



---

# LES ENZYMES ET LES MICROORGANISMES POUR LA CHIMIE

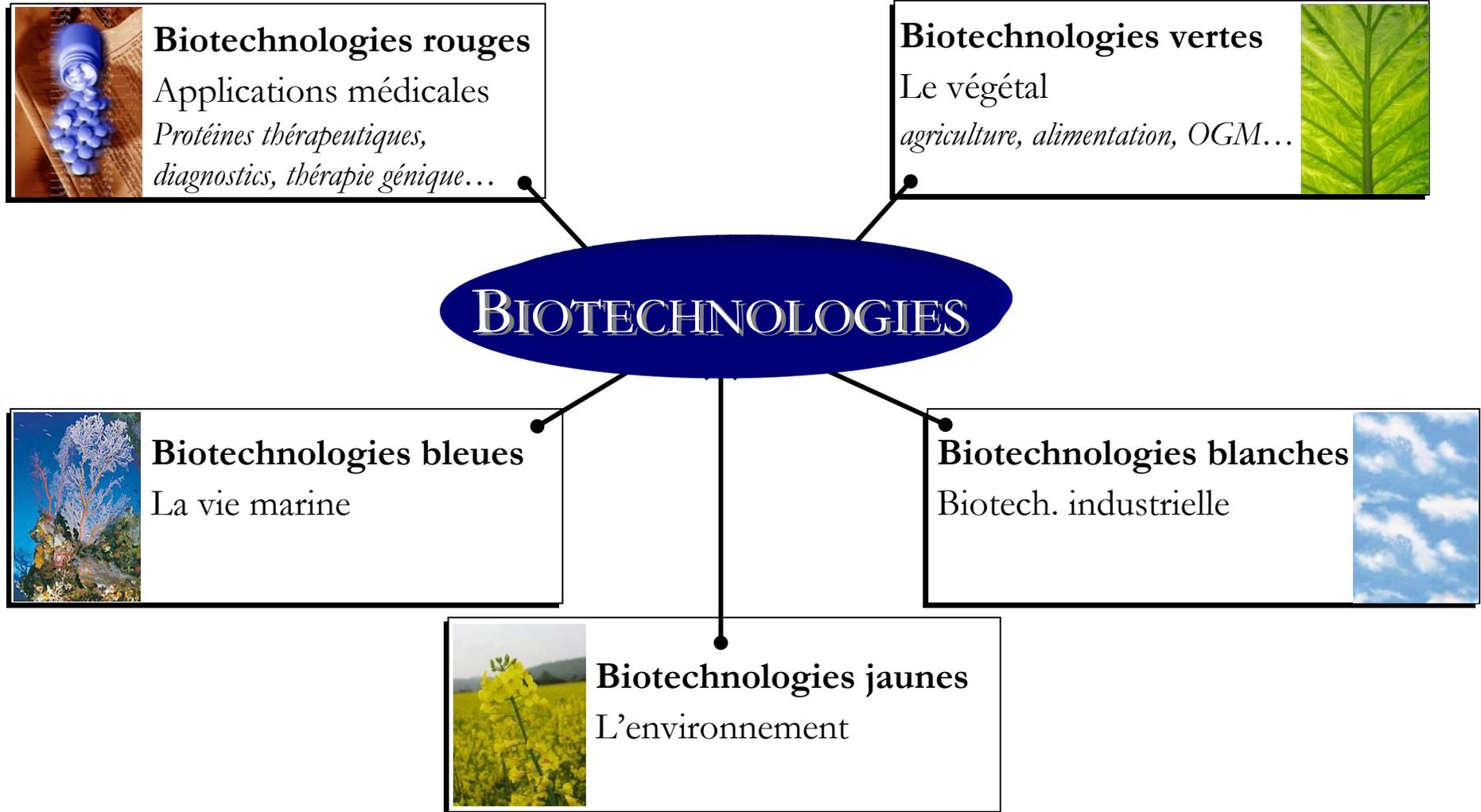
---

*Pierre MONSAN et Gaëtan RICHARD*

Colloque CNRS  
« Chimie pour le développement durable »  
Paris, 2 octobre 2006

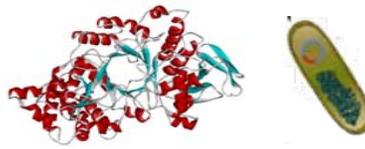


## Les couleurs des Biotechnologies





## Les Biotechnologies BLANCHES



« elles ont pour objet la fabrication de produits chimiques et de bioénergie à l'échelle industrielle par l'utilisation de la biomasse comme matière première renouvelable »





## Les Biotechnologies BLANCHES

### MATIÈRES PREMIÈRES

- maïs
- paille
- sucre
- betterave
- bois
- pommes de terre
- blé
- oléagineux

### PRODUITS FINIS

- produits/intermédiaires chimiques •
  - antibiotiques •
  - acides aminés •
  - enzymes •
- produits pharmaceutiques •
- ingrédients alimentaires •
  - polysaccharides •
  - édulcorants •
  - tensio-actifs •
- matériaux (plastiques) •



### LA RÉALITÉ INDUSTRIELLE

• Bioéthanol	30 MTA
• Isoglucose	15 MTA
• Glutamate	1.5 MTA
• Acide citrique	1 MTA
• Acide lactique	0.25 MTA
• Acrylamide	0.20 MTA
• Antibiotiques	0.03 MTA

Millions Tonnes / An

*Source : Pr. Wim SOETAERT*



### LES PRINCIPES DE BASE

- Utilisation *confinée* de microorganismes et/ou d'enzymes
- Production de composés chimiques, de matériaux, d'énergie à partir de matières premières renouvelables (carbone renouvelable vs carbone fossile)
- Bioraffinerie



### LES NOUVEAUX ORGANISMES / LES NOUVELLES ENZYMES

- **Extrémophiles**

Sources hydrothermales profondes



- **Métagénomique**

Extraction/Clonage de grands fragments d'ADN

→ accès aux microorganismes non cultivés

→ exploiter la biodiversité non explorée pour découvrir de **nouvelles molécules et enzymes**





### LA MÉTAGÉNOMIQUE

- **Aujourd'hui** : plus de **95%** de la diversité bactérienne n'est toujours pas connue

Habitat	Densité cellulaire	Cultivabilité (% des cellules totales)
Eau	$10^4$ - $10^6$	0.00001 - 0.25
Lac mésophile	-	0.1 - 1
Sédiments	$10^6$	0.25
Sol	$10^8$ - $10^9$	0.3
Boues activées	-	1-15

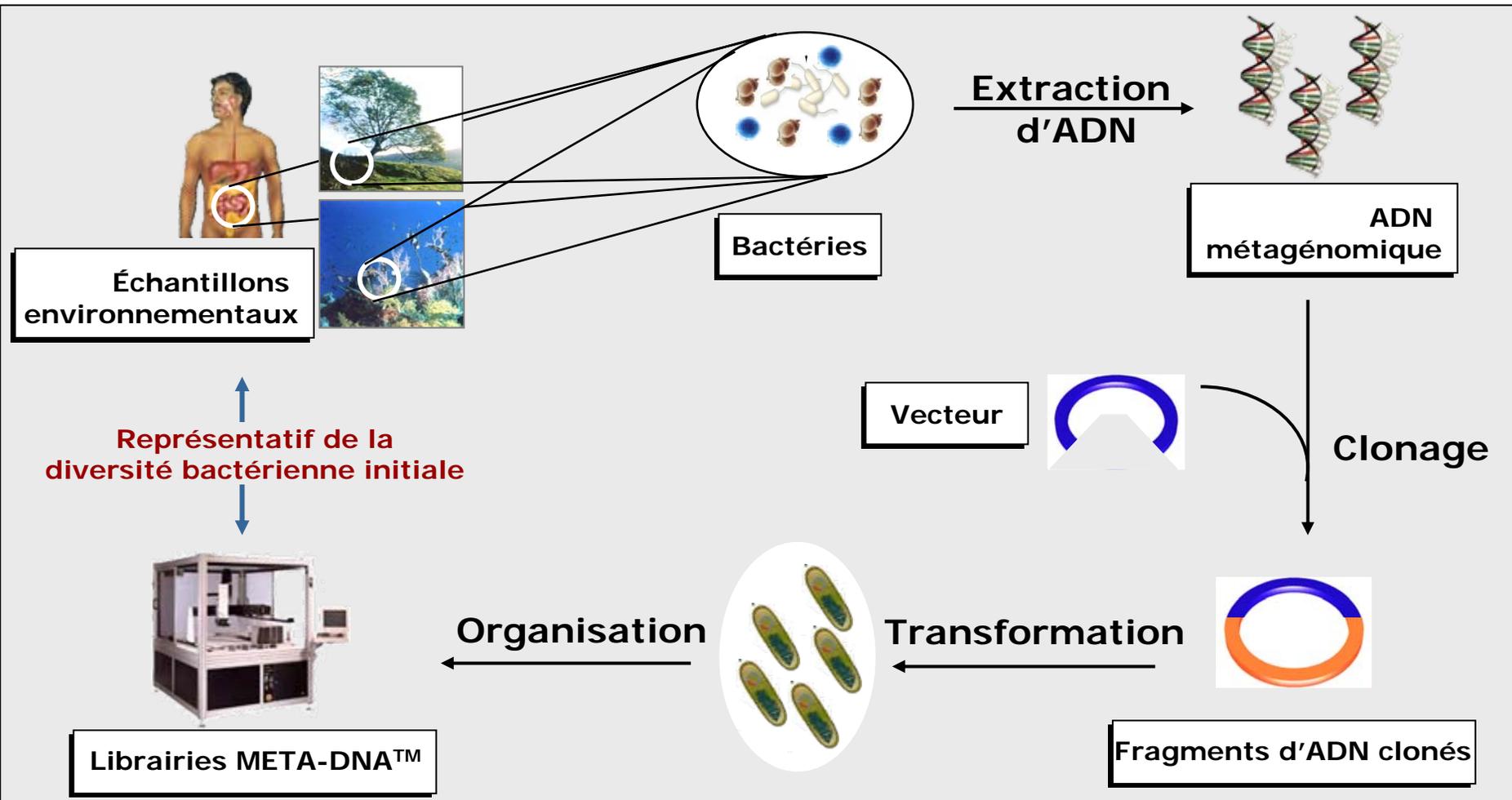
*(Amann et al., 1995 et Whitman et al. 1998)*



# LA TECHNOLOGIE META-DNA™



→ accès à la biodiversité cultivable et non cultivable





### — **OBTENTION DE NOUVEAUX ORGANISMES**

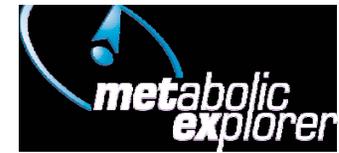
- **Modélisation métabolique**
- **Ingénierie métabolique**

# THREE INTEGRATED PLATFORMS ARE KEY !!

## BIOINFORMATIC



- Tools for the Design of new metabolic pathways
- Tools for the prediction of **metabolic fluxes** and yield
- Tools for **Fluxes optimization** and identification of bottlenecks



Guidelines for modification

Audited data on the new engineered strain

## STRAIN ENGINEERING



- Efficient tools to modulate the expression of chromosomal genes
- Efficient tools for the rapid evolution of enzymes and metabolic pathways

## FERMENTATION and ANALYTICAL



- Fermentation of Engineered strains
- *In vivo* Metabolic fluxes analysis by NMR and GC-MS
- *In vitro* Metabolic fluxes analysis

New engineered strains that have to be evaluated under industrial conditions

Scaling up



## Les Biotechnologies BLANCHES

**Des microorganismes améliorés peuvent produire des produits chimiques avec une diminution de coûts et de meilleures performances**

### QUELQUES EXEMPLES

- **1,3-propanediol** (DuPont, Tate&Lyle)
  - 40 % d'économie
  - 25 % de diminution des coûts de fonctionnement
  - polymère de plus haut poids moléculaire, moins coloré
- **L-méthionine** (Metabolic Explorer)
  - 50 % d'économie
  - 30 % de diminution des coûts de fonctionnement
  - meilleure assimilation par les volailles et les porcs
- **Polyhydroxyalkanoates** (Metabolix, ADM)
  - nouveaux plastiques
  - biodégradable

**... mais ce n'est qu'un début**



### OBTENTION DE NOUVEAUX ORGANISMES

- Modélisation métabolique
- Ingénierie métabolique
- Génomique
- Protéomique
- Métabolomique



### OBTENTION DE NOUVELLES ENZYMES

- par mutagénèse dirigée

Un exemple : l'amylosaccharase (AS)

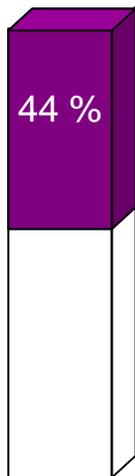
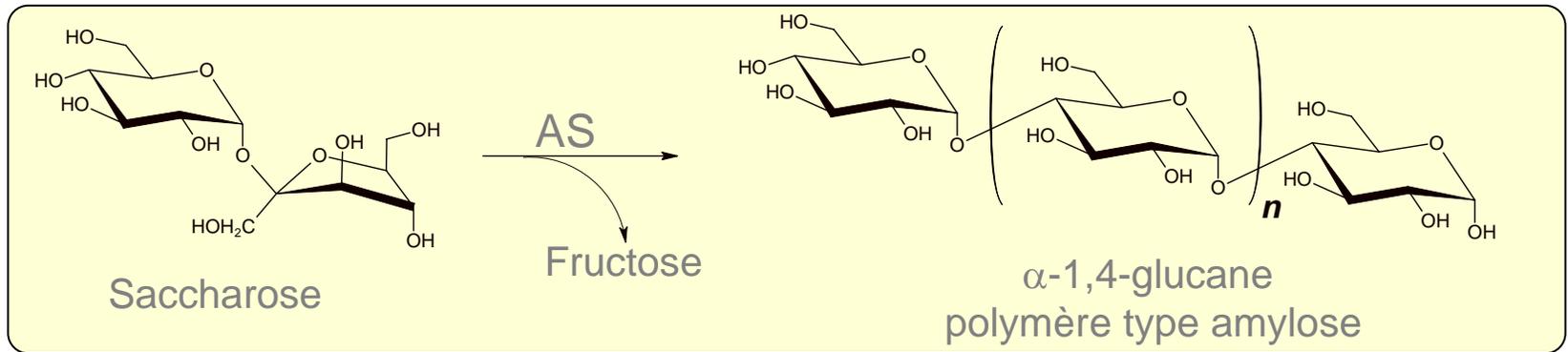
→ enzyme catalysant naturellement la formation d'un polymère de glucose de type amylose à partir de saccharose



## Les Biotechnologies BLANCHES

### DE NOUVELLES ENZYMES

- par mutagenèse dirigée



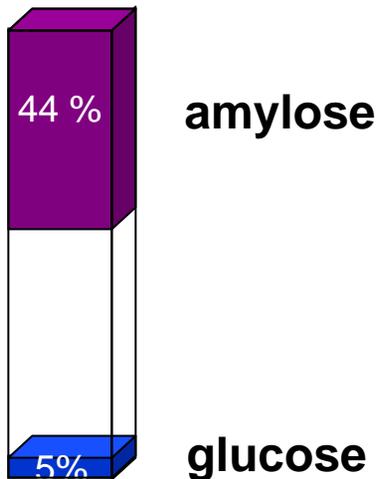
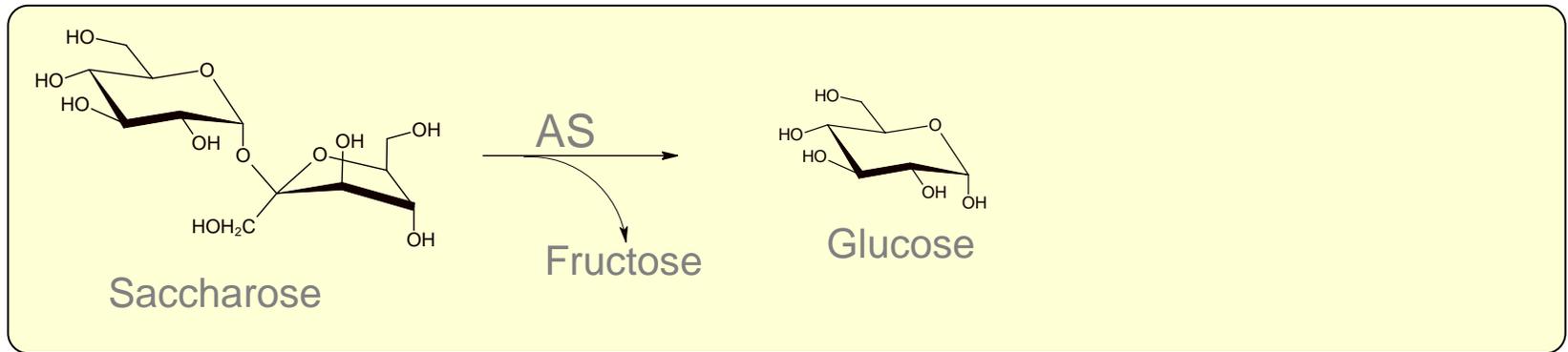
amylose



## Les Biotechnologies BLANCHES

### DE NOUVELLES ENZYMES

- par mutagénèse dirigée

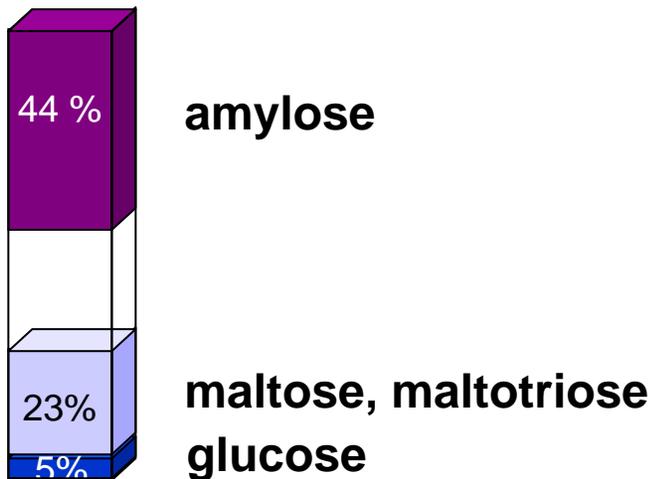
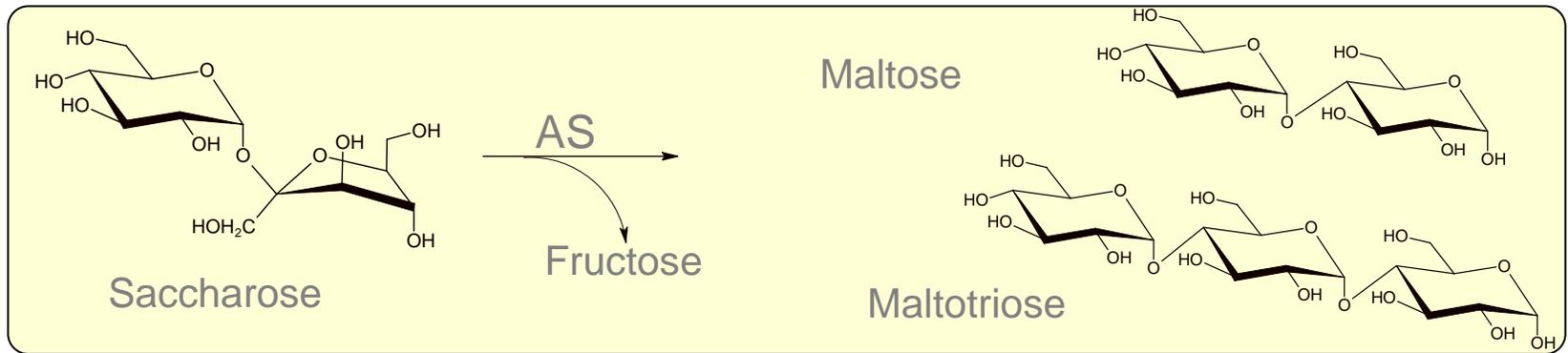




## Les Biotechnologies BLANCHES

### DE NOUVELLES ENZYMES

- par mutagenèse dirigée

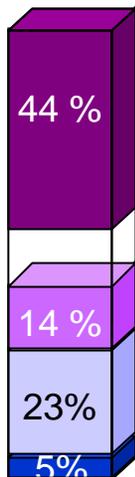
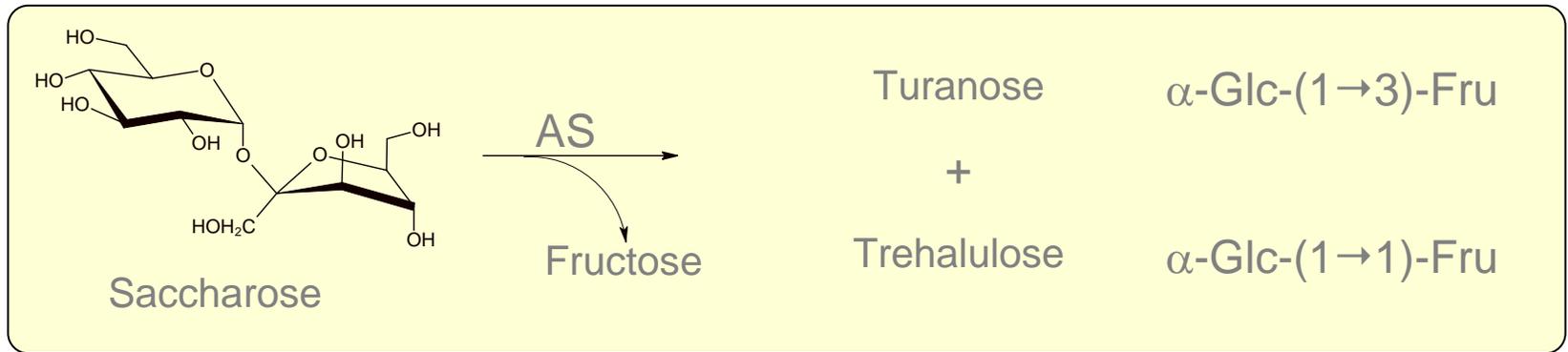




## Les Biotechnologies BLANCHES

### DE NOUVELLES ENZYMES

- par mutagénèse dirigée



**amylose**

**Isomères de saccharose**

**maltose, maltotriose**

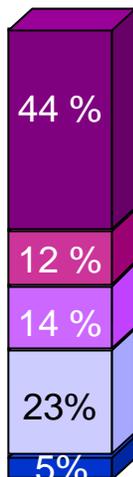
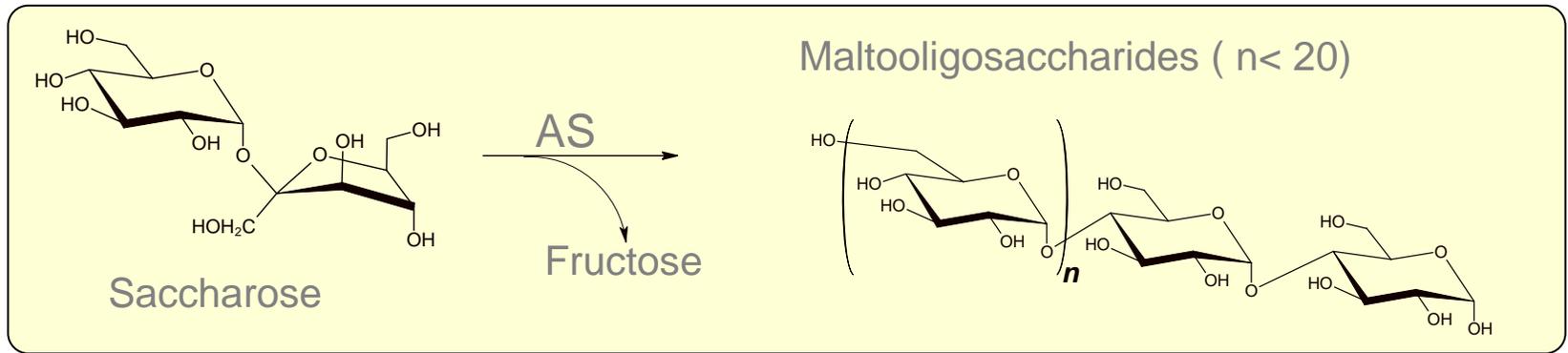
**glucose**



## Les Biotechnologies BLANCHES

### DE NOUVELLES ENZYMES

• par mutagenèse dirigée



amylose

maltoligosaccharides

Isomères de saccharose

maltose, maltotriose

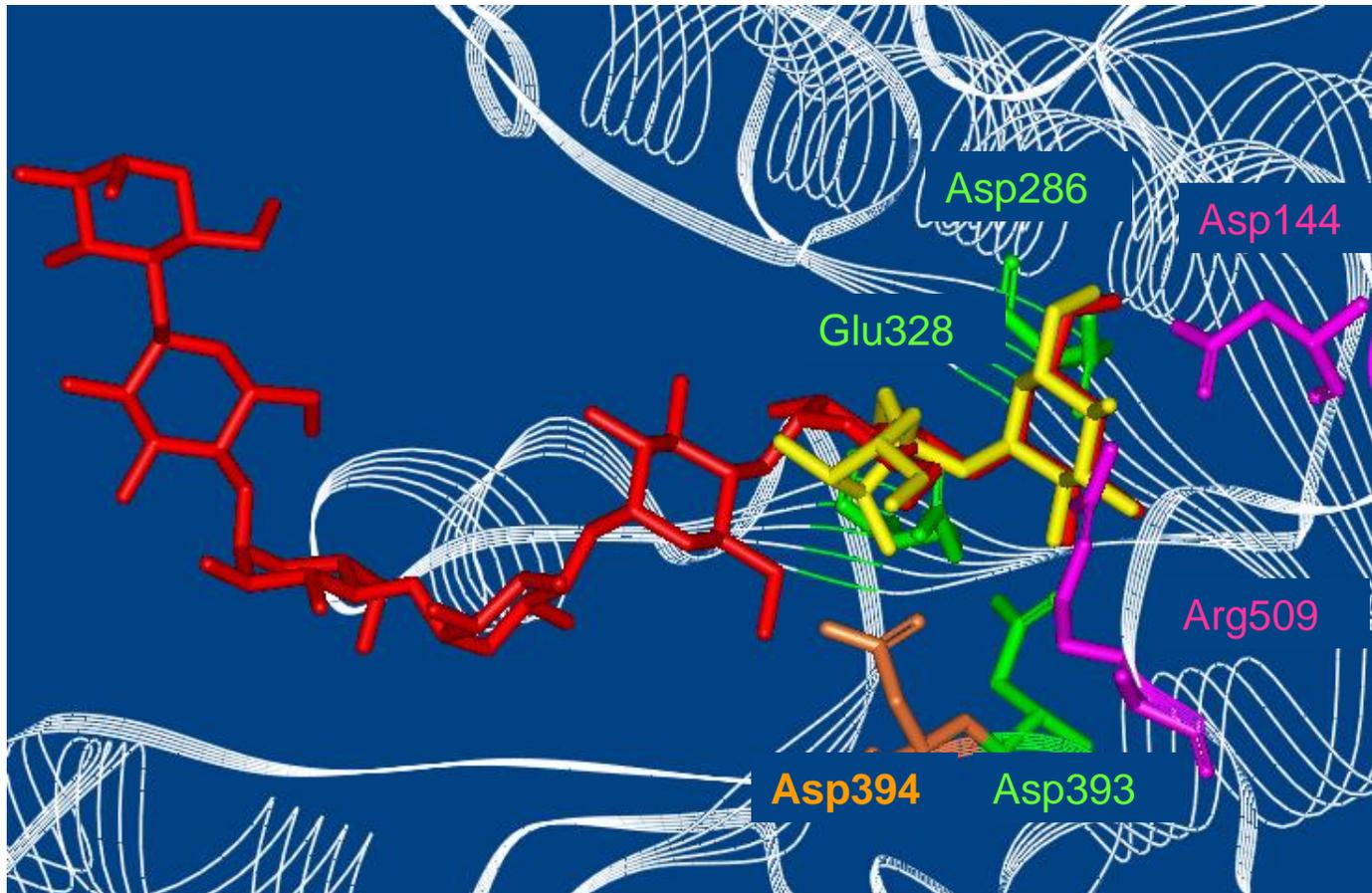
glucose



## Les Biotechnologies BLANCHES

### DE NOUVELLES ENZYMES

- par mutagenèse dirigée





## Les Biotechnologies BLANCHES

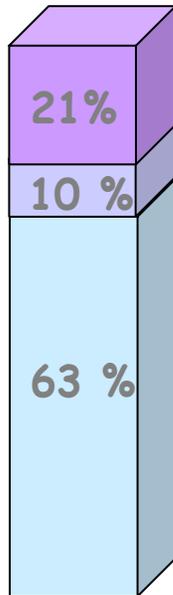
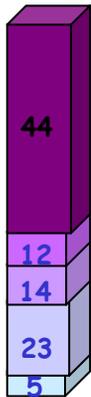
### DE NOUVELLES ENZYMES

- par mutagenèse dirigée

### Amylosaccharase (AS)

⇒ D394A mutant = hydrolase

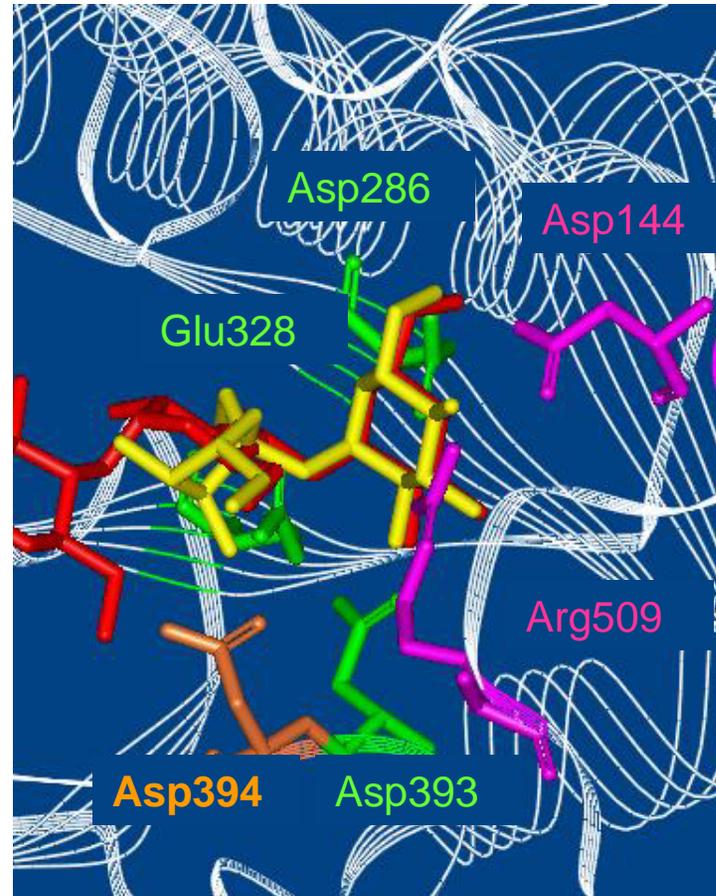
AS WT



G2 + G3

Isomères  
saccharose

Glucose



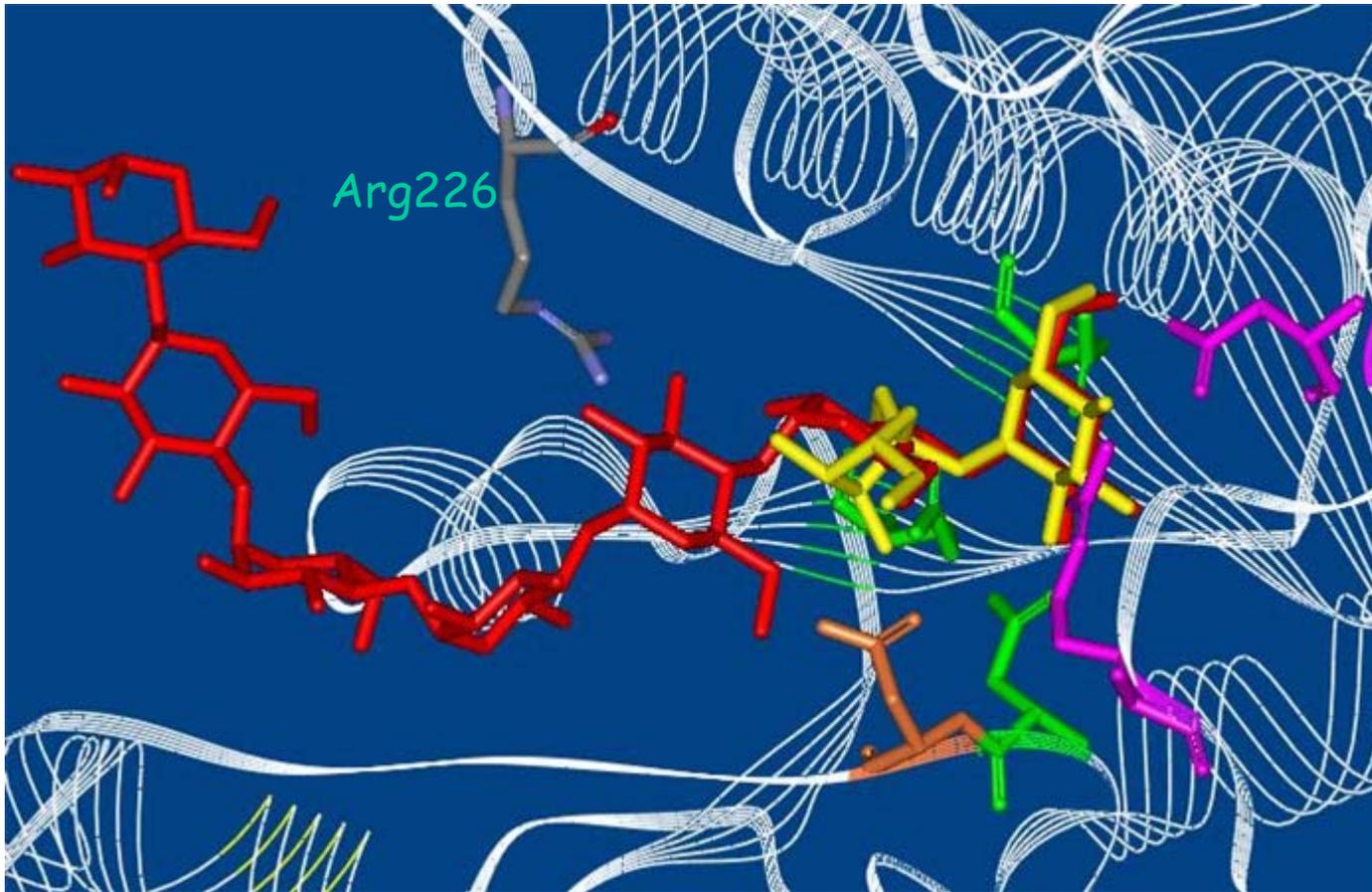
*Skov et al., JBC, 2002; Albenne et al., JBC, 2004*



## Les Biotechnologies BLANCHES

DE NOUVELLES ENZYMES

• par mutagenèse dirigée

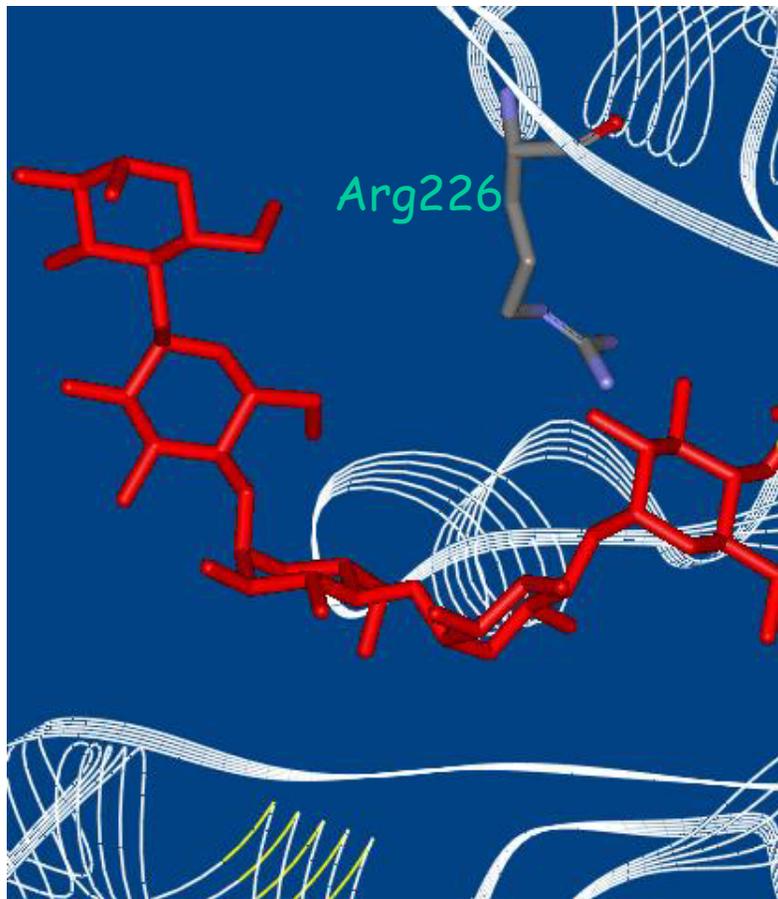




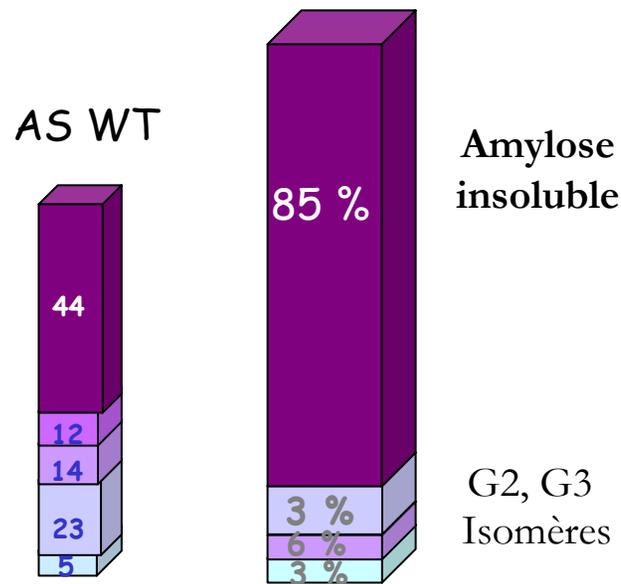
# Les Biotechnologies BLANCHES

## DE NOUVELLES ENZYMES

- par mutagenèse dirigée



Amylosaccharase (AS)  
 ⇒ R226A mutant = polymérase optimisée





### DE NOUVELLES ENZYMES

- par mutagénèse dirigée
- par évolution dirigée



## Les Biotechnologies BLANCHES

### DE NOUVELLES ENZYMES

• par évolution dirigée

#### Plateforme ICEO

*Ingénierie Combinatoire et criblage à haut débit d'enzymes optimisées*



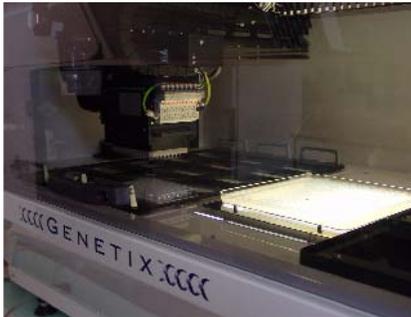
Conseil Régional



INSA Toulouse



INRA



*la seule plate-forme académique française dédiée à l'évolution moléculaire dirigée des protéines*



## Les Biotechnologies BLANCHES

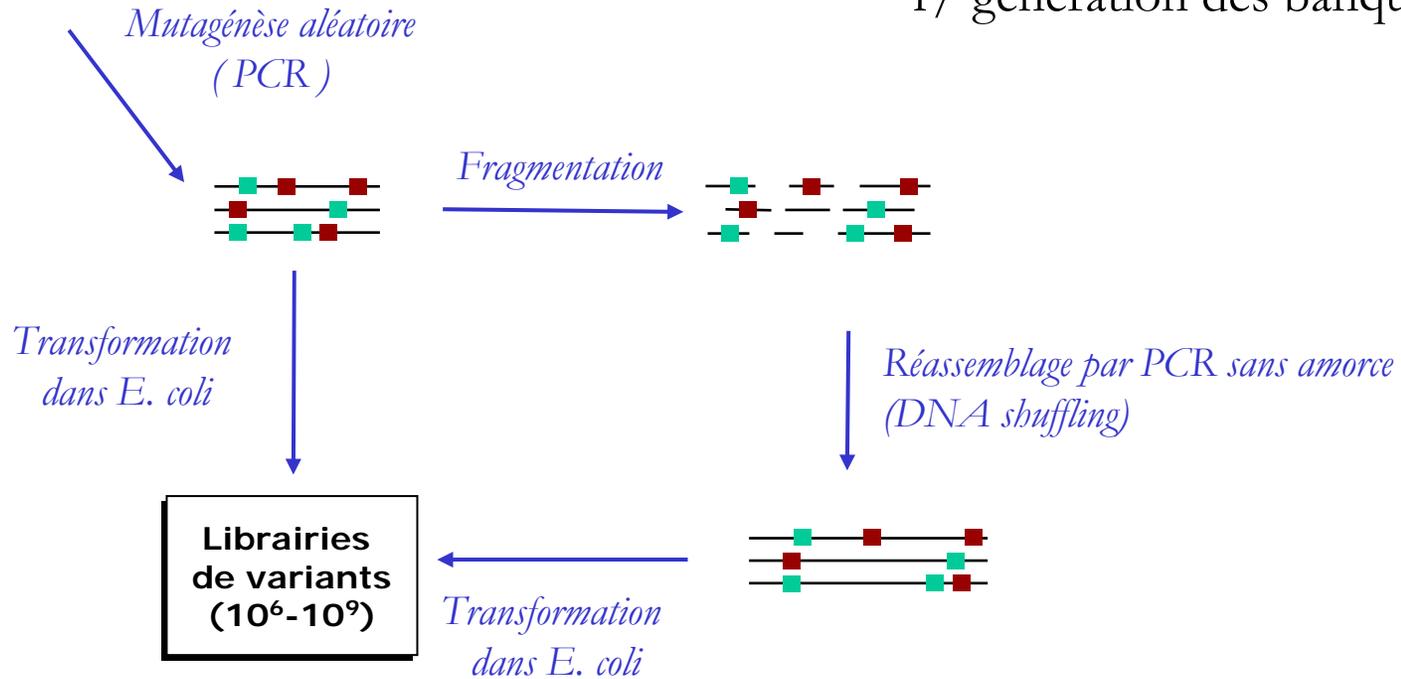
### DE NOUVELLES ENZYMES

- par évolution dirigée



1/ génération des banques

Gène parent





## Les Biotechnologies BLANCHES

### DE NOUVELLES ENZYMES

→ *Étalement des bibliothèques sur un milieu minéral supplémenté en saccharose*

• par évolution dirigée



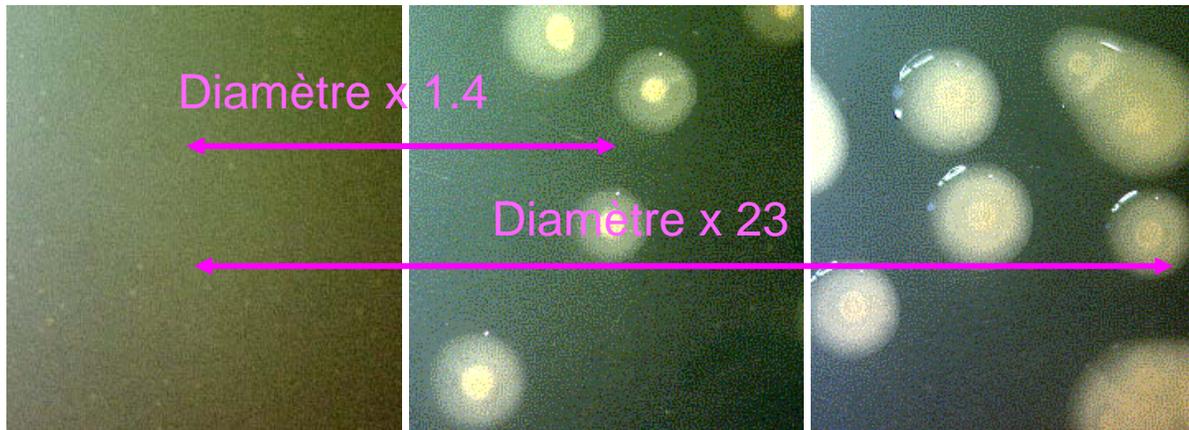
1/ génération des banques

2/ sélection

*E. coli exprimant un variant inactif*

*E. coli exprimant un variant moins actif que le sauvage*

*E. coli exprimant l'enzyme sauvage*





## Les Biotechnologies BLANCHES

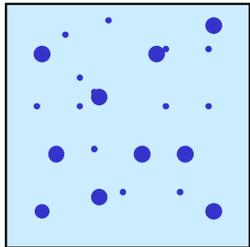
### DE NOUVELLES ENZYMES

- par évolution dirigée



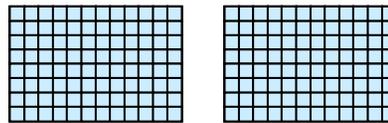
- 1/ génération des banques
- 2/ sélection
- 3/ criblage

Sélection des clones actifs



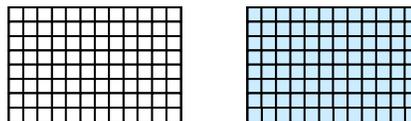
Repiquage

Microplaques  
96 puits

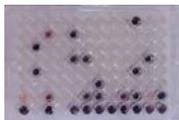


Croissance en milieu liquide  
+ lyse cellulaire

Réaction  
enzymatique

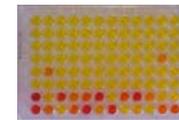


Test à  
l'iode



Détection colorimétrique  
des clones positifs

Dosage des  
sucres réducteurs





### DE NOUVELLES ENZYMES

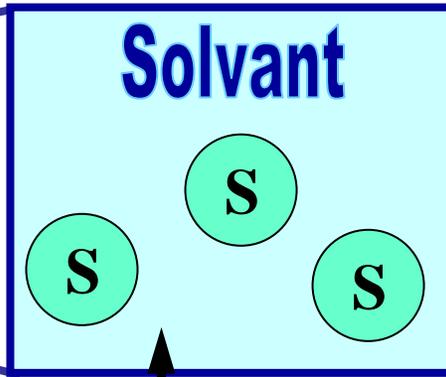
- par mutagénèse dirigée
- par évolution dirigée
- puis suivent des étapes de :
  - ✓ production
  - ✓ purification (obtention de cristaux)
  - ✓ immobilisation



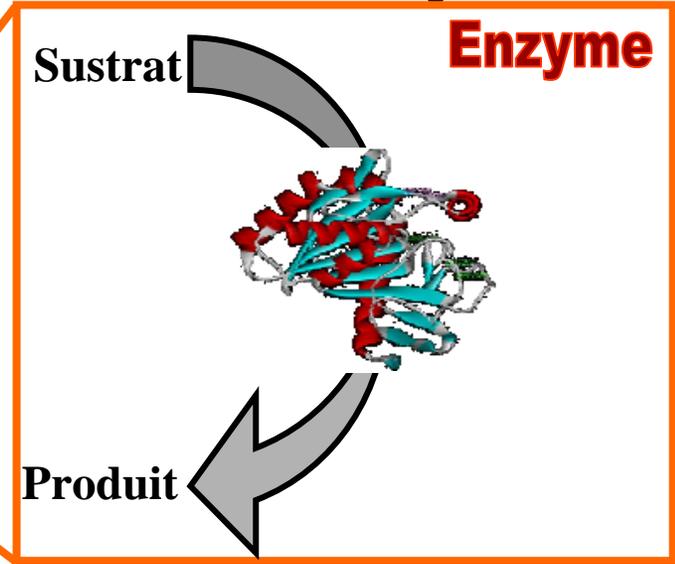
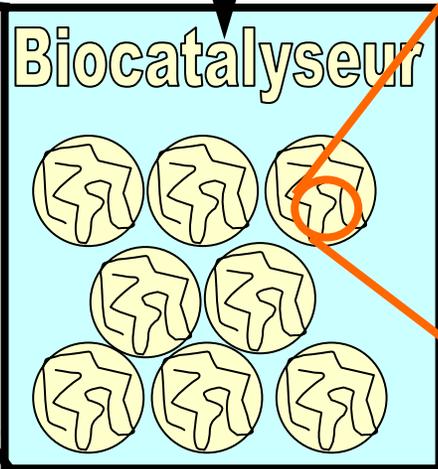
## OPTIMISATION D'UN PROCEDE ENZYMATIQUE



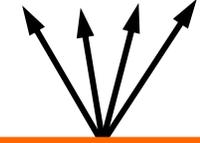
Réacteur enzymatique  
à lit fixe



Partage



Productivité  
Activité  
Spécificité  
Stabilité





### LES AVANTAGES DES BIOTECHNOLOGIES BLANCHES

#### ➔ Des procédés compatibles avec l'environnement

- Température, pH
- Production de sels limitée
- Pas de solvants
- Utilisation de membrane
- Consommation d'eau et d'énergie réduite



### UN EXEMPLE : LA SYNTHÈSE TOTALE D'UN MÉDICAMENT PAR UNE LEVURE

- Voie de production actuelle : **hémisynthèse**
    - nombreuses étapes de conversion chimique et une étape de bioconversion impliquant un microorganisme naturel
    - à partir d'acides biliaires ou de phytostérols
- ⇒ **procédé complexe, coûteux, générateur de sous produits**



# Les Biotechnologies BLANCHES

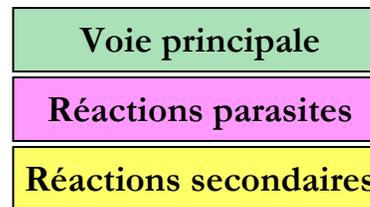
## UN EXEMPLE : LA SYNTHÈSE TOTALE D'UN MÉDICAMENT PAR UNE LEVURE

### • Biosynthèse totale

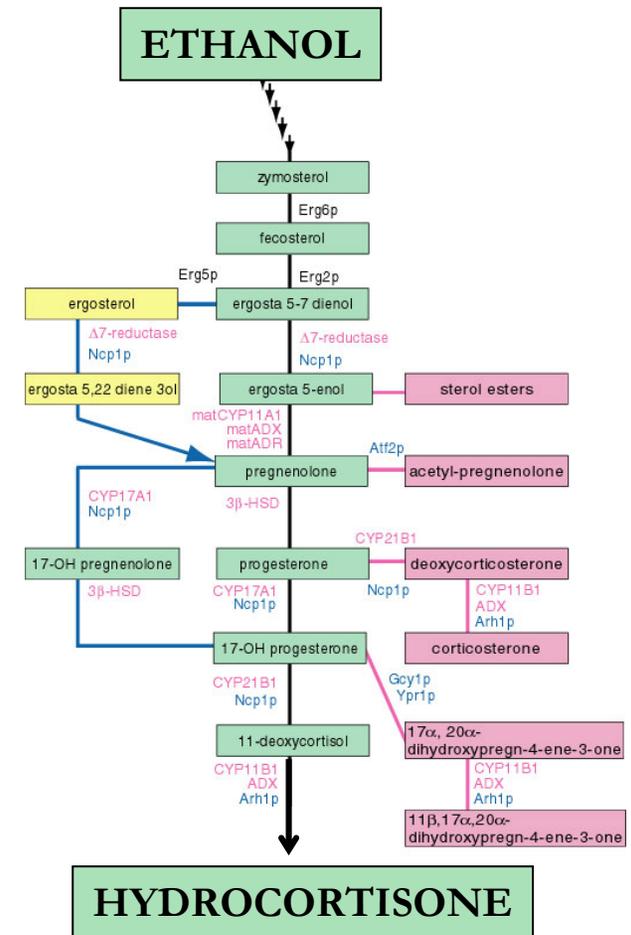
⇒ production d'un médicament de **façon autonome** à partir de **sources de carbone simples** (*alcool, sucre*) et d'oxygène.

enzymes de l'homme/  
bœuf/ plantes

enzymes de la levure  
optimisées



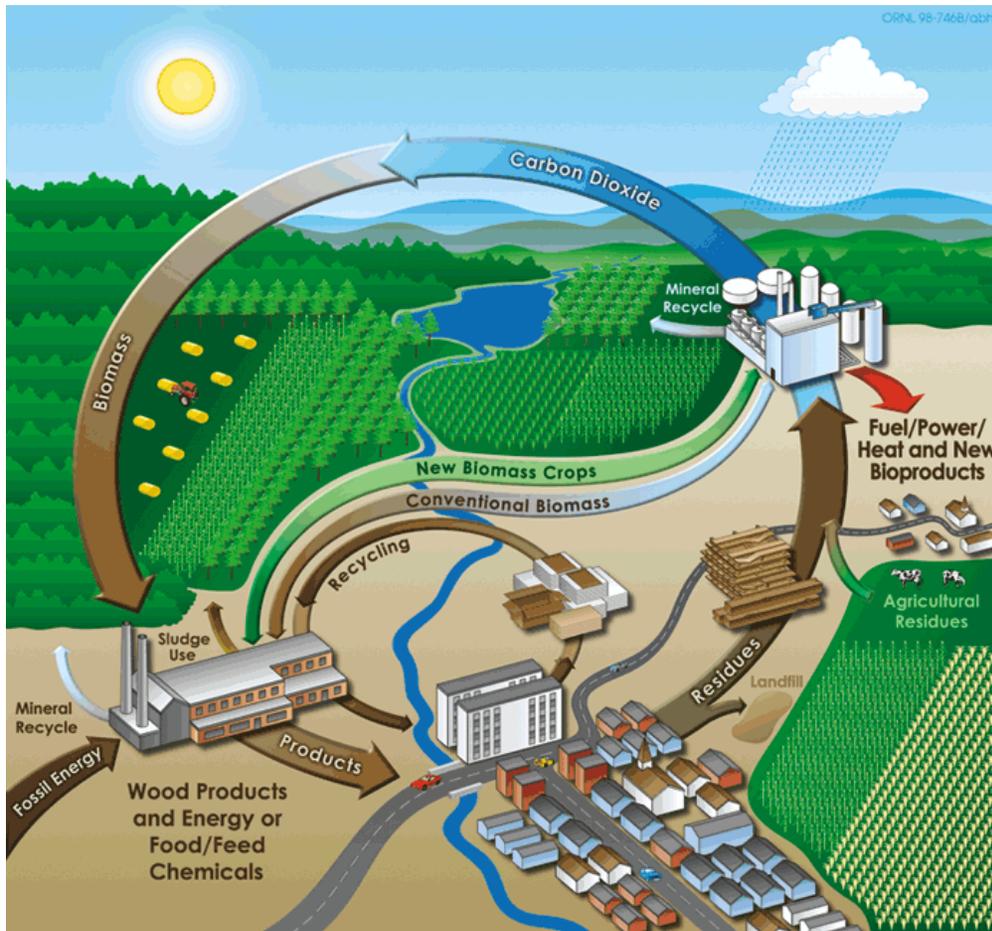
Denis POMPON





## Les Biotechnologies BLANCHES

### LES BIORAFFINERIES



- carbone renouvelable
- Intégration agriculture/industrie
- Valorisation de la plante entière
- « craquage » végétal
- applications alimentaires et non-alimentaires



## Les Biotechnologies BLANCHES

### LES BIORAFFINERIES

Matière  
première



Produit

Application



- glucose
  - Bioéthanol
  - acide polylactique PLA
  - acide citrique
  - antibiotique
  - bio-colorants
  - enzymes
  - ...
- ind. alimentaire  
biocarburant  
bioplastique  
additif alimentaire  
pharmacie  
industrie alimentaire  
catalyseur



## Les Biotechnologies BLANCHES

### LE CONTEXTE

- Étude OCDE 2003

*The application of Biotechnology to industrial sustainability*

- CEFIC (Conseil européen des industries chimiques)



*Technology platform on sustainable chemistry*



*Industrial Biotechnology (sub)platform*





## LE CONTEXTE

- GDR CNRS 2825 Evolution dirigée des Protéines  
Directeur : Denis Pompon, CGM, Gif-sur-Yvette
- CBSO : Club Bioconversions en Synthèse Organique
- CONGRES
  - BIOCAT
  - BIOTRANS
  - ECB
  - CBM
  - Enz Eng Conf



## LE CONTEXTE

- NATIONAL

- UTC
- LGP La Rochelle
- ENSAIA Nancy
- Université de Nantes
- LBB UMR CNRS 5504 INSA Toulouse

- EUROPEEN

- Université de Stuttgart
- Université de Braunschweig
- Université de Delft
- Université de Wageningen
- Université de Groningen
- DTU Copenhague
- Université de Lund
- VTT, Espoo
- University College Londres
- ETH Zurich
- EPFL Lausanne
- Université de Gand



## CONCLUSION

### LES BIOTECHNOLOGIES BLANCHES ....

- Opportunité pour le développement durable
  - utilisation de la biomasse comme matière première renouvelable
  - utilisation de catalyseurs issus du vivant (enzymes, microorganismes)
  - baisse de la consommation d'énergie, d'eau
  - des déchets moindres et biodégradables



**« permet de satisfaire les besoins d'aujourd'hui sans mettre en danger les capacités des générations futures à satisfaire leurs propres besoins »**

définition donnée par la Commission Bruntland, 1987

- Nécessité de **créativité** :  
produits dont l'économie de dépende pas du cours du baril de pétrole
- Combinaison d'étapes chimiques / biochimiques / procédés  **(bio) Chimie**