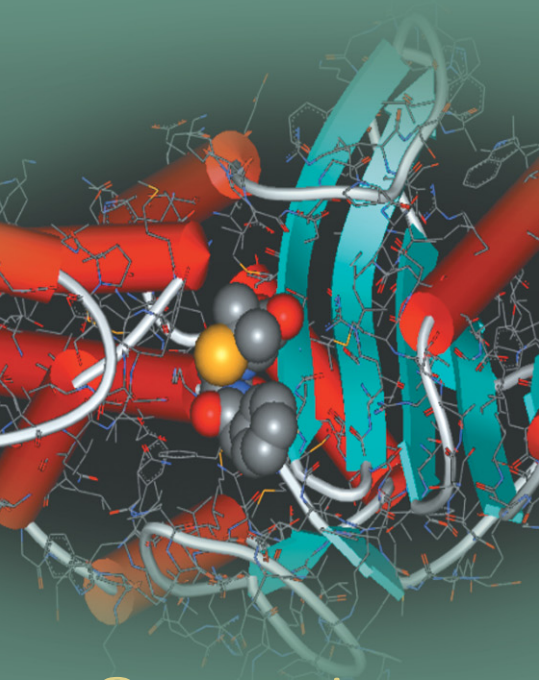
CQVB
partenaire reconnu de la bio•innovation

BIOTECHNO

Volume 2, numéro 5, Avril 2004 Coût : 25$



L'évolution dirigée: la recherche d'enzymes toujours plus performantes

1 INTRODUCTION

Science encore jeune, la biochimie moderne ne se définit plus exclusivement par l'incroyable essor de la génétique des trente dernières années et dont le point culminant fut le décryptage complet du génome humain il y a trois ans[1]. L'ère post-génomique (la protéomique), en cherchant à comprendre le rôle, la fonction et la structure des protéines encodées par les gènes, se ressource à la biochimie classique pour de nouvelles découvertes. Depuis maintenant deux décennies une discipline s'est développée, ***l'ingénierie enzymatique****, qui exploite les propriétés des protéines catalytiques (les enzymes) et peut modifier ces puissants biocatalyseurs. Cette fiche technologique présente un survol de plusieurs techniques d'évolution dirigée capables de générer des mutants enzymatiques aux caractéristiques prédéfinies. Différentes approches seront décrites ainsi que leurs avantages et leurs inconvénients respectifs. Cette fiche abordera aussi quelques-unes des applications de ces catalyseurs modifiés dans des domaines aussi divers que la synthèse chimique, la catalyse industrielle et commerciale, la recherche biomédicale et l'environnement.*

Sommaire

INTRODUCTION
PAGE 1

PROBLÉMATIQUE
2.1 Les enzymes et leur contexte évolutif
2.2 Adapter les enzymes à nos besoins
PAGE 2

LES TECHNIQUES D'ÉVOLUTION DIRIGÉE
3.1 Identification d'un point de départ avantageux
PAGE 3
3.2 Création de la diversité génétique mutationnelle
PAGE 3
3.3 La sélection et le criblage
PAGE 6
3.4 Avantages et inconvénients de l'évolution dirigée
PAGE 7

CONTEXTE D'APPLICATION
4.1 Environnement et chimie verte
PAGE 8
4.2 Alimentation, pâtes et papier et autres applications industrielles
PAGE 9
4.3 Synthèse organique et applications pharmaceutiques
PAGE 10

CONCLUSION
PAGE 11

(source : ARS)

2 PROBLÉMATIQUE

2.1 LES ENZYMES ET LEUR CONTEXTE ÉVOLUTIF

Chez tout organisme vivant, les réactions chimiques responsables du maintien de l'homéostasie sont presque toutes accélérées par des protéines possédant un pouvoir catalytique, les enzymes. Dans leur contexte particulier, ces protéines sont parmi les catalyseurs les plus puissants que l'on connaisse puisqu'elles peuvent accélérer de 10^6 à 10^{17} fois des réactions souvent défavorables au niveau thermodynamique. Certaines enzymes (e.g. l'anhydrase carbonique) sont à ce point efficaces qu'elles catalysent des réactions à des vitesses approchant la limite de diffusion des molécules en solution[2].

Cette efficacité est également reliée au contexte dans lequel fonctionnent ces macromolécules. La complexité des réactions chimiques du vivant nécessite souvent une réponse spécifique très rapide qui doit être modulée et régulée efficacement, conférant ainsi à ces catalyseurs leurs avantages et leurs inconvénients. Bien que les enzymes soient en mesure de catalyser efficacement une vaste gamme de réactions chimiques[3] et qu'elles soient pour la plupart totalement stéréo-, régio- et chimiosélectives*, les réactions catalysées de façon optimale le sont majoritairement à un pH physiologique neutre (pH 7), en solution aqueuse et à des températures relativement basses. Bien adaptées à ces milieux, les enzymes sont très sensibles à toute modification des conditions de système.

2.2 ADAPTER LES ENZYMES À NOS BESOINS

Le design rationnel

L'exploitation des enzymes dans un contexte différent du milieu dans lequel elles opèrent normalement est un domaine en pleine effervescence. Ces catalyseurs sont, par nature, de longues chaînes polypeptidiques formant un arrangement tridimensionnel complexe dont le maintien de la structure moléculaire dépend de milliers d'interactions électrostatiques, de ponts hydrogènes, de forces hydrophobes, etc. Les enzymes sont ainsi très facilement dénaturées lorsque ces interactions sont compromises par des changements de température, de pH ou de conditions de tampon. La venue des technologies de l'ADN recombinant qui permettent l'introduction de mutations dans leur séquence a ouvert la voie au domaine du *design rationnel*. À l'aide des outils de la biologie moléculaire, il devient possible de modifier certains résidus ciblés par l'expérimentateur dans le but de faire adopter, par l'enzyme d'intérêt, une caractéristique désirée. Cependant, le design rationnel exige de l'expérimentateur une très grande connaissance de la structure et de la fonction du catalyseur. Par exemple, afin d'augmenter la grosseur de la cavité du site actif d'une enzyme particulière, on pourrait vouloir remplacer un résidu du site actif par un résidu moins volumineux. Or, une mutation introduite de façon rationnelle amène plus souvent qu'autrement la perte de l'activité enzymatique plutôt que son amélioration ou sa modification efficace puisque des effets imprévisibles, tels que la déstabilisation de la structure, se produisent souvent.

* *Stéréosélectivité* : Capacité d'agir sur un seul énantiomère d'une substance chimique donnée.

Régiosélectivité : Reconnaissance d'un groupe fonctionnel à une position spécifique d'un substrat qui possède plusieurs groupes fonctionnels équivalents.

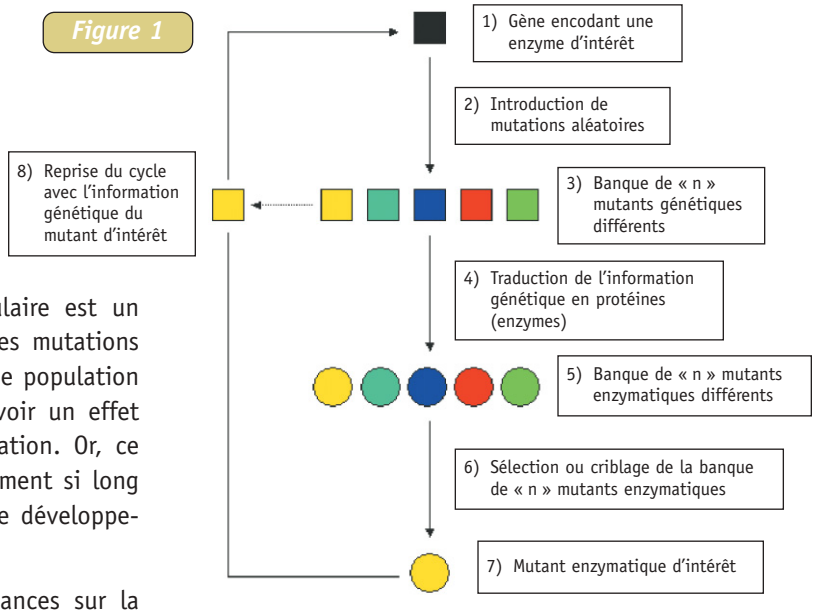
Chimiosélectivité : Capacité d'agir sur un groupe fonctionnel spécifique d'un substrat lorsque d'autres groupes fonctionnels de réactivité au moins équivalente sont présents.

L'évolution dirigée

Une alternative au design rationnel des enzymes est de mimer l'évolution naturelle, mais de façon accélérée et en laboratoire. Une évolution ciblant une caractéristique précise est ainsi amorcée, d'où le terme *évolution dirigée*. Au cours de l'évolution moléculaire naturelle, le nombre plus ou moins faible de mutations que les organismes introduisent dans leur génome à chaque réplication cellulaire est un processus initié sans qu'un but soit défini au préalable. Les mutations introduites étant aléatoirement distribuées à l'intérieur d'une population donnée d'organismes, certaines pourront éventuellement avoir un effet (positif ou négatif) sur quelques individus de cette population. Or, ce processus naturel s'effectue dans un laps de temps relativement si long qu'il est impossible de l'adapter au contexte scientifique de développement de nouveaux catalyseurs industriels.

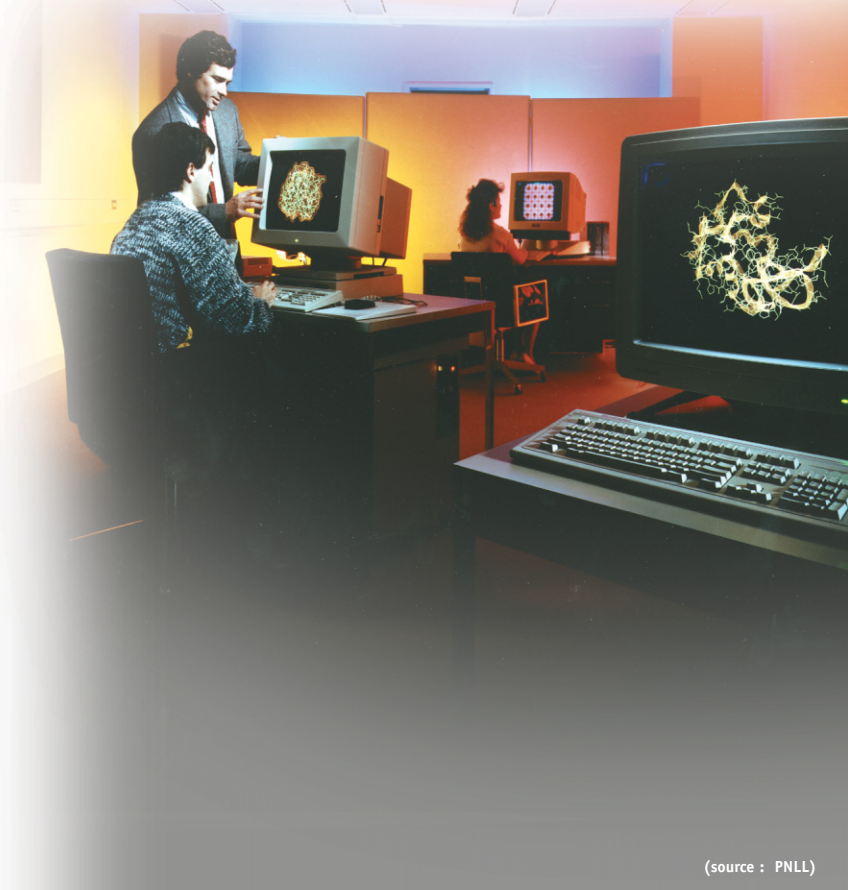
Shéma de l'évolution dirigée

Figure 1



L'évolution dirigée met toutefois en pratique les connaissances sur la diversité moléculaire évolutive naturelle en créant en laboratoire un large éventail de mutants enzymatiques différents (typiquement une *librairie*, ou une banque de variants) dans un laps de temps raisonnable. Cette banque peut ensuite être *sélectionnée* ou *criblée* afin d'identifier un ou des mutants porteurs d'une caractéristique qui intéresse particulièrement l'expérimentateur (Figure 1). Tout comme pour l'évolution naturelle, les résultats empiriques démontrent que l'introduction d'un nombre restreint de mutations aléatoires génère des mutants enzymatiques ayant des propriétés susceptibles d'être sensiblement améliorées par rapport à celles du parent non muté, d'où l'intérêt de la méthode.

3 LES TECHNIQUES D'ÉVOLUTION DIRIGÉE



L'utilisation de techniques d'évolution dirigée pour créer un nouveau catalyseur est loin d'être un chemin sans embûches. L'expérimentateur qui désire améliorer une fonction particulière doit concentrer ses efforts sur trois étapes importantes :

- *Identification d'un point de départ avantageux,*
- *Création de la diversité génétique mutationnelle, et*
- *Développement d'un moyen de sélectionner (ou de cribler) la banque de mutants générés.*

3.1 IDENTIFICATION D'UN POINT DE DÉPART AVANTAGEUX

L'expérimentateur zélé désireux de créer un catalyseur enzymatique en partant à zéro, i.e. en testant toutes les possibilités de séquences protéiques, se frappe très rapidement le nez sur une porte close. Ne serait-ce qu'en voulant créer une enzyme de petite taille (ex : 100 acides aminés de long), le nombre de séquences enzymatiques possibles dépasse largement les

(source : PNLL)

limites de l'entendement. En effet, puisqu'il est théoriquement possible d'insérer chacun des vingt acides aminés à chacune des positions de l'enzyme, la combinaison totale des choix à tester donne le chiffre faramineux de 20^{100} possibilités de séquences enzymatiques différentes, chiffre qui dépasse le nombre total d'atomes estimé dans l'univers… De ce point de vue, il est donc raisonnable de suivre les leçons que nous donne l'évolution naturelle, à savoir entreprendre la création de variants *à partir d'une solution déjà active*.

La multitude de séquences protéiques possibles versus le nombre relativement restreint de séquences enzymatiques observées dans la nature suggère que le nombre de séquences actives est statistiquement faible. Une métaphore connue compare l'espace séquentiel protéique à une chaîne montagneuse avec ses vallées et ses collines, où les séquences les plus actives correspondent aux sommets de plus haute altitude. Dès que l'on est à un point déjà suffisamment élevé d'une montagne, il est plus simple de trouver le sommet en explorant à gauche et à droite, en faisant de petits pas, plutôt que de repartir d'en bas. En somme, il est plus efficace d'utiliser comme point de départ une enzyme ayant une activité ou une caractéristique proche de celle que l'on recherche que de commencer à zéro ou à partir d'une enzyme évolutivement distante[4]. L'expérimentateur privilégie donc cette approche lorsqu'il désire modifier, par évolution dirigée, une ou des caractéristiques particulières d'une enzyme. Par exemple, pour optimiser une réaction donnée à une température de 75°C, on privilégiera comme point de départ l'enzyme d'un organisme thermophile catalysant cette réaction plutôt que l'enzyme analogue retrouvée chez un organisme mésophile. De façon équivalente, si l'on désire modifier la spécificité de reconnaissance, on partira d'une enzyme qui possède une bonne réactivité pour un substrat analogue à celui que l'on désire faire reconnaître plutôt que d'une enzyme qui reconnaît un substrat structurellement très différent.

3.2 CRÉATION DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE MUTATIONNELLE

Depuis une quinzaine d'années, les banques de mutants sont l'objet d'un nombre considérable d'articles scientifiques qui traitent du développement de méthodes de création d'une diversité génétique toujours plus grande. Toutes les méthodes d'évolution dirigée utilisées à cet effet se fondent sur deux techniques de base : la *mutagenèse aléatoire* et la *recombinaison*[5].

La mutagenèse aléatoire s'inspire des erreurs introduites dans le génome de l'organisme lors de la réplication de son matériel génétique. En temps normal, ces erreurs sont corrigées par les polymérases qui synthétisent cet ADN. Or, il arrive qu'une de ces erreurs ne soit pas corrigée, introduisant ainsi une mutation. Les scientifiques désireux de créer une quantité importante de mutants enzymatiques par évolution dirigée exploitent depuis longtemps les propriétés déficientes des polymérases. Le gène encodeur de l'enzyme d'intérêt sert de point de départ et est amplifié exponentiellement par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR), qui recourt à une polymérase dont le taux d'introduction d'erreurs est très élevé, soit la méthode PCR pro-erreurs (*Error-prone PCR*[6]). Cette technique génère une grande quantité de gènes qui encodent l'enzyme d'intérêt et qui diffèrent par la présence de mutations distribuées aléatoirement sur toute leur longueur (Figure 2). Le nombre de mutations ainsi obtenues demeure faible (environ 1 à 2 mutations par 1000 paires de bases d'ADN, au maximum). Ce taux mutationnel peut néanmoins être amélioré et modulé par l'ajout, au milieu réactionnel, de substances mutagènes chimiques, par la modification des conditions de réaction de la PCR, par l'introduction d'analogues modifiés de nucléotides ou par la sélection de polymérases moins fidèles[6].

En plus de la génération d'une très grande banque de mutants, le principal avantage de la technique de mutagenèse aléatoire par PCR pro-erreurs est la simplicité d'utilisation par tout expérimentateur ayant des connaissances de base en biologie moléculaire. Il s'agit de disposer d'un gène d'intérêt, d'un thermocycleur

Figure 2

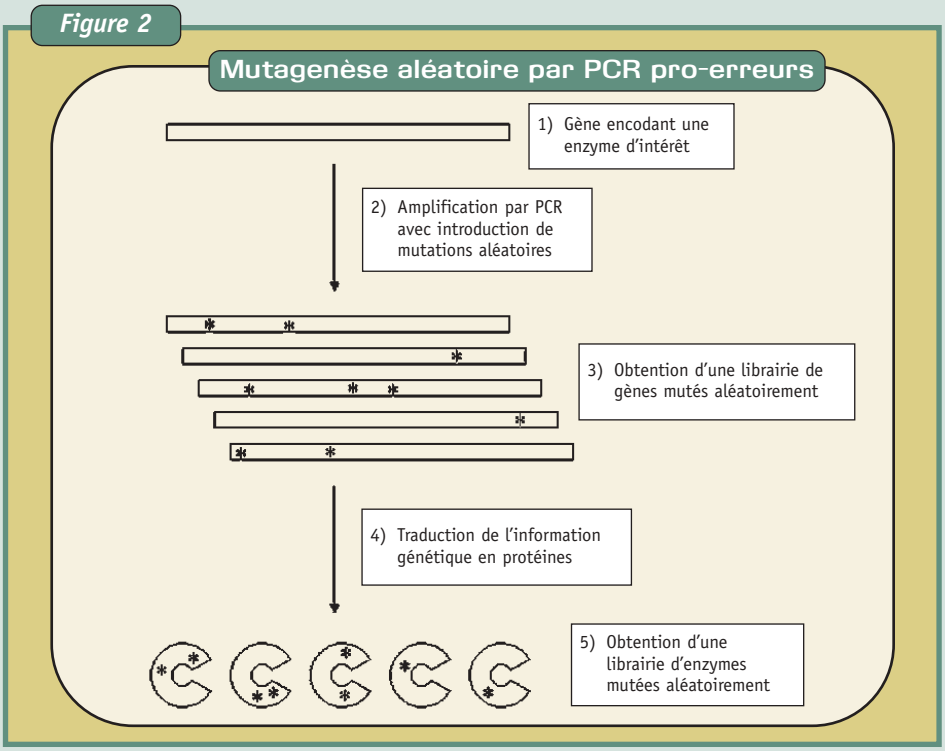
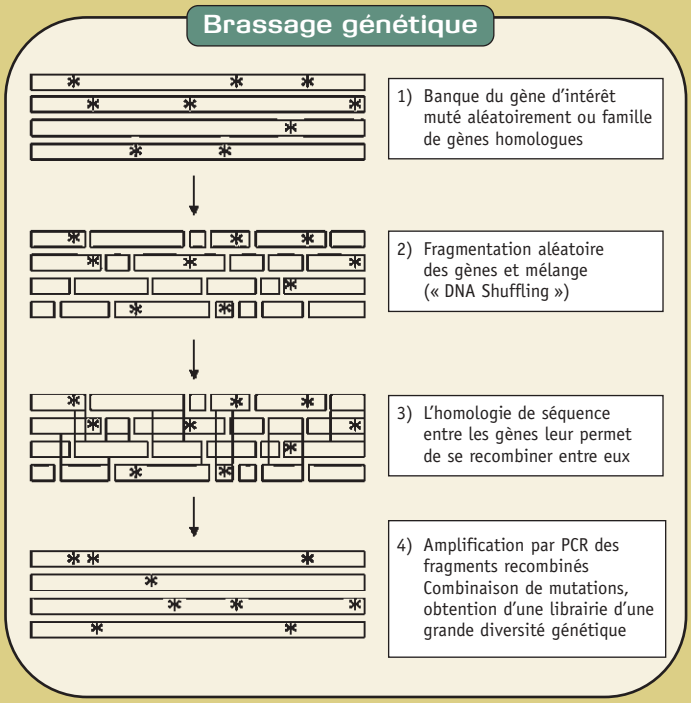


Figure 3



(appareil modifiant la température de façon à hybrider ou dénaturer l'ADN), de réactifs disponibles commercialement et d'un peu de temps (quelques heures). Par contre, son défaut majeur étant le faible taux mutationnel obtenu sur le gène d'intérêt, il devient statistiquement difficile d'obtenir des mutations rapprochées les unes des autres, ce qui est parfois désirable pour augmenter la diversité mutationnelle. Malgré ces quelques désavantages, la mutagenèse aléatoire demeure une technique tout à fait appropriée au développement de catalyseurs enzymatiques modifiés. Elle est d'ailleurs employée, à profusion et avec succès, notamment pour modifier la spécificité de reconnaissance et pour augmenter la thermostabilité des enzymes (voir section 3 – Contexte d'application).

La seconde technique à laquelle on recourt en laboratoire pour générer une banque de variants d'enzymes est la *recombinaison* génétique. Utilisée pour la première fois à cette fin il y a une dizaine d'années par Willem Stemmer[7], la technique fut baptisée « brassage génétique » (*DNA Shuffling*) parce qu'elle se sert des fragments d'un même gène ou de gènes homologues préalablement coupés par des enzymes (Figure 3). Ces divers fragments sont par la suite mélangés et se recombinent entre eux selon l'homologie de leur séquence. Cet enchaînement de fragments sert ensuite à recréer le gène originel qui contient dorénavant une diversité mutationnelle plus importante. Certains avantages intéressants distinguent cette technique de la mutagenèse aléatoire. Ainsi, en partant de plusieurs variants actifs du même gène, créés au préalable par mutagenèse aléatoire, la technique de « brassage génétique » permet la combinaison de mutations simples qui étaient déjà bénéfiques.

Par analogie, il est possible d'imaginer une expérience où plusieurs membres d'une même famille de gènes homologues (un groupe d'enzymes évolutivement semblables, par exemple) constituent les gènes de départ et génèrent des variants ayant les caractéristiques génétiques de tous ces gènes mélangés. Cette variante du « brassage génétique » fut nommée le « brassage de gènes homologues » *(Family Shuffling)*[8] et exploite la diversité naturelle de gènes homologues qui ont tous l'avantage d'encoder des enzymes fonctionnelles. Ces deux modes de recombinaison sont ainsi devenus des outils puissants qui, par exemple, dans le cas de la dégradation de l'arsenate, une substance toxique qui contamine souvent les rivières et les sols[9], ont permis la génération de mutants enzymatiques aux propriétés 40 fois supérieures à celles de l'enzyme parente.

On peut penser que plus la diversité génétique sera forte entre ces gènes, plus la banque de mutants sera diversifiée et intéressante. Or, la recombinaison possède un défaut majeur relié à cette prémisse : elle nécessite, pour être efficace, une bonne part d'*homologie de séquence*, car sans cette homologie, les fragments ne se reconnaissent pas entre eux et ne s'apparient pas suite à la fragmentation (Figure 3). Il devient ainsi impossible de générer une quantité importante de mutants à partir de gènes qui ont une homologie de séquence trop faible. De plus, comme pour la mutagenèse aléatoire, il est extrêmement difficile d'obtenir des mutations physiquement proches les unes des autres.

Pour pallier ces défauts, de multiples techniques, similaires au « brassage génétique », furent inventées, telles les techniques StEP[10] et RACHITT[11], [12], pour augmenter les événements de recombinaison et de reconnaissance entre gènes et la technique SHIPREC[13], pour entreprendre du « brassage génétique » entre gènes dont l'homologie de séquence est très faible. Quant à la technique DOGS[14], elle fut créée pour multiplier les événements de recombinaison entre gènes ainsi que pour limiter la présence de gènes parentaux suite au « brassage génétique ». Ces techniques ne seront pas discutées davantage ici, mais il convient de dire qu'elles furent toutes conçues pour combler certaines lacunes du « brassage génétique » classique. Dans l'ensemble, elles sont efficaces, mais souvent au profit d'une complexité non négligeable. En effet, bien que ces techniques favorisent presque toutes la recombinaison entre gènes distants évolutivement, elles nécessitent souvent une main-d'œuvre plus spécialisée et une optimisation relativement plus ardue du système. Il est donc initialement recommandé d'y recourir sélectivement puisque, comme dans le cas de la mutagenèse aléatoire, l'application du simple « brassage génétique » est souvent suffisante pour générer des mutants intéressants (voir section 3 – Contexte d'application).

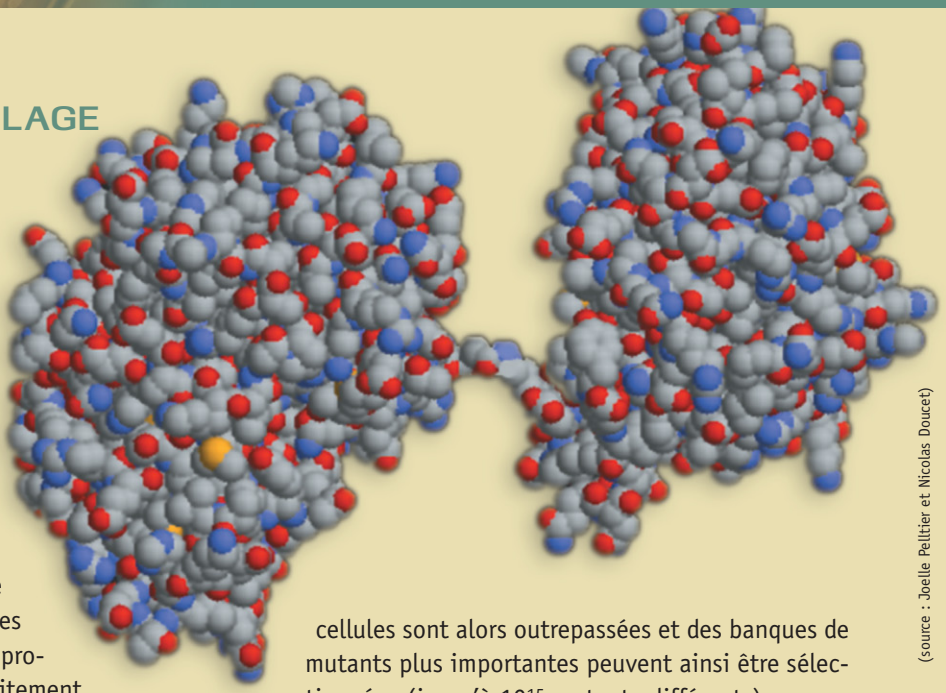
3.3 LA SÉLECTION ET LE CRIBLAGE

La sélection

La génération d'une quantité importante d'enzymes mutantes devient presque inutile si l'expérimentateur ne peut les tester et ainsi isoler celles qui possèdent la caractéristique désirée. Voilà la réelle difficulté des techniques d'évolution dirigée. La technique la plus simple pour tester ces enzymes modifiées aléatoirement est de recourir à la machinerie cellulaire des bactéries ou des levures pour initier une *sélection par survie cellulaire*. En effet, cette sélection tire profit du fait que le matériel génétique obtenu par mutagenèse aléatoire ou par recombinaison peut être inséré dans des cellules qui transformeront cette information génétique en protéines. Ces cellules seront ensuite soumises au traitement désiré et seules survivront celles qui posséderont les meilleurs représentants de la banque de mutants enzymatiques créés.

La sélection a cependant un défaut majeur souvent insurmontable. Son emploi nécessite que la caractéristique enzymatique à tester soit *essentielle à la survie* de la cellule ou qu'elle confère un *avantage* de *croissance évident*, sans quoi on se retrouve au point de départ. La sélection par survie cellulaire bactérienne, lorsque possible, est incontestablement la technique la plus simple de dépistage de mutants enzymatiques d'intérêt dans un intervalle de temps intéressant. En effet, elle ne prend souvent qu'une seule journée, nécessite peu de matériel et permet de sélectionner le ou les meilleurs mutants parmi une banque de plusieurs millions d'exemplaires enzymatiques différents.

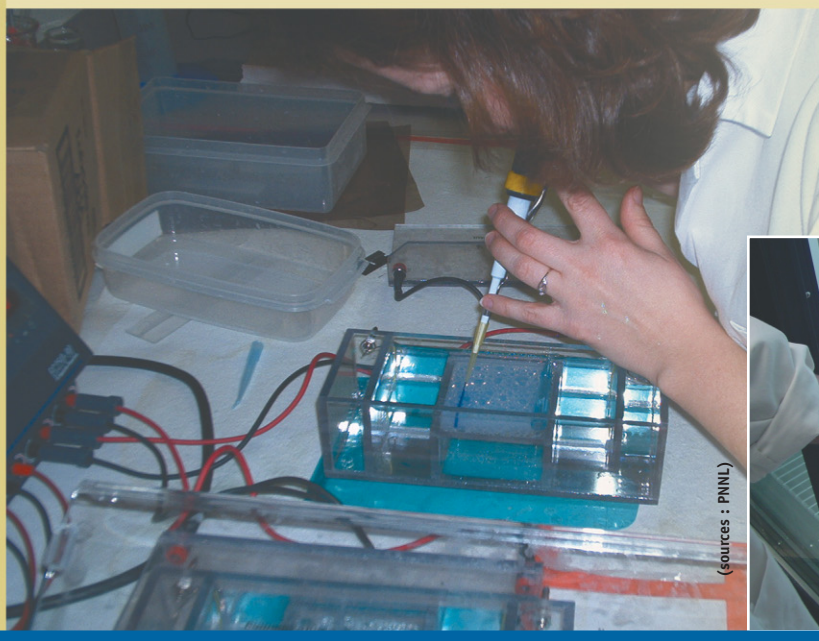
Les limites de la sélection par survie cellulaire dépendent des limites des techniques de biologie moléculaire qui permettent l'introduction de tous les exemplaires de l'ADN muté dans les cellules (ce que l'on nomme la transformation cellulaire). Ainsi, selon les technologies actuelles pour les souches bactériennes disponibles, il est encore impossible de transformer plus de ≈ 10^9 bactéries différentes, ce qui signifie que les banques d'ADN ne peuvent contenir plus de ≈ 10^9 mutants différents. À prime abord, ce nombre de mutants peut nous sembler astronomique, mais, en pratique, il arrive que l'on souhaite en tester beaucoup plus. Pour ce faire, grâce à l'invention de techniques de sélection *in vitro*, telles que les techniques « d'attachement au ribosome » (*Ribosome Display*)[15] ou « d'exposition à la surface de phages » (*Phage Display*)[16], il est maintenant possible d'entreprendre les étapes de transcription et de traduction du matériel génétique en protéines directement dans l'éprouvette sans passer par la machinerie cellulaire. Les limites de transformation des cellules sont alors outrepassées et des banques de mutants plus importantes peuvent ainsi être sélectionnées (jusqu'à 10^{15} mutants différents).



(source : Joelle Pelltier et Nicolas Doucet)

Le criblage

Lorsque la sélection par survie cellulaire ne peut être appliquée pour tester tous les mutants d'une banque donnée, l'expérimentateur doit se tourner vers une technique alternative, le *criblage*. Selon cette approche, tous les mutants enzymatiques de la banque seront testés individuellement pour la caractéristique désirée. De manière classique, pour entreprendre un criblage, on crée une banque de 10^2 à 10^5 mutants en cellules, on les dispose individuellement dans des plaques à multipuits et on les teste un à un pour une réactivité ou une propriété désirée. Concrètement, il est possible de suivre l'évolution d'un réactif par la coloration ou par l'apparition de fluorescence, d'évaluer les changements de pH selon un indicateur ajouté au milieu de réaction, de suivre la turbidité de la solution ou encore de calculer les changements de température accompagnant la réaction qui intéresse l'expérimentateur[17]. Il est



(sources : PNNL)

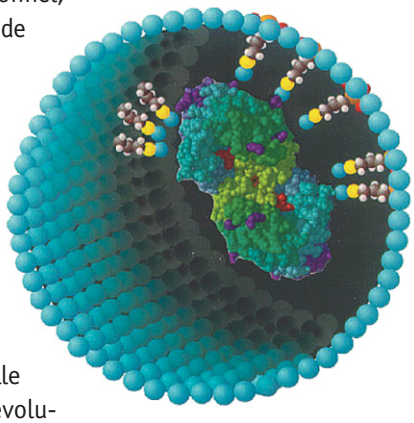
également possible de suivre l'apparition d'un produit par résonance magnétique nucléaire (RMN), par chromatographie HPLC ou encore par spectrométrie de masse. En exploitant ces propriétés physiques, il est possible de moduler les réactions à des températures plus élevées ou en présence de solvants organiques, selon que l'on désire améliorer l'une ou l'autre de ces propriétés.

Typiquement, bien que les conditions de réaction peuvent être facilement modifiées, la méthode classique de criblage en plaques à multipuits est plus longue qu'une sélection par survie et nécessite un appareillage spécialisé et précis (lectrices à plaques, appareils robotisés, etc.). De plus, l'expérimentateur doit également connaître une méthode pour lier le phénotype de l'enzyme améliorée à sa séquence génétique (le génotype), sans quoi il est impossible d'identifier les mutations qui améliorent cette activité ou cette propriété. Or, les techniques de criblage se perfectionnent constamment et plusieurs méthodes alternatives sont maintenant disponibles. En effet, par le recours à des cellules vivantes contenant des mutants enzymatiques dont le produit de réaction donne lieu à un intermédiaire fluorescent, il est possible de suivre l'apparition de cette fluorescence *in vivo* en triant plus de 10^6 cellules par heure, à l'aide de méthodes cytométriques à flux (FACS)[18]. *In vitro*, certaines méthodes alternatives permettent de cribler plus de 10^5 échantillons par jour à l'aide de techniques d'électrophorèse capillaire, méthode originellement utilisée pour cribler des enzymes qui résolvent des mélanges racémiques* de produits[19]. De plus, Georgiou et ses collaborateurs ont inventé une méthode où chaque cellule contenant un mutant d'une banque d'intérêt est fixée à une bille de polyacrylamide. La population de billes est ensuite soumise à un traitement par coloration. Les cellules contenant les enzymes actives ainsi colorées peuvent être repêchées en allant chercher spécifiquement la bille qui les retient à l'aide d'un microscope et d'un micromanipulateur, ce qui augmente considérablement l'efficacité de criblage[17].

À la lumière de ces progrès, les techniques contemporaines de criblage s'avèrent très puissantes et efficaces. De plus, puisqu'elles sont souvent entreprises *in vitro*, elles permettent à l'expérimentateur d'adapter son système à des conditions plus variées de température et de pH, à des substrats peu solubles dans l'eau ou encore de le soumettre à la présence de contaminations réactionnelles, à des solvants ou des métaux qui seraient autrement toxiques pour les organismes vivants.

* Mélange racémique : Se dit d'un mélange équimolaire de deux énantiomères.

3.4 AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DE L'ÉVOLUTION DIRIGÉE



Par rapport au design rationnel, l'évolution dirigée possède des avantages majeurs qui ne peuvent être négligés. L'un d'eux, très prisé par la communauté scientifique, est que la connaissance de la structure ou du mécanisme catalytique de l'enzyme d'intérêt n'est pas essentielle au processus. En effet, l'évolution dirigée suppose qu'une mutation aléatoirement introduite sur l'enzyme peut avoir un effet positif qui ne pourrait être rationnellement prédit par l'expérimentateur sur le plan structurel ou catalytique. De plus, l'évolution dirigée utilise l'extrême puissance de l'évolution naturelle dans un intervalle de temps très attrayant (de quelques semaines à quelques mois) et favorise la création de catalyseurs puissants dont les propriétés, sous des conditions particulières, seront améliorées. En nature, une telle évolution de l'enzyme ne pourrait jamais se faire puisque ces conditions n'y existent pas (solvant, substrat non-naturel, etc.).

La technique n'est cependant pas sans contraintes et peut laisser perplexes certains expérimentateurs. Mimer l'évolution, via la génération d'une banque de mutants enzymatiques d'intérêt, demeure inutile si l'on ne possède pas un moyen approprié pour sélectionner (ou cribler) cette banque afin de trouver le ou les mutants appropriés. Cette étape s'avère d'ailleurs être la plus ardue du processus méthodologique et peut nécessiter plusieurs années de recherche. De plus, parce qu'elle est souvent spécifique à une situation particulière et ne peut que très rarement être employée dans un contexte enzymatique différent, elle constitue donc un investissement important. Finalement, la modification par évolution dirigée d'une caractéristique particulière d'une enzyme peut générer des mutants d'intérêt mais qui, néanmoins, ont des effets non désirés, à savoir la perte de propriétés qui n'étaient pas sélectionnées au préalable (perte de spécificité, diminution de la stabilité et/ou de la solubilité, etc.). Malgré ces inconvénients, les techniques actuelles d'évolution dirigée demeurent très puissantes et ont conduit à la création de catalyseurs efficaces, fonctionnellement distincts de leur enzyme parente.

(source : NPLL)

4 CONTEXTE D'APPLICATION

(source : IRB)

L'emploi d'enzymes modifiées à titre de catalyseurs s'effectue dans de multiples domaines depuis maintenant plusieurs années et suscite de grands espoirs dans de nombreux champs d'expertise, de la synthèse chimique aux sciences environnementales en y incluant les applications pharmaceutiques, biomédicales et industrielles. Quelques exemples représentatifs de catalyseurs modifiés par évolution dirigée seront ici présentés brièvement. Le lecteur intéressé pourra se référer au Tableau I pour consulter la ou les références se rapportant aux propriétés enzymatiques qu'il recherche.

Tableau I :
Domaines d'application des techniques d'évolution dirigée d'enzymes.

Propriétés enzymatiques évoluées	Références d'intérêt
Modification/Amélioration de l'activité	7
Modification de la spécificité de reconnaissance	20, 21
Modification de l'énantiosélectivité	22
Augmentation de la stabilité thermique	23, 24
Création de fonctions *de novo*	25
Activité en présence de solvant organique	26, 27
Applications industrielles diverses	28-34

4.1 ENVIRONNEMENT ET CHIMIE VERTE

Les techniques d'évolution dirigée d'enzymes ont de nombreuses applications au niveau environnemental, notamment en bioremédiation, pour la dégradation de composés nocifs dont l'élimination chimique génère souvent des produits tout aussi nocifs. C'est d'ailleurs dans cette optique que Furukawa et ses collaborateurs[35] utilisèrent une approche combinée de « brassage de gènes homologues » (*Family Shuffling*) et de mutagenèse ponctuelle pour augmenter le champ de reconnaissance des biphényles dioxygénases. Ils démontrèrent que ces enzymes évoluées peuvent reconnaître et dégrader de nombreuses substances polluantes et chimiquement stables, telles que les biphényles polychlorés (BPC), le toluène, le benzène et les alkylbenzènes. Dans tous les cas, la présence de 2 à 4 mutations seulement fut nécessaire pour augmenter le champ de reconnaissance, champ qui fut également modifié subséquemment par mutagenèse ponctuelle.

Dans la même optique, et s'inspirant du « brassage génétique » (*DNA Shuffling*), Coco *et al.* ont mis au point une technique améliorée d'évolution dirigée, nommée RACHITT[11, 12], qui rendit possible l'évolution de monooxygénases de dibenzothiophène, une famille d'enzymes responsable de la biodésulfuration de combustibles fossiles, tel le diésel. En plus d'améliorer considérablement les événements de recombinaison normalement obtenus par brassage génétique, par la technique RACHITT, on a pu obtenir des enzymes ayant un champ d'activité varié et dont certains mutants démontrèrent une activité spécifique supérieure de 20 fois celle de l'enzyme native pour l'oxydation de l'indole. Étant donné que la spécificité pour l'indole ne correspond pas à l'activité originelle de ce groupe d'enzymes, cet exemple offre une démonstration convaincante des modifications d'activités enzymatiques que peuvent générer les méthodes d'évolution dirigée. Concernant l'amélioration de la biodésulfuration de combustibles fossiles, le véritable but de l'expérience, cette technique a conduit également à la sélection de mutants affichant une activité deux fois supérieure à celle des parents enzymatiques, résultat qu'aucune autre méthode d'évolution dirigée n'avait pu produire.

Bien que ces deux exemples ciblent particulièrement la détoxication, le recours aux enzymes modifiées par évolution dirigée s'applique à une foule de domaines industriels désireux d'exploiter le côté « propre » des enzymes, par opposition à d'autres catalyseurs chimiques dommageables pour l'environnement. À cet égard, les enzymes s'inscrivent parfaitement dans le processus de la chimie verte, soit le développement de nouveaux procédés chimiques qui protègent l'environnement et ne polluent pas.

Une application industrielle probante dans ce domaine est l'emploi de protéases dans des détergents, particulièrement dans les détergents à lessive pour l'élimination de taches. Bien qu'employées depuis un certain temps à cette fin, ces enzymes sont constamment retravaillées afin de mieux les adapter aux milieux réactionnels extrêmes et changeants du nettoyage. Ainsi, Ness et collaborateurs[36] entreprirent d'évoluer par « brassage de gènes homologues » (*Family Shuffling*) la subtilisine (en version commerciale, la Savinase), ainsi que plusieurs membres enzymatiques de cette famille. La création d'une petite banque de 654 mutants différents leur permit de sélectionner des enzymes modifiées possédant jusqu'à quatre fois l'activité de l'enzyme commerciale en terme de thermostabilité, de dépendance au pH et de stabilité en présence de divers solvants. L'adaptation de l'enzyme à ces conditions extrêmes augmenta sa durée de vie et améliora inévitablement son rendement. Bien que les méthodes d'évolution dirigée améliorèrent parfois une caractéristique particulière aux dépens d'une autre, il est intéressant de noter que les auteurs furent en mesure d'obtenir des mutants possédant une activité améliorée pour la combinaison de toutes les caractéristiques décrites ci-haut, comparativement à l'enzyme native. Ces travaux démontrent l'importance des techniques d'évolution dirigée d'enzymes, non seulement pour des applications environnementales, mais également dans l'optimisation de leur efficacité catalytique, caractéristique qui influence fortement leur rentabilité industrielle.

4.2 ALIMENTATION, PÂTES ET PAPIER ET AUTRES APPLICATIONS INDUSTRIELLES

La stabilité en présence de divers solvants, la thermostabilité ou encore la dépendance stricte du pH sont des caractéristiques qui touchent tous les types d'applications enzymatiques au niveau industriel. L'agroalimentaire utilise des enzymes isolées depuis assez longtemps, notamment pour la fabrication de fromages et de jus. De plus, des enzymes comme l'α-amylase, la glucoamylase et l'isomérase de glucose servent à convertir l'amidon en fructose pour la production de sirop de maïs. Or, les étapes nécessaires à cette conversion nécessitent des changements de température extrêmes ainsi que des conditions de pH relativement acides que l'α-amylase ne supporte pas très bien en raison de son instabilité à des pH inférieurs à six unités[37]. Afin d'améliorer son activité dans ces conditions, des études d'évolution dirigée ont été réalisées avec succès. Un remplacement d'à peine quatre à cinq mutations à la surface de cette enzyme s'est avéré suffisant pour améliorer considérablement la stabilité à pH 4,85, par rapport à ce que l'on

observe pour l'enzyme native, dont le taux de dénaturation dans ces conditions est si rapide qu'il est pratiquement non-mesurable[37]. La possibilité de moduler l'activité d'une enzyme par évolution dirigée démontre la puissance de ces techniques pour créer une activité ou provoquer l'apparition d'une propriété désirée. La production de sirop de maïs, par cascade de réactions enzymatiques, figure d'ailleurs parmi les succès notoires de la biocatalyse contemporaine, notamment en raison du pouvoir de modification des enzymes dans le but de les adapter à des conditions de réaction sévères.

L'industrie des pâtes et papier bénéficie aussi de l'utilisation d'enzymes modifiées par évolution dirigée, surtout dans les procédés de blanchiment et de désencollage. Pour ce faire, on se sert d'une glycoprotéine, la laccase, provenant de microorganismes fongiques. Or, cette famille d'enzymes demeure très difficile à exprimer dans des milieux autres que ceux de la source originelle, diminuant considérablement son rendement de production et l'efficacité de son exploitation industrielle. Pour éliminer ce problème et obtenir un rendement de production plus efficace, Bulter et collaborateurs[38] essayèrent différentes étapes d'évolution dirigée à l'aide de diverses techniques, notamment la technique PCR pro-erreurs[6] et l'approche StEP[10]. Ils réussirent non seulement à exprimer l'enzyme dans une souche de levure avec des niveaux d'expression huit fois plus élevés que ce qui avait été auparavant obtenu, mais également à isoler des mutants dont l'activité spécifique était plus de 170 fois celle de l'enzyme native sous les conditions expérimentales utilisées. Cette amélioration considérable de l'expression et de l'activité ouvre la voie à de plus amples études par évolution dirigée de cette enzyme, car elle est également employée dans l'industrie agro-alimentaire, pour la clarification de jus de fruits et, en environnement, pour la dégradation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, des sous-produits hautement toxiques déversés dans des milieux terrestres et aquatiques.

Les exemples d'emploi d'enzymes modifiées par évolution dirigée présentés ici ne représentent qu'une faible partie des nombreuses applications dans lesquelles les enzymes ont été modifiées pour répondre à des besoins industriels spécifiques et tous aussi divers les uns des autres. Les enzymes font désormais partie intégrante des catalyseurs industriels communs. Originairement considérés comme des catalyseurs industriels marginaux, les enzymes, dont l'usage connaît une vive expansion, ont un rôle de plus en plus prometteur à la lumière des études d'évolution dirigée en cours visant à les adapter à divers milieux et/ou à découvrir une activité différente de leur activité originelle. Leur potentiel d'adaptation à diverses applications industrielles a séduit de nombreuses industries québécoises et canadiennes qui concentrent également leurs efforts sur le développement de procédés enzymatiques. Un exemple notable est celui de CO_2 Solution, une compagnie de la région de Québec qui, pour détoxiquer et réduire les impacts environnementaux, a trouvé un moyen d'enrayer de manière saine l'énorme quantité de CO_2 rejetée dans l'air par nos nombreux procédés industriels et par notre mode de vie. Grâce aux technologies enzymatiques, ils ont pu mettre au point un réacteur qui élimine le dioxyde de carbone et le transforme en bicarbonate, un composé tout à fait bénin qui peut être réutilisé à diverses fins. Leur réacteur est actuellement en phase industrielle d'essai et les résultats semblent prometteurs[39].

4.3 SYNTHÈSE ORGANIQUE ET APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES

La synthèse chimique s'est montrée, jusqu'à ce jour, plutôt réfractaire à l'utilisation d'enzymes, en particulier parce que l'absence de robustesse de ces catalyseurs en présence de solvants organiques compromet grandement leur efficacité. Bien que les lipases constituent une classe d'enzymes qui fait exception à cette règle, en raison de leur rôle physiologique adapté aux membranes lipidiques des cellules vivantes (des conditions apolaires se rapprochant des solvants organiques), la plupart des enzymes sont dénaturées lorsqu'une certaine concentration de solvant organique est additionnée au milieu aqueux. Par contre, les procédés industriels de synthèse chimique nécessitent souvent l'utilisation de tels solvants et l'évolution dirigée permet d'améliorer la stabilité des enzymes dans ces solvants mixtes.

Chen et Arnold[40] ont donné un exemple classique d'amélioration de l'activité enzymatique en présence d'un solvant organique dans lequel la subtilisine E, une protéase à sérine fonctionnant à l'origine exclusivement en milieu aqueux, fut modifiée par trois cycles de mutagenèse aléatoire, par la méthode PCR pro-erreurs[6]. Ils ont obtenu une enzyme 256 fois plus efficace que l'enzyme native dans un solvant aqueux contenant 60 % de diméthylformamide (DMF). Une dizaine de mutations concentrées à la surface de la protéine furent nécessaires pour acquérir cette propriété, ce qui s'avère, somme toute, être un nombre relativement faible. Les auteurs ont d'ailleurs démontré que ces mutations se situaient dans des boucles très variables près du site actif et suggèrent que cette variabilité pourrait servir à moduler les propriétés de cette enzyme à diverses fins. Cet exemple démontre bien l'efficacité des

techniques d'évolution dirigée à modifier les enzymes afin de les adapter à des milieux organiques autres que leur milieu biologique naturel.

La modification d'enzymes en synthèse organique peut également aider à résoudre des mélanges racémiques afin que ces enzymes puissent ne reconnaître qu'un seul énantiomère*. Cette caractéristique est d'ailleurs très prisée par l'industrie pharmaceutique et biomédicale dans la synthèse de nouveaux médicaments énantiomériquement purs, c'est-à-dire ne contenant que l'énantiomère désiré. En ce sens, Reetz et ses collaborateurs[41] ont réussi à modifier la sélectivité d'une lipase de *Pseudomonas aeruginosa* pour le 2-méthyldécanoate avec un excès énantiomérique de 93 % en faveur du conformère (S) alors que l'excès énantiomérique de l'enzyme native n'est que de 2 %. Une mutagenèse aléatoire par PCR pro-erreurs[6] a conduit à la découverte de cinq mutations, éloignées du site actif et nécessaires à cette modification de sélectivité. Ces essais furent suivis d'une approche de mutagenèse ponctuelle par saturation (introduction des 20 acides aminés) à ces cinq positions dans le but d'affiner les propriétés des mutants obtenus. Ces travaux montrent bien la puissance de l'évolution dirigée puisque ces 5 mutations n'auraient pu être prédites par le seul design rationnel. En revanche, le couplage de l'évolution dirigée suivie d'une approche semi-rationnelle (mutagenèse par saturation) permet néanmoins dans plusieurs cas d'améliorer l'efficacité de la caractéristique désirée.

L'amélioration de l'activité d'enzymes, en synthèse organique, accentue le potentiel de ces biocatalyseurs dans des conditions de réaction qui diffèrent de la simple solution aqueuse. De plus, la modification de leurs propriétés afin d'effectuer des réactions différentes de leur action biologique originelle ouvre la voie à l'utilisation des enzymes dans une multitude de réactions chimiques difficilement réalisables par les approches classiques de synthèse.

* *Énantiomère* : Isomère de configuration superposable à son homologue après symétrie dans un miroir.

5 CONCLUSION

Bien qu'évolutivement confinées aux systèmes biologiques, les enzymes ont pu être à ce point modifiées efficacement par l'ingénierie enzymatique qu'elles constituent maintenant une solution alternative intéressante pour la catalyse industrielle. L'approche rationnelle par mutagenèse ponctuelle a favorisé leur modification spécifique, mais ce n'est qu'avec l'apparition des techniques d'évolution dirigée, de mutagenèse aléatoire et de « brassage génétique » que les résultats commencèrent à être concrètement applicables à des situations particulières, préalablement définies par l'expérimentateur. La puissance de ces techniques de création d'un grand nombre de mutants, couplée au développement d'une stratégie de sélection ou de criblage appropriée, rend possible le ciblage des besoins spécifiques d'une industrie ou d'un expérimentateur. Ce processus est maintenant de plus en plus concret, simple et rentable. De plus, la combinaison séquentielle de différentes techniques d'évolution dirigée et la modification rationnelle subséquente des mutants d'intérêt donnent des résultats d'efficacité catalytique qui dépassent souvent les espérances initiales. La rapidité avec laquelle les nouvelles techniques d'ingénierie enzymatique s'implantent laisse entrevoir une amélioration continuelle des techniques de modification d'enzymes et présager pour les catalyseurs enzymatiques modifiés un avenir des plus prometteurs.

(source : PNLL)

NOTE :

Plusieurs des techniques d'évolution dirigée décrites dans cette fiche technique sont brevetées et nécessitent l'obtention de permissions d'exploitation préalablement à leur utilisation.

RÉFÉRENCES

1. Lander, E.S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409, 860-921 (2001).
2. Benkovic, S.J. & Hammes-Schiffer, S. A perspective on enzyme catalysis. Science 301, 1196-1202 (2003).
3. Beavis, R. The Enzyme Commission Classification Scheme. http://65.219.84.5/prowl/aainfo/enzymes/enzymes.htm (Page accédée le 16 mars 2004).
4. Arnold, F.H. Design by Directed Evolution. Accounts of Chemical Research 31, 125-131 (1998).
5. Brakmann, S. Discovery of superior enzymes by directed molecular evolution. Chembiochem 2, 865-871 (2001).
6. Cirino, P.C., Mayer, K.M. & Umeno, D. Generating mutant libraries using error-prone PCR. Methods Mol Biol 231, 3-9 (2003).
7. Stemmer, W.P. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. Nature 370, 389-391 (1994).
8. Kikuchi, M. & Harayama, S. DNA shuffling and family shuffling for in vitro gene evolution. Methods Mol Biol 182, 243-257 (2002).
9. Crameri, A., Dawes, G., Rodriguez, E., Jr., Silver, S. & Stemmer, W.P. Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling. Nat Biotechnol 15, 436-438 (1997).
10. Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J.A. & Arnold, F.H. Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. Nat Biotechnol 16, 258-261 (1998).
11. Coco, W.M., Levinson, W.E., Crist, M.J., Hektor, H.J., Darzins, A., Pienkos, P.T., Squires, C.H. & Monticello, D.J. DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. Nat Biotechnol 19, 354-359 (2001).
12. Pelletier, J.N. A RACHITT for our toolbox. Nat Biotechnol 19, 314-315 (2001).
13. Sieber, V., Martinez, C.A. & Arnold, F.H. Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. Nat Biotechnol 19, 456-460 (2001).
14. Gibbs, M.D., Nevalainen, K.M. & Bergquist, P.L. Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling. Gene 271, 13-20 (2001).
15. Amstutz, P., Pelletier, J.N., Guggisberg, A., Jermutus, L., Cesaro-Tadic, S., Zahnd, C. & Pluckthun, A. In vitro selection for catalytic activity with ribosome display. J Am Chem Soc 124, 9396-9403 (2002).
16. Dower, W.J. & Mattheakis, L.C. In vitro selection as a powerful tool for the applied evolution of proteins and peptides. Curr Opin Chem Biol 6, 390-398 (2002).
17. Cohen, N., Abramov, S., Dror, Y. & Freeman, A. In vitro enzyme evolution: the screening challenge of isolating the one in a million. Trends in Biotechnology 19, 507-510 (2001).
18. Olsen, M.J., Stephens, D., Griffiths, D., Daugherty, P., Georgiou, G. & Iverson, B.L. Function-based isolation of novel enzymes from a large library. Nat Biotechnol 18, 1071-1074 (2000).
19. Reetz, M.T., Kuhling, K.M., Deege, A., Hinrichs, H. & Belder, D. Super-high-throughput screening of enantioselective catalysts by using capillary array electrophoresis. Angewandte Chemie-International Edition 39, 3891-+ (2000).
20. Schmidt-Dannert, C. Engineering novel carotenoids in microorganisms. Curr Opin Biotechnol 11, 255-261 (2000).
21. Hansson, L.O., Widersten, M. & Mannervik, B. An approach to optimizing the active site in a glutathione transferase by evolution in vitro. Biochem J 344 Pt 1, 93-100 (1999).
22. Jaeger, K.E., Eggert, T., Eipper, A. & Reetz, M.T. Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. Appl Microbiol Biotechnol 55, 519-530 (2001).
23. Lehmann, M. & Wyss, M. Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. Curr Opin Biotechnol 12, 371-375 (2001).
24. Lehmann, M., Pasamontes, L., Lassen, S.F. & Wyss, M. The consensus concept for thermostability engineering of proteins. Biochim Biophys Acta 1543, 408-415 (2000).
25. Bolon, D.N., Voigt, C.A. & Mayo, S.L. De novo design of biocatalysts. Curr Opin Chem Biol 6, 125-129 (2002).
26. Carrea, G. & Riva, S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. Angewandte Chemie-International Edition 39, 2226-2254 (2000).
27. Klibanov, A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature 409, 241-246 (2001).
28. Chirumamilla, R.R., Muralidhar, R., Marchant, R. & Nigam, P. Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. Mol Cell Biochem 224, 159-168 (2001).
29. Schmidt-Dannert, C. & Arnold, F.H. Directed evolution of industrial enzymes. Trends Biotechnol 17, 135-136 (1999).
30. Zhao, H., Chockalingam, K. & Chen, Z. Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. Curr Opin Biotechnol 13, 104-110 (2002).
31. Arnold, F.H. & Moore, J.C. Optimizing industrial enzymes by directed evolution. Adv Biochem Eng Biotechnol 58, 1-14 (1997).
32. Bull, A.T., Bunch, A.W. & Robinson, G.K. Biocatalysts for clean industrial products and processes. Curr Opin Microbiol 2, 246-251 (1999).
33. Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. & Witholt, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. Nature 409, 258-268 (2001).
34. Kirk, O., Borchert, T.V. & Fuglsang, C.C. Industrial enzyme applications. Curr Opin Biotechnol 13, 345-351 (2002).
35. Suenaga, H., Mitsuoka, M., Ura, Y., Watanabe, T. & Furukawa, K. Directed evolution of biphenyl dioxygenase: emergence of enhanced degradation capacity for benzene, toluene, and alkylbenzenes. J Bacteriol 183, 5441-5444 (2001).
36. Ness, J.E., Welch, M., Giver, L., Bueno, M., Cherry, J.R., Borchert, T.V., Stemmer, W.P. & Minshull, J. DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin. Nat Biotechnol 17, 893-896 (1999).
37. Shaw, A., Bott, R. & Day, A.G. Protein engineering of alpha-amylase for low pH performance. Curr Opin Biotechnol 10, 349-352 (1999).
38. Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C. & Arnold, F.H. Functional expression of a fungal laccase in Saccharomyces cerevisiae by directed evolution. Appl Environ Microbiol 69, 987-995 (2003).
39. Maillé, M.-E. L'enzyme de l'espoir. L'Actualité 27 (17), 42-43 (2002).
40. Chen, K. & Arnold, F.H. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 5618-5622 (1993).
41. Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. & Jaeger, K.E. Directed evolution of an enantioselective lipase. Chem Biol 7, 709-718 (2000).

Pour toute INFORMATION, veuillez vous adresser au :

CQVB

Édifice Le Delta II
2875, boul. Laurier
bureau 620
Sainte-Foy (Québec)
G1V 2M2

Tél. : (418) 657-3853
Téléc. : (418) 657-7934
Courriel : cqvb@cqvb.qc.ca
Internet : www.cqvb.qc.ca

Direction et coordination :
Michel Lachance

Révision linguistique :
Lise Gascon

Mise en page :
Alain Gingras
Communication Conseil

Version électronique :
www.cqvb.qc.ca/publications_home.htm

Reproduction non autorisée

Dépôt légal
Bibliothèque nationale du Québec
Bibliothèque nationale du Canada

Poste-publications no. 40031048

Vol. 3, no. 1, Avril 2004

© CQVB 2004

RÉDACTEURS

Nicolas Doucet[1] et Joelle N. Pelletier[2]

1 Étudiant au doctorat, Département de biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal, 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7

2 Professeure adjointe, Département de chimie, Faculté des arts et des sciences, Université de Montréal, 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7

PARTENAIRE FINANCIER DU CQVB

Développement économique et régional et Recherche
Québec