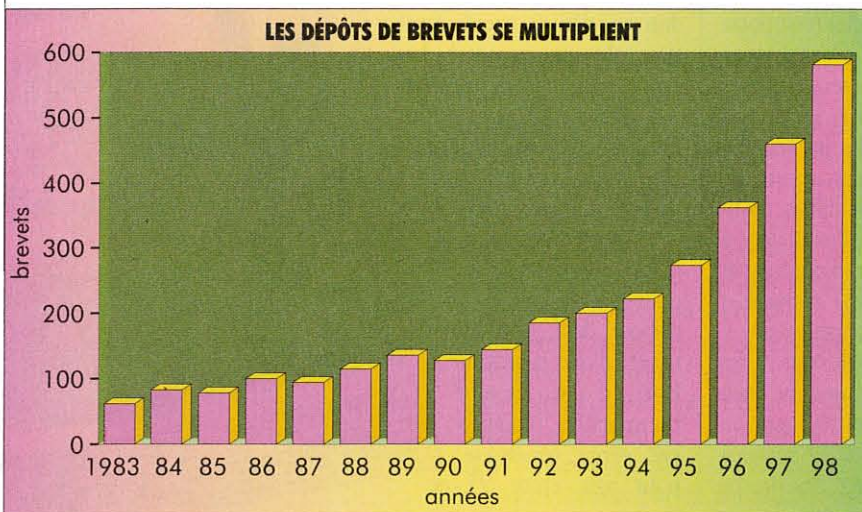
Une nouvelle approche consiste à considérer les milieux extrêmes eux-mêmes comme des gisements de molécules. On estime en effet que moins de 1 % de tous les micro-organismes présents sur le globe ont été cultivés ; il est parfois plus fructueux de récolter des échantillons bruts des milieux extrêmes (eaux, sédiments, roches) pour en extraire l'ADN total, correspondant à la biodiversité génique des espèces bactériennes présentes.

Sur les dix-sept génomes microbiens complètement séquencés, cinq appartiennent à des hyperthermophiles

Le séquençage complet du génome de bactéries et d'archaebactéries offre des perspectives supplémentaires. Sur les dix-sept génomes microbiens complètement séquencés, cinq appartiennent à des hyperthermophiles dont quatre archaebactéries et une bactérie. Et sur plus de cinquante projets en cours, sept concernent des archaebactéries issues de milieux extrêmes. En se fondant sur le degré d'homologie avec des gènes connus, on peut assigner à certaines séquences de ces génomes une probabilité de fonction, et espérer identifier ainsi de nouvelles molécules. Toutefois une proportion variable et parfois non négligeable des génomes de ces bactéries reste indéchiffrable. Ainsi, 70 % des séquences codantes du génome de la bactérie hyperthermophile *Pyrobaculum aerophilum* ne s'apparentent à aucun gène connu. Ces séquences éveillent l'intérêt des investisseurs, plusieurs projets de séquençage sont menés en concurrence sur des micro-organismes très proches : *Pyrococcus abyssi* (France), *P. furiosus* (Etats-Unis) et *P. horikoshii* (Japon).

Malgré l'ampleur des investissements, peu de bactéries extrêmophiles ont encore franchi le pas de l'exploitation industrielle. Isoler une molécule ne suffit pas. Il faut la faire fonctionner dans les conditions souhaitées *in vitro*, souvent bien différentes de celles de la cellule où l'évolution les a sélectionnées. Une technique de plus en plus pratiquée consiste à modifier l'enzyme elle-même, par génie génétique, en forçant *in vitro* l'évolution de l'ADN et en criblant ensuite les gènes les mieux adaptés à l'activité recherchée (techniques d'évolution moléculaire).

J.Q., Y.G., G.B. et J.D. ■



Mis à part les applications de la PCR, le chiffre d'affaires tiré de l'exploitation des extrêmophiles est encore limité.

Mais la croissance des dépôts de 1983 à 1995 a explosé ces trois dernières années.

(Source QPAT-US database)

Comme en témoigne la multiplication des dépôts de brevets, la demande explose. Les travaux de recherche sont soutenus par de nombreux programmes publics ou privés. Lancé en 1997, celui de la Commission européenne intitulé « Extrêmophiles, usines cellulaires » draine 7 millions d'Euros vers cinquante-neuf laboratoires publics et privés. En France, les chercheurs de l'IFREMER et du CNRS en bénéficient. Grâce au *Nautile*, l'exploration des sources hydrothermales situées sur les dorsales à une profondeur de 3 500 à 4 000 m, et crachant une eau à plus 300 °C, a permis de récolter environ deux cent cinquante isolats thermo-

lienne Archaenzyme Ltd. se consacre, elle, à l'isolement et au développement d'enzymes à partir d'archaebactéries, pour diverses applications : ligases à ADN, alcools et glucoses deshydrogénases, protéases. On assiste aussi à des alliances entre des sociétés privées et des organismes publics ayant un accès privilégié à la biodiversité. Ainsi de l'accord passé en 1997 entre le parc de Yellowstone, aux Etats-Unis, et la firme Diversa. En France, un accord du même ordre vient d'être passé entre la société Protéus et IFREMER.

Jusqu'à présent la stratégie de Diversa consistait à puiser dans la biodiversité déjà caractérisée par les microbiologistes, à constituer une collection aussi universelle que possible et à sélectionner, à partir de banques d'expression, les gènes codant pour l'enzyme recherchée. Cela implique de négocier l'achat des droits avec les propriétaires

...ller et al., FEMS Microbiology Reviews, 59, 1996.

...horikoshi, FEMS Microbiology Reviews, 59, 1996.

...Persidis, Nature Technology, 16, 593.