Chimie verte, biocatalyse et biomimétisme

Dès leurs débuts, les industries chimique, pharmaceutique ou agro-alimentaire se sont orientées vers l'utilisation d'enzymes pour mettre au point des procédés de production efficaces. Ces dernières catalysent des réactions chimiques avec un coût énergétique minimal tout en ne générant que peu de déchets. Les performances, à ce jour inégalées, de ces biomolécules sont cependant liées à des conditions de milieu, de température et de pression restreintes, qui limitent leur emploi dans l'industrie. **Avec l'essor de la chimie verte, de nouveaux procédés, concernant aussi bien l'amélioration des performances des réactions enzymatiques par des méthodes biotechnologiques que la conception d'enzymes artificielles inspirées par leurs homologues naturelles, pour la production de bioénergie par exemple, sont en plein développement.**

C. Dupont/CEA

P. Avavian/CEA

À gauche, automates de culture continue permettant d'accélérer l'évolution de souches microbiennes ou d'enzymes *in vivo* pour des utilisations biotechnologiques. À droite, photoproduction bio-inspirée d'hydrogène. L'hydrogène est produit à partir de l'eau sous l'action d'un photocatalyseur inorganique inspiré du fonctionnement des hydrogénases lors de la photosynthèse.

Les apports de la chimie sont incontestables dans tous les domaines : alimentation, matériaux de la vie quotidienne, habillement, céramiques, colorants ou matières plastiques, santé ou énergie. L'industrialisation lui a permis de couvrir de nombreux besoins de la société mais, du fait de ce caractère industriel, les procédés et les productions sont à l'origine de pollutions et contribuent à l'épuisement de ressources limitées. Le développement de nouveaux procédés, dits de chimie verte, a été promu pour réduire les effets indésirables de l'industrie chimique. Cette chimie s'appuie notamment sur la catalyse, une technologie-clé qui rend possible la réalisation de réactions chimiques à un coût énergétique moins élevé et avec une meilleure sélectivité, tout en conduisant à une diminution importante de la quantité de déchets générés (solvants, produits secondaires non valorisables).

Les propriétés des catalyseurs

Un catalyseur est une petite molécule, une macromolécule ou un matériau solide qui interagit, de manière transitoire et hautement sélective, avec une ou plusieurs des espèces chimiques d'une réaction en abaissant l'énergie d'activation de cette dernière. Il permet d'orienter la réaction vers un produit majoritaire avec de bons rendements, dans des conditions relativement douces. En outre, à l'issue de la réaction, le catalyseur retrouve son état initial, si bien qu'il peut contribuer successivement à la transformation d'un grand nombre (idéalement une infinité) de molécules. Une très faible quantité de catalyseur est ainsi nécessaire. Ceci explique que l'industrie chimique ait cherché de manière constante durant ces cinquante dernières années à introduire la catalyse dans les procédés de synthèse mis en œuvre. La recherche de nouveaux catalyseurs, toujours plus sélectifs et robustes, est l'une des approches les plus développées en chimie industrielle et, de fait, 80 % des produits manufacturés résultent d'une étape effectuée *via* un processus catalytique. Mais où découvrir ces nouveaux catalyseurs ? C'est probablement dans la Nature que se trouvent les plus performants, les enzymes. Ces protéines catalysent en milieu aqueux, avec un faible coût énergétique et dans des conditions généralement douces de température et de pH, des milliers de réactions hautement chimio-, régio- et stéréosélectives, sans générer de sous-produits toxiques. Certaines sont utilisées comme catalyseurs dans des processus industriels ou domestiques de synthèses ou de biodégradations. Les chercheurs tentent aussi de les imiter, soit en élaborant des protéines artificielles capables de catalyser des réactions originales, soit en concevant des assemblages de molécules issues de la chimie de synthèse et aptes à reproduire des réactions effectuées par les enzymes dans des systèmes biologiques. Plusieurs laboratoires du CEA sont directement impliqués dans ces différentes alternatives biocatalytiques ou bio-inspirées.

Enzymes, biocatalyse et chimie de synthèse

Dans la pratique, deux grandes voies offrent la possibilité de tirer profit des propriétés des enzymes.
Historiquement, la première a consisté à utiliser directement les organismes vivants pour réaliser les transformations chimiques recherchées en vue d'obtenir un produit d'intérêt (figure 1). C'est la manière la plus verte, qui permet notamment d'accomplir *in vivo*, à un coût énergétique minimal, une succession de réactions en se servant de la biomasse comme matière première. Ainsi, ces procédés suscitent à l'heure actuelle un grand regain d'intérêt. Les levures et bactéries provenant de milieux naturels ont été les premiers microorganismes employés pour catalyser une ou plusieurs étapes réactionnelles du processus de production d'un composé chimique. Leurs rendements ont par la suite été améliorés par

des méthodes génétiques, puis par génie génétique. Aujourd'hui, des gènes issus de la biodiversité, codant des voies complètes de biosynthèse, parfois totalement inédites, sont introduits dans des microorganismes (figure 1). L'introduction de ces voies biosynthétiques exogènes est parfois mal tolérée par les cellules hôtes, allant jusqu'à compromettre leur viabilité. Pour aider ces cellules à se réadapter, on peut, dans certains cas, les laisser évoluer dans des automates de culture permettant d'alterner les conditions de croissance (voir l'illustration de gauche, p. 78). Les rendements sont également améliorés *via* l'optimisation des régulations et des équilibres chimiques au sein des cellules.

La seconde voie repose sur la mise en œuvre des enzymes elles-mêmes, en solution ou immobilisées. La panoplie d'enzymes connues et utilisables pour des applications industrielles reste cependant limitée et leurs qualités (efficacité, robustesse...) sont souvent insuffisantes. Outre l'amélioration de leurs propriétés par les méthodes d'évolution dirigée de gènes qui peut être pratiquée à l'aide des automates de culture mentionnés précédemment, il est possible d'explorer la biodiversité enzymatique pour découvrir de nouveaux biocatalyseurs. Les bases de données de séquences d'ADN regorgent en effet de gènes codant des fonctions inconnues, notamment des activités biocatalytiques inédites. Le Genoscope de l'Institut de génomique (IG) a entrepris d'exploiter ces gigantesques collections pour y trouver des gènes codant de nouvelles activités. Ce travail débute par la recherche de gènes candidats par des méthodes bioinformatiques. Ces candidats sont ensuite criblés à l'aide de tests à grande échelle sur des composés non physiologiques pour détecter des enzymes susceptibles de catalyser une transformation nouvelle, en s'appuyant sur le phénomène de promiscuité par lequel une enzyme donnée peut catalyser une réaction chimique sur différents composés chimiquement proches.

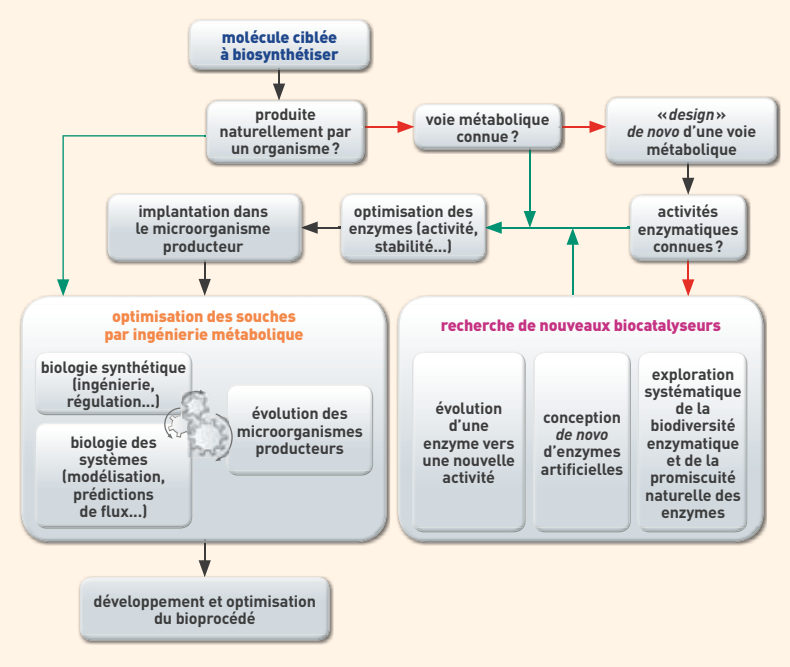
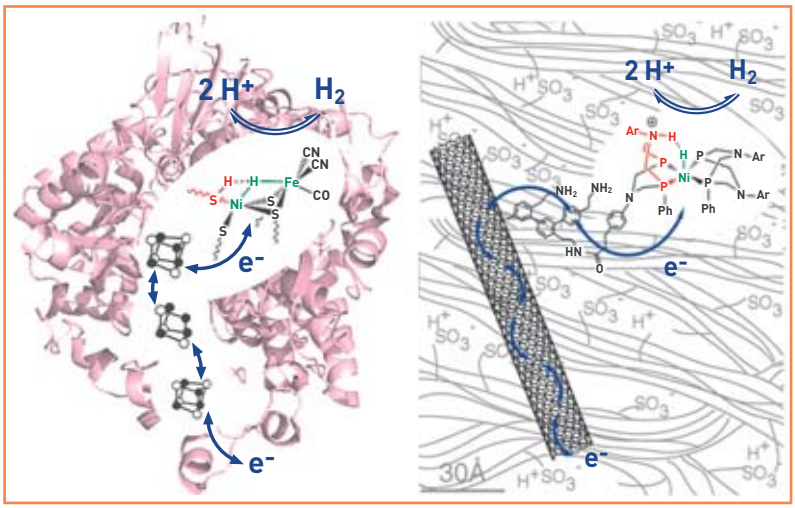


Figure 1.
Stratégie mise en œuvre pour la production d'une molécule par un microorganisme.
Les flèches vertes indiquent l'action suivie en cas de réponse positive à la question posée, contrairement aux flèches rouges qui renvoient vers une autre alternative.

Biocatalyse et bioénergie

Les biotechnologies pour l'énergie sont en plein développement. Les hydrogénases[1] sont particulièrement intéressantes pour la production ou l'utilisation de l'hydrogène. Elles s'adsorbent spontanément sur certaines électrodes de carbone, les couvrent d'un film protéique et catalysent de manière remarquable, aussi bien que le platine dans certaines conditions, la production d'hydrogène ou son oxydation. La cristallographie révèle que leur site actif est un cluster[2] binucléaire (figure 2) où deux atomes métalliques de nickel (Ni) et/ou de fer (Fe) sont connectés par des atomes de soufre (S), appartenant, soit à des résidus cystéine[3] de la chaîne protéique – cas des hydrogénases nickel-fer (NiFe) –, soit constitutifs d'un petit ligand dithiométhylamine – cas des hydrogénases fer-fer (FeFe). Les atomes de fer sont, de plus, coordinés par des ligands monoxyde de carbone (CO) et cyanure (CN^-). Des sites basiques, comme certains ligands thiolates terminaux du site actif des hydrogénases NiFe ou la fonction amine du ligand dithiométhylamine des hydrogénases FeFe, jouent un rôle crucial en facilitant les réactions de protonation ou de déprotonation[4] au cours du cycle catalytique.

La structure cristallographique des hydrogénases montre également la présence d'une chaîne de clusters fer-soufre, distants les uns des autres de moins de 15 Å. Cette dernière permet aux électrons de circuler entre le site actif et la surface de la protéine, où ils sont amenés ou d'où ils sont extraits par les partenaires physiologiques des hydrogénases[5], réductases notamment. Les équipes de l'IBS (Institut de biologie structurale) ont mis en



CEA/DSV

Figure 2.
À gauche, représentation schématique de la structure d'une hydrogénase NiFe. Les résidus cystéine (〰 S), ligands des centres métalliques, sont symbolisés par leur atome de soufre. La cystéine terminale, fonctionnant comme une base dans le mécanisme catalytique, apparaît en rouge. L'interaction entre le ligand hydrure (H^-) coordiné au site actif (en vert) et un proton porté par ce site basique est représentée par des pointillés. Les flèches bidirectionnelles bleues montrent les échanges d'électrons entre les centres fer-soufre de l'hydrogénase et le catalyseur. À droite, représentation schématique de la structure et de la réactivité du matériau obtenu par greffage du catalyseur bio-inspiré nickel-bisdiphosphine sur les nanotubes de carbone enchâssés dans un film de Nafion®. Les fonctions amine du ligand diphosphine sont indiquées en rouge. L'interaction entre le ligand hydrure (H^-) porté par l'atome de nickel (en vert) et un proton porté par une fonction amine est représentée par des pointillés. Les flèches bidirectionnelles bleues montrent les échanges d'électrons entre les nanotubes et le catalyseur.

(1) Hydrogénases : enzymes qui peuvent, soit produire de l'hydrogène à partir des protons H^+ de l'eau et d'électrons, soit l'oxyder.

(2) Cluster : agrégat de plusieurs atomes.

(3) Cystéine : acide α-aminé naturel possédant un groupement thiol (–SH).

(4) Protonation/déprotonation : réaction chimique au cours de laquelle un proton H^+ est ajouté/retiré à une molécule.

(5) Dans les systèmes biologiques, les réactions d'oxydation (perte de un ou plusieurs électrons) et de réduction (gain de un ou plusieurs électrons) sont catalysées par, respectivement, des oxydases et des réductases.

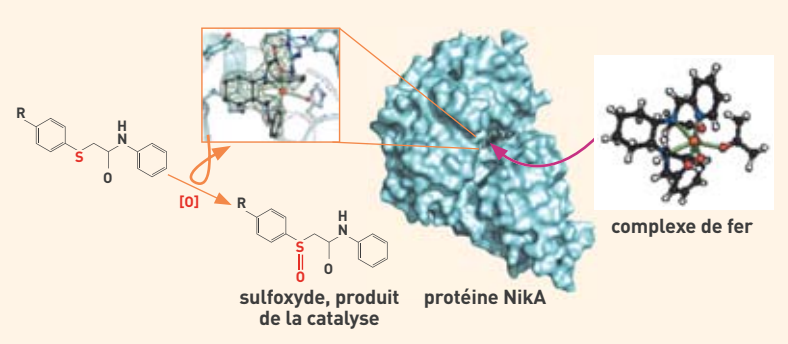


Figure 3.
L'introduction d'un complexe de fer au sein de la poche hydrophobe de NikA, une protéine de transport de nickel, permet son activation pour la catalyse de transfert d'un atome d'oxygène, pour former un sulfoxyde. Le produit de la catalyse est un analogue potentiel de l'oméprazole, inhibiteur de la pompe à protons dans les muqueuses de l'estomac chez l'homme. La position du catalyseur chimique est identifiée par cristallographie des protéines.

évidence un chemin préférentiel au sein de la protéine pour le transfert des protons et pour la circulation des gaz. De fait, les hydrogénases sont de véritables petites usines à hydrogène dont la logistique est optimisée.

La chimie bio-inspirée et les enzymes artificielles

Les enzymes sont des biomolécules fragiles, qui le plus souvent ne développent leur activité que dans l'eau, dans des conditions assez restreintes de température, de pH ou de **force ionique**, et qui nécessitent des partenaires physiologiques. Une solution consiste à imiter le fonctionnement enzymatique pour élaborer des catalyseurs, dits bio-inspirés. Grâce à la connaissance, au niveau moléculaire, de la structure du site actif d'une enzyme, le chimiste peut, soit en faire une copie synthétique fidèle (modèle biomimétique), soit inventer de nouveaux catalyseurs s'inspirant de son mécanisme de fonctionnement ou de ses interactions avec ses partenaires biologiques (modèle bio-inspiré). Cette approche permet d'utiliser des éléments chimiques ou des combinaisons d'atomes que la Nature n'a ni explorées, pour des questions de biodisponibilité, ni sélectionnées, en raison par exemple de leur toxicité durant l'évolution. De tels catalyseurs présentent de multiples avantages. Faciles à synthétiser et peu coûteux à produire à grande échelle car ils ne renferment généralement pas de **métaux nobles** ou rares, ils peuvent, contrairement aux enzymes dont ils s'inspirent, être employés dans de nombreux solvants et dans une large gamme de température ou de pression. Ils sont également moins sensibles à l'oxydation par l'oxygène de l'air.

La conception d'hydrogénases artificielles

Les **complexes** bisdiphosphine de nickel sont un exemple de catalyseurs bio-inspirés de la structure du site actif des hydrogénases. Ils combinent des éléments structuraux pris aux sites actifs des deux types d'hydrogénases : l'ion nickel des hydrogénases NiFe et une fonction amine, incorporée cette fois dans un ligand diphosphine plutôt que dans le cofacteur dithiolate des hydrogénases FeFe. L'un de ces complexes a été choisi par une équipe du Laboratoire de chimie et biologie des métaux de l'Institut de recherches en technologies et sciences pour le vivant (iRTSV) pour développer, en collaboration avec une équipe de l'Iramis (Institut rayonnement matière de Saclay/Direction des sciences de la matière), le premier matériau sans métal noble capable de catalyser, comme le fait le platine, aussi bien la production d'hydrogène à partir de l'eau (pour une utilisation dans les **électrolyseurs**) que son oxydation (pour un emploi dans les **piles à combustible**). En greffant le catalyseur bio-inspiré sur des nanotubes de carbone et en incorporant cet assemblage au sein d'une matrice de Nafion®(6), il a été possible d'optimiser la logistique d'approvisionnement du site catalytique en protons et électrons, exactement comme cela est organisé au sein des hydrogénases (figure 2).

Les métallo-enzymes artificielles

Le contrôle de l'environnement proche du site où se déroule la catalyse est crucial pour l'optimisation de son activité. Ceci peut être obtenu *via* une approche originale consistant à créer des objets hybrides basés sur l'insertion d'un catalyseur inorganique au sein d'une protéine. On parle alors de métallo-enzymes artificielles. L'activité de l'enzyme artificielle est contrôlée par la nature du composant synthétique tandis que sa sélectivité dépend de la charpente protéique, ce qui permet à la fois d'obtenir des catalyses originales (des réactions non répertoriées par la biocatalyse) dans des conditions douces et de favoriser la sélectivité de la réaction visée. Il est ainsi possible de contrôler la stabilité de la protéine formée et de maîtriser les coûts de production. De récents résultats acquis au Laboratoire de chimie et biologie des métaux de l'iRTSV démontrent le potentiel des métallo-enzymes artificielles dans le cadre de réactions d'hydroxylations aromatiques(7) ou d'oxydations de sulfures. En collaboration avec le groupe Métalloprotéine de l'IBS, un nouveau type d'oxydases(5) efficaces de thioéthers (R—S—R') a été élaboré en fixant, par des **liaisons supramoléculaires**, un catalyseur bio-inspiré à base de fer au sein d'une protéine de transport de nickel, NikA (figure 3). Le complexe de fer n'est actif que s'il est inséré dans la protéine, démontrant ainsi la synergie des deux partenaires formant l'hybride. Un autre volet, plus fondamental, a permis de développer une nouvelle technique pour disséquer un mécanisme catalytique d'hydroxylation aromatique en alliant cristallographie des protéines et catalyse bio-inspirée.

Les procédés biologiques, alternative aux procédés industriels

Du fait de la crise énergétique et des contraintes environnementales, notre société va devoir proposer des alternatives à un grand nombre de pratiques industrielles existantes. Beaucoup de ces alternatives vont reposer sur la mise au point de procédés totalement ou partiellement biologiques ou s'inspirant directement des solutions mises en œuvre par la Nature. Plusieurs laboratoires de la Direction des sciences du vivant se sont déjà engagés activement et avec succès dans l'exploration de ces différentes voies. Le CEA contribue ainsi au développement d'alternatives énergétiques et de procédés biotechnologiques durables.

> **Vincent Artero**[1], **Véronique de Berardinis**[2], **Stéphane Ménage**[1] et **Jean Weissenbach**[2]
[1]Institut de recherches en technologies et sciences pour le vivant (iRTSV)
Direction des sciences du vivant
CEA Centre de Grenoble

[2]Institut de génomique (IG)/Genoscope
Direction des sciences du vivant
Évry

(6) Nafion® : **polymère** fluoré échangeur de protons H^+.

(7) Hydroxylation aromatique : ajout d'un groupement hydroxyle (OH) au cycle d'une molécule.