

Biotechnologie des archées

La majorité des enzymes utilisées dans l'industrie provient des bactéries et des levures. Mais les conditions extrêmes dans lesquelles se développent de nombreuses espèces d'archées font que leurs constituants cellulaires possèdent des propriétés et une stabilité propices à leur utilisation en biotechnologie.

Joël Querellou

Les archées occupent de nombreuses niches écologiques extrêmes sur Terre (**lire l'article p. 30**). Leur distribution n'est pas restreinte à ces environnements, et des groupes comme les méthanogènes sont ubiquistes et abondants dans les sédiments lacustres ou marins, et dans le tractus digestif des ruminants ou des monogastriques. La première contribution biotechnologique des archées, sans autre intervention que celle de l'évolution, repose ainsi sur la participation de certaines espèces à la dégradation des polysaccharides complexes (notamment lignocellulosiques), permettant leur digestion par des hôtes ne possédant pas le registre d'enzymes requises. Cette digestion produit des quantités abondantes de méthane qui contribuent à l'effet de serre.

Les recherches métagénomiques qui visent à caractériser la structure et le rôle des populations microbiennes du tractus digestif de l'homme et des principaux ruminants domestiques en sont encore à leurs débuts. Les travaux visant à modifier les populations d'archées de l'appareil digestif des mammifères supérieurs sont donc encore embryonnaires, ce qui s'explique également par le fait que la manipulation d'écosystèmes microbiens complexes tels ceux du tractus digestif de ruminants est extrêmement difficile sur le long terme : la tendance au retour à une situation d'équilibre a été démontrée après des traitements aux antibiotiques ou lors de prescriptions de probiotiques.

Ces difficultés n'ont pas empêché certains chercheurs d'envisager un contrôle de ces populations microbiennes pour réduire la production de méthane par les troupeaux, en éliminant, inhibant ou modifiant le métabolisme des méthanogènes.

Les travaux d'André-Denis Wright et ses collègues sur les vaccins antiméthanogènes pour les moutons ont démontré une modification dans la structure des populations de méthanogènes mais sans réduction de la production de méthane (1).

Une autre piste a récemment été évoquée : modifier les populations microbiennes des ruminants en inhibant le

développement des méthanogènes et en introduisant des espèces productrices d'acétate, source potentielle d'énergie complémentaire pour les animaux, à l'inverse du méthane. Une option à long terme consisterait à modifier les voies métaboliques des micro-organismes dominants du rumen^{*1} et à court-circuiter la méthanogénèse au profit de l'acétogénèse. Ce type d'approche pose néanmoins des questions d'éthique non résolues.

Utilisation de cellules entières d'archées en biotechnologie

L'une des premières applications possibles est la bio-lixiviation^{*2}, utilisée essentiellement pour concentrer les métaux (cuivre, or et uranium) lorsque les concentrations initiales de minerai sont faibles et les procédés chimiques conventionnels non rentables. Cette approche, développée en Afrique du Sud, au Brésil et en Australie, fait en général appel à des cultures de bactéries mésophiles des genres *Thiobacillus*, *Acidithiobacillus* et *Leptospirillum*. Toutefois, différents travaux ont mis en évidence l'intérêt des archées *Pyrobaculum*, *Pyrococcus*, *Sulfolobus* et *Metallosphaera*. Bien qu'adaptées à des traitements en milieu ouvert, ces espèces hyperthermophiles et thermocacidophiles satisfont aux exigences de fonctionnement à haute température en réacteurs contrôlés pour le traitement de certains minerais comme la chalcopryrite ou la pyrite.

Un second type d'application est directement lié aux caractéristiques de certaines archées halophiles extrêmes. Seules espèces vivantes capables de se développer dans des saumures proches de la saturation, elles sont aussi les seules aptes à être utilisées en bioremédiation^{*3} en cas de contamination par divers produits chimiques, métaux lourds, radionucléides ou composés halogénés. Ainsi, *Haloferax mediterranei* est capable d'utiliser le pétrole brut, *Halobacterium* sp.

UMR 6197, Laboratoire de microbiologie des environnements extrêmes, Ifremer, Centre de Brest
jquerell@ifremer.fr

*1 Panse

*2 Utilisation de micro-organismes pour transformer les minéraux solides en forme soluble

*3 Utilisation des systèmes biologiques (micro-organismes ou plantes) pour dépolluer tous les types de milieux : air, eau ou sol

(1) Williams YJ *et al.* (2009)
Appl Environ Microbiol 75,
1860-6

peut dégrader les *n*-alcanes à chaîne carbonée comportant 10 à 30 carbones à des teneurs de 30 % en NaCl (teneur de l'eau de mer). Ces même genres et *Haloarcula* peuvent dégrader les composés halogénés comme les trichlorophénols et le lindane.

Utilisation des lipides d'archées

L'une des caractéristiques les plus remarquables des archées concerne la structure chimique des lipides membranaires. Ceux des bactéries et des eucaryotes possèdent des constituants de base comme les phosphoglycérides qui contiennent des liaisons esters et une tête polaire et peuvent donc former des bicouches séparant deux compartiments aqueux. Les lipides d'archées sont caractérisés notamment par la présence de liaisons éthers entre le glycérol et les chaînes d'acides gras et par les propriétés originales des lipides tétraéther bipolaires leur permettant de générer des films monocouches stables.

Ces lipides bipolaires atypiques jouent un rôle important dans l'adaptation aux conditions extrêmes des milieux où prolifèrent les archées. Ils ont également suscité un intérêt marqué pour leurs propriétés singulières et leurs applications biotechnologiques potentielles pour la réalisation de films lipidiques monocouches particuliers ou la production de liposomes d'archées (archaeosomes).

L'utilisation de ces films lipidiques tétraéther monocouches permet la création de membranes artificielles dont les propriétés de (thermo)stabilité, d'isolation et de perméabilité sont intéressantes pour des traitements de surface et le développement de matériaux biomimétiques.

Les archaeosomes peuvent être constitués à partir des lipides membranaires d'archées. Cependant, les difficultés techniques de purification entraînent une variabilité dans leur composition, certaines éléments moléculaires n'ayant pu être éliminés. Cette difficulté peut être contournée en recherchant des analogues synthétiques. La stabilité des archaeosomes aux hautes températures, aux pH alcalins, aux phospholipases, aux estérases et aux sels biliaires est très élevée : certains archaeosomes peuvent être stérilisés par autoclavage sans altération de structure. Ils présentent de plus un profil de toxicité acceptable chez la souris par voie orale et en injection intraveineuse, et ciblent naturellement les cellules phagocytiques mononucléaires avec une efficacité 50 fois supérieure à celle de liposomes à liaisons esters (2).

Plusieurs brevets ont été déposés dans ce domaine mais leur utilisation en routine à grande échelle pour des formulations de vaccins et la vectorisation de gènes ou de molécules actives (3) se heurte encore à de multiples obstacles (toxicité, ciblage, dégradation in vivo). Mais l'utilisation des archaeosomes ne se limite pas à la santé humaine : des recherches sont également menées en santé animale à des fins de vaccination (4).

Polymères d'archées

Deux types de molécules présentent un intérêt particulier : les polyhydroxyalkanoates (PHA), intracellulaires, peuvent être utilisés comme plastiques biodégradables, tandis que les exopolysaccharides (EPS) ont de multiples applications dans l'agroalimentaire, la cosmétique et la santé.

- (2) Rawlings DE, Johnson DB (2007) *Microbiol* 153, 315-24
 (3) Jacquemet A *et al.* (2009) *Biochimie* 91, 711-7
 (4) Brevet WO 2008/070982 A1
 (5) Nordon RE *et al.* (2009) *Biotechnol Lett* 31, 465-76
 (6) Blumer-Schuette SE *et al.* (2008) *Curr Opin Biotechnol* 19, 210-7

Archées et biocarburants

De nombreuses enzymes dégradant la cellulose ont été trouvées chez les archées thermophiles et hyperthermophiles, en particulier des β -glucosidases et des endoglucanases. Toutefois, les enzymes d'archées hyperthermophiles connues ne dégradent pas les formes résistantes de cellulose cristalline, à l'exception d'une endoglucanase de *Pyrococcus horikoshii* modifiée par ingénierie protéique. Autre ingrédient majeur de la biomasse à convertir : le xylane, constituant principal de l'hémicellulose. Jusqu'à présent, la présence de xylanases chez les archées reste relativement exceptionnelle. Isolées et caractérisées chez *Pyrodictium abyssi*, *Sulfolobus solfataricus* et *Thermosphaera aggregans*, elles sont actives à haute température (100 °C) et très thermostables, ce qui leur confère un vaste potentiel d'applications (traitement de la pâte à papier).

La production de biocarburants de deuxième génération à partir de biomasse non alimentaire complexe (cellulose, hémicellulose et lignine) constitue un enjeu économique capital, mais les problèmes à résoudre sont multiples :

- présence dans la cellulose de régions amorphes hydrolysables et de régions ordonnées (cellulose cristalline) récalcitrantes à l'hydrolyse enzymatique ;
- élaboration de procédés combinant traitements enzymatiques et physico-chimiques ;
- réduction de la production, à partir d'hémicellulose, de pentoses non convertibles en biocarburants...

La cellulose peut être hydrolysée par l'action combinée d'au moins trois enzymes : une endoglucanase (cellulase), une exoglucanase (cellobiohydrolase) et une β -glucosidase (cellobiase).

Les archées semblent être moins bien équipées en enzymes capables de dégrader la lignocellulose que d'autres groupes bactériens ou les champignons puisque aucune souche n'a pu être cultivée sur ce type de substrat.

Pour autant, elles ne sont pas à exclure des travaux de recherche sur la constitution de minicellulosomes synthétiques. En effet, ces complexes multiprotéiques, capables de se lier aux substrats lignocellulosiques et de les dégrader, comportent, outre des domaines de liaison spécialisés, des cellulases, des xylanases, des mannanases, des arabinofuranosidases, des lichenases et des pectines lyases (5).

Dans ce cadre, les glycosides hydrolases des archées hyperthermophiles retrouvent un intérêt, notamment pour la construction de cellulosomes chimériques. En effet, les archées hyperthermophiles possèdent des cellobiohydrolases et des β -glucosidases ayant un domaine catalytique mais sont dépourvues de domaine de liaison au carbohydrate. Or ce type de domaine est présent chez les chitinases (qui hydrolysent la chitine, constituant qui rigidifie les parois cellulaires des arthropodes notamment) de *P. furiosus* et de *Thermococcus kodakaraensis* et pourrait être utilisé pour créer de nouvelles cellulases primaires capables de convertir la lignocellulose à haute température (6). En attendant cette nouvelle génération de biocatalyseurs, l'industrie américaine des biocarburants fait déjà appel à des enzymes de spécialité issues d'archées, à l'image de Verenium, qui commercialise plusieurs enzymes issues d'archées hyperthermophiles et actives sur divers types de substrats dont la cellulose.

Plusieurs espèces d'archées peuvent synthétiser des PHA, dont *Natrialba aegyptiaca* et *Haloferax mediterranei*, chez qui l'accumulation peut atteindre 60 % du poids sec cellulaire et pour laquelle la récupération est effectuée par simple lyse cellulaire en milieu desalé. *Haloferax* peut également produire des EPS dans certaines conditions. Cependant, les contraintes de production des halophiles extrêmes et les impératifs de coût d'obtention des PHA et des EPS sont tels qu'il est peu probable que les produits d'archées soient compétitifs par rapport à ceux issus des plantes ou même des bactéries mésophiles, à l'exception éventuelle de certains produits de niches spécialisés.

Enzymes d'archées

Enzymes des acides nucléiques

Les technologies de l'ADN recombinant reposent sur l'utilisation d'enzymes très diverses : enzymes de restriction, ADN polymérase, ADN ligases, etc. Les ADN polymérase thermostables jouent un rôle fondamental dans les techniques d'ingénierie du vivant grâce à leur aptitude à amplifier un gène donné à des millions de copies in vitro par PCR (7), amplification isotherme, etc. L'enzyme la plus utilisée en PCR est la *Taq* polymérase, isolée de la bactérie *Thermus aquaticus*. Les ADN polymérase des archées hyperthermophiles *Pyrococcus* et *Thermococcus* occupent le deuxième rang, avec 30 % du marché. Elles ont, à l'inverse de la *Taq*, une activité exonucléasique 3'-5' et donc une fonction de correction d'erreurs, et sont, de fait, plus fidèles. Les ADN polymérase d'archées constituent donc les enzymes de référence dès lors que la fidélité du produit final est essentielle, comme pour la production de protéines recombinantes. Mais si les polymérase de *Thermococcales* ont une excellente thermostabilité et une fidélité élevée, leur processivité⁴, leurs paramètres cinétiques et les tailles des fragments amplifiés en PCR sont plus variables. En outre, utilisées en combinaison avec la *Taq*, les ADN polymérase de *Pyrococcus* et de *Thermococcus* peuvent produire des fragments de grande taille en PCR-longue distance⁵, jusqu'à 20 kb à partir d'ADN génomique.

Plusieurs domaines sont plus particulièrement demandeurs de nouvelles ADN polymérase : le bioterrorisme, avec l'objectif de disposer d'ADN polymérase fonctionnelles dans des conditions drastiques (présence de solvants et autres inhibiteurs), la médecine légale et les recherches sur les ADN anciens ou fossiles, caractérisés par une fréquence élevée de lésions dans les ADN génomiques récupérés. Il reste sans doute d'autres pistes à explorer à partir notamment des ADN polymérase thermostables de la famille Y (translésions) des crénarchées ou de la famille D des euryarchées (figure p. 31) (8).

Lipases et estérases

Les enzymes hydrolysant les esters carboxyliques sont ubiquistes et ont été trouvées dans les trois domaines du vivant et chez certains virus. En présence d'eau, elles catalysent l'hydrolyse d'une liaison ester pour donner un alcool et un acide carboxylique. Dans un solvant organique, elles peuvent catalyser la réaction inverse ou une trans-estérification.

Les estérases se distinguent des lipases par leur préférence pour les chaînes carbonées courtes et ne sont pas actives sur les substrats qui forment des micelles.



© IFREMER SERPENTINE

Elles ne requièrent pas de cofacteur, présentent de bonnes chimiosélectivité, régiosélectivité et énantiomérisélectivité. Elles ont trouvé de multiples applications dans les industries médicales, agroalimentaires, de production d'énergie, grâce à leurs propriétés en synthèse organique (d'arômes, de détergents, de biodiesel notamment), etc.

Depuis la caractérisation de la première carboxylestérase de *Sulfolobus acidocaldarius*, en 1988, de nombreuses estérases d'archées ont été isolées. La première lipase ne l'a été que récemment, chez l'archée hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus* (9).

Les pH optimaux s'échelonnent entre 6 et 9, mais celui de la lipase d'*A. fulgidus* atteint 11. La majorité des carboxypeptidases issues d'archées hyperthermophiles affiche une excellente thermostabilité et une activité optimale à des températures comprises entre 70 et 100 °C.

Une proportion importante de ces estérases est stable en présence de solvants organiques. C'est le cas des EstA et EstB, isolées de *Picrophilus torridus*, qui présentent une activité optimale de 55 à 70 °C et à pH 6,5-7, ainsi qu'une activité sur les anti-inflammatoires non stéroïdiens du type ketoprofen et ibuprofen, notamment. Ces activités sont remarquablement bien conservées en présence de détergents, d'urée et de solvants organiques d'usage courant. De plus, d'autres carboxylestérases ont été identifiées chez les archées hyperthermophiles, parmi lesquelles des phosphotriestérases et des arylestérases. L'arylestérase de *Sulfolobus acidocaldarius* et de *S. solfataricus* est

Fumeur noir du site hydrothermal de Logatchev

(3 020 m). Ce type de fumeur est riche en hyperthermophiles. *Pyrococcus* CH1, la première souche connue hyperthermophile barophile stricte, a été isolée à partir de ces cheminées.

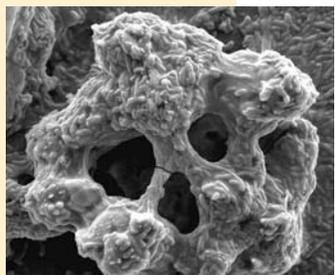
⁴ Nombre de nucléotides incorporés au cours d'un seul cycle d'attachement de la polymérase à la matrice
⁵ Synthèse de fragments de plus de 50 kb

(7) Querellou J (1999) *La Recherche* 31, 34-5
 (8) Palud A et al. (2008) *Mol Microbiol* 70, 746-61
 (9) Levisson MJ et al. (2009) *Extremophiles* 13, 567-81



Dossier Les microbes de l'extrême

© IFREMER/K. ALAIN/P. CRASSOUS



Détail d'une culture de la bactérie thermophile *Desulfurobacterium crinifex* montrant les cellules ordonnées dans une matrice exopolysaccharidique

active sur le paraoxon, inhibiteur de l'acétylcholinestérase, tandis que les phosphotriestérases des mêmes espèces ont une activité optimale sur sa version méthylée (qui inhibe aussi l'acétylcholinestérase). Ces enzymes sont également actives sur les pNP-esters et présentent un intérêt pour la détoxification des pesticides et des agents de guerre chimique.

Enzymes dégradant les polysaccharides

Les enzymes de la famille des glycosylases, impliquées dans le métabolisme des glucides, revêtent un intérêt industriel important. En particulier, celles qui convertissent l'amidon et celles capables de dégrader la cellulose et la lignocellulose sont fondamentales dans les procédés de production de biocarburants respectivement de première et deuxième générations (encadré p. 46). Les archées constituent un gisement extrêmement varié d'enzymes intéressantes pour la dégradation de l'amidon : amylases, glucoamylases et α -glucosidases. Les α -amylases de plusieurs espèces d'archées hyperthermophiles appartenant aux genres *Sulfolobus*, *Thermococcus*, *Pyrococcus* et *Methanocaldococcus* sont caractérisées par leur thermostabilité extrême et leur optimum de température compris entre 80 et 100 °C. Certaines, comme celles de *Pyrococcus* et *Methanocaldococcus*, sont actives jusqu'à 130 °C.

Dans un autre registre, les α -amylases de certaines halophiles telles que *Haloarcula* sont actives en solutions à concentrations élevées en NaCl ainsi que dans des solvants (benzène, toluène, chloroforme, etc.). De même, il existe des amylases issues d'halophiles fonctionnelles à pH 10.

Si les amylases sont bien représentées chez les archées, les glucoamylases y sont relativement rares. Faisant figure d'exception, les archées thermoacidophiles *Thermoplasma* et *Picrophilus* possèdent ces glucoamylases, dont l'optimum d'activité se situe à pH 2 et 90 °C (10). Les α -glucosidases hydrolysent les liaisons α -1,4 des oligosaccharides produits par les enzymes amylolytiques et libèrent du glucose. La diversité des archées hyperthermophiles permet là aussi de disposer d'un registre d'enzymes fonctionnelles dans différentes gammes de pH et de températures (pH 4,5-7,0 et 100-120 °C pour les α -glucosidases des *Thermococcales*, pH 1,5-3,5 pour celles de *Ferroplasma acidiphilum*). Les archées possèdent également des pullulanases, qui hydrolysent les liaisons α -1,6.

L'utilisation des amylases, glucoamylases, pullulanases et glucose isomérases d'archées actives à hautes températures et dans des gammes de pH adaptées devrait à terme permettre d'optimiser les procédés de dégradation de l'amidon et de la lignocellulose. Certaines de ces enzymes sont également utilisées dans la production de biocarburants de première génération à partir d'amidon de maïs (encadré p. 46).

Autres enzymes

Bien d'autres enzymes d'archées sont intéressantes. Les protéases et protéasomes d'hyperthermophiles, par exemple, dont l'intérêt majeur réside dans leur grande thermostabilité et leur aptitude à fonctionner en présence de détergents et d'agents dénaturants. Plusieurs protéases thermostables d'archées sont utilisées en biologie moléculaire et en biochimie, à l'image de la protéase S de *Pyrococcus furiosus*, qui fractionne les

protéines avant séquençage des peptides. Une collaboration entre l'Ifremer et l'Inra a également permis de mettre en évidence que des kératinases de *Thermococcus* isolés sur soies de porc et plumes de poulets sont également capables de dégrader les protéines prions (11). Les alcool déshydrogénases, dont plusieurs ont été isolées et caractérisées chez les archées, constituent une autre classe importante d'enzymes industrielles, du fait de leurs capacités de réduction énantiosélectives. Celles obtenues à partir des différentes espèces de *Pyrococcus* sont les plus thermostables connues.

D'autres enzymes archéennes peuvent avoir un intérêt en synthèse organique, comme dans la production d'isoprène (en substitution du caoutchouc naturel) à partir de micro-organismes recombinants industriels contenant un gène archéen de *Methanosarcina mazei* codant une mévalonate kinase (12).

Toutefois, le chemin entre l'isolement et la caractérisation des enzymes d'archées et leur utilisation à grande échelle dans l'industrie est complexe, en dépit de leurs propriétés originales et de la demande élevée de biocatalyseurs susceptibles de réduire les impacts environnementaux de certains procédés chimiques. Il peut parfois être nécessaire d'optimiser les propriétés des enzymes grâce aux outils de l'ingénierie protéique, en particulier de l'évolution dirigée. Il est également indispensable de concevoir ces enzymes – à l'instar de la majorité des enzymes industrielles – comme des éléments dans des procédés complexes comportant des étapes physico-chimiques et d'autres enzymatiques, l'ensemble devant être optimisé techniquement et économiquement. C'est ce type de solution, intégrant chimie industrielle et biotechnologies, que proposent des entreprises telles que Protéus et PCAS Biosolution.

Solutés compatibles et extrêmolytes

Les extrêmolytes sont des composés organiques solubles synthétisés par les extrêmophiles pour protéger leurs constituants cellulaires des conditions environnementales. Les archées produisent une grande diversité d'extrêmolytes originaux aux applications nombreuses : stabilisation des enzymes, protection des protéines et des anticorps, protection contre les dommages congélation/décongélation, etc. Le plus connu est l'ectoïne, produite industriellement à partir des halophiles.

Un large panel à exploiter

La diversité des milieux colonisés par les archées permet de disposer d'un registre d'espèces couvrant des gammes de température, de pH, de salinité, de concentrations en métaux lourds et d'exposition aux rayonnements ionisants extrêmement étendu. Les constituants cellulaires et les biomolécules d'archées possèdent de ce fait des propriétés structurales, de stabilité et fonctionnelles tout à fait exceptionnelles dont seule une faible partie est aujourd'hui exploitée en biotechnologie. Cette situation devrait progressivement évoluer sous la pression croissante de la demande en procédés industriels moins polluants, favorisant l'émergence d'alternatives combinant chimie et biocatalyse. Les enzymes d'archées, en particulier extrêmophiles, constituent un atout majeur dans cette direction. ●

(10) Egorova K, Antranikian G in Garrett RA, Klenk HP (2007) *Archaea: evolution, physiology, and molecular biology*, Malden, USA, Blackwell Publishing, 295-321

(11) Tsirolnikov K et al. (2004) *J Agric Food Chem* 52, 6353-60

(12) Brevet DANICO WO 2010/031062 A1

