

Structure modifiée

En France, plusieurs laboratoires s'intéressent aux micro-organismes extrémophiles, notamment à ceux qui vivent dans les sources hydrothermales et autour d'elles, au fond des océans. Les échantillons sont prélevés lors des campagnes de plongée utilisant le *Nautilus*, le sous-marin océanographique de l'IFREMER. C'est lors d'une telle expédition que Daniel Prieur, du Laboratoire de biologie marine de Roscoff, a isolé, de l'intérieur d'un fumeur noir, une nouvelle souche d'archéobactérie hyperthermophile et barophile (adaptée à la pression) qu'il a nommée *Pyrococcus abyssi*. Les conditions optimales de croissance de cet extrémophile sont une température de 96 °C, sous une pression de 200 atmosphères. Au Laboratoire de biochimie des signaux régulateurs cellulaires et moléculaires, nous avons étudié l'enzyme aspartate transcarbamylase de cette bactérie : elle résiste très bien aux températures et pressions élevées. Le clonage de son gène, la modélisation de la structure tridimensionnelle de l'enzyme et sa comparaison avec l'enzyme homologue d'*Escherichia coli* (qui vit à 37 °C) ont mis en évidence des particularités structurales qui doivent être à la base de l'adaptation de la bactérie.

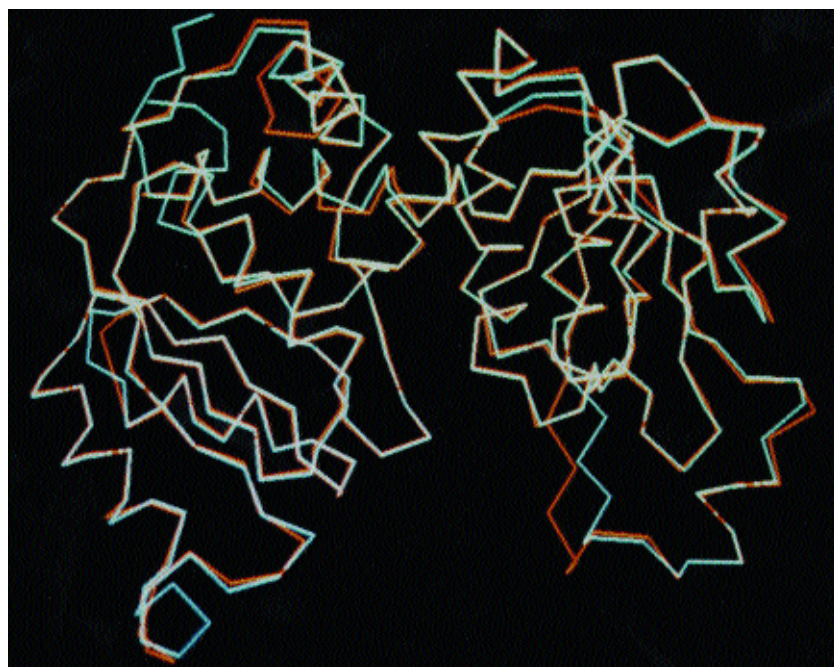
La figure ci-dessous montre la superposition de la structure modé-

lisée de l'enzyme (*en rouge*) et de la structure, connue par cristallographie, de la protéine d'*Escherichia coli* (*en vert*). Des différences sont localisées dans des régions externes, dont on sait qu'elles sont importantes pour les propriétés catalytiques et régulatrices de l'enzyme. La chaîne catalytique de *Pyrococcus abyssi* possède presque deux fois plus d'acides aminés chargés (positivement et négativement) que la chaîne d'*Escherichia coli*. Tous ces acides aminés sont à la surface de la chaîne, ce qui suggère que la stabilisation résulte de l'accroissement de la taille et de la compacité du cœur hydrophobe de cette enzyme, les acides aminés chargés supplémentaires participant plutôt à la stabilisation de la structure quaternaire (l'arrangement des sous-unités).

Le gène codant l'aspartate transcarbamylase de l'espèce voisine *Pyrococcus furiosus* est en cours de séquençage dans le Laboratoire de Nicholas Glansdorff, à Bruxelles. Cette archéobactérie est également une hyperthermophile, mais elle vit à la pression atmosphérique.

Nous effectuons le même type d'analyse pour l'aspartate transcarbamylase d'une bactérie psychrophile et provenant de l'Antarctique.

Guy HERVÉ
Université Pierre et Marie Curie



plasmiques ne fonctionnent qu'en présence de concentrations élevées de ce sel. Les protéines de ses structures cellulaires en contact avec le milieu extérieur ne sont fonctionnelles qu'en présence de fortes concentrations de chlorure de sodium.

Les enzymes halophiles sont aujourd'hui moins utilisées que d'autres extrémozymes, mais une application au moins est à l'étude : les biochimistes tentent d'utiliser des extrémozymes halophiles afin de mieux récupérer le pétrole des roches.

Pour créer des voies permettant au pétrole piégé dans les roches de passer dans le puits où s'effectue la récupération, les ingénieurs injectent généralement un mélange d'une gomme visqueuse (le guar, qui provient de certaines plantes) et de sable par le puits, puis ils cassent la roche au moyen d'explosifs, poussant simultanément le mélange injecté dans les fissures formées par l'explosion. Le guar facilite la dispersion du sable dans les fentes, de sorte que les grains maintiennent ultérieurement les fissures ouvertes. Comment éliminer la gomme et laisser circuler le pétrole, après cette opération ? Une solution consiste à injecter, avant le mélange de gomme et de sable, des enzymes qui dégraderont la gomme : celle-ci conserve sa viscosité le temps que le sable soit charrié jusqu'aux fissures, puis elle est dégradée.

Toutefois les puits de pétrole sont des endroits très chauds et souvent salés, où les enzymes « ordinaires » perdent leurs propriétés. Une extrémozyme fonctionnant de manière optimale à des températures et à des salinités élevées resterait probablement inactive à proximité de la sortie du puits, froide et non salée ; elle deviendrait progressivement active à mesure qu'elle pénétrerait dans le puits, puisque la température augmente avec la profondeur.

Moisson d'extrémozymes

Où trouver les extrémozymes utiles à l'industrie ? Classiquement les biologistes de l'industrie isolent les souches de micro-organismes qui contiennent les enzymes utiles, puis ils les cultivent en laboratoire. Toutefois, dans le cas des extrémophiles, ces méthodes sont souvent peu efficaces et coûteuses. Aussi les ingénieurs se sont-ils intéressés à la production d'extrémozymes par des techniques de recombinaison

de l'ADN, qui évitent les cultures d'extrémophiles. Les gènes, constitués d'ADN, codent les enzymes et les diverses protéines des cellules. Aussi, à partir de micro-organismes extrémophiles collectés dans les milieux naturels ou cultivés en laboratoire, on peut former de nombreuses copies des gènes qui codent les enzymes pour, ensuite, synthétiser ces dernières : on introduit les gènes clonés dans des micro-organismes que l'on sait bien cultiver et qui produiront les enzymes en quantités illimitées.

Deux techniques permettent d'identifier des extrémozymes potentiellement efficaces. Tout d'abord, on peut faire de petites cultures d'une bactérie extrémophile récupérée dans un milieu intéressant, puis rechercher des molécules utiles. Par exemple, on cherche des enzymes qui dégradent des protéines en ajoutant à une solution de protéines des extraits des cultures de cellules ; quand on observe une dégradation, on isole les enzymes responsables de cette activité, ainsi que les gènes qui codent ces enzymes, en espérant que ces gènes pourront être introduits dans des cellules qui les exprimeront.

On peut aussi isoler directement l'ADN d'échantillons d'eau, de terre ou de tout autre prélèvement provenant d'un milieu extrême. Puis, par des techniques de recombinaison de l'ADN, on introduit des segments d'ADN sélectionnés au hasard dans des cellules domestiquées (idéalement on n'introduit qu'un fragment par cellule) et l'on teste les colonies issues des cellules modifiées, à la recherche d'activités enzymatiques. Quand une nouvelle activité apparaît, on sait qu'elle provient d'un gène inséré. Cette méthode évite les nombreuses manipulations du procédé classique et ne sélectionne que les enzymes qui pourront, ultérieurement, être produites par des cultures de cellules domestiquées. En outre, elle procure les gènes qui codent ces enzymes sans imposer des cultures d'extrémophiles, généralement très difficiles.

Bien que la diversité des micro-organismes soit considérable, on trouve difficilement les enzymes parfaitement adaptées aux tâches qu'on veut leur confier. Aussi les enzymologues les plus en pointe modifient aujourd'hui les extrémozymes, afin de leur donner des activités sur mesure. Par exemple, après avoir découvert une extrémozyme qui dégrade efficacement des

protéines à haute température, ils sont intervenus afin de la faire fonctionner dans une gamme plus étendue d'acidité et de salinité.

Aujourd'hui, les biologistes effectuent ces transformations de deux façons. Les partisans de la « méthode rationnelle » cherchent d'abord la base structurale d'une propriété donnée ; puis ils modifient le gène de l'enzyme afin que la protéine catalytique qui en résultera détienne, à coup sûr, cette propriété. Les partisans de l'autre approche, nommée évolution dirigée, font varier de façon plus ou moins aléatoire le gène codant une enzyme choisie, et, à partir des gènes modifiés ainsi obtenus, ils fabriquent des milliers de versions différentes de cette enzyme. Ils testent alors l'ensemble pour déceler si l'une des versions a acquis le caractère escompté. Cette dernière stratégie est « edisonnienne », car lorsque Thomas Edison rechercha des matériaux pour confectionner les filaments d'ampoule électrique, il testa tous les matériaux à sa disposition, de l'éclat de bambou jusqu'au fil de soie.

Aujourd'hui les extrémozymes utilisées dans l'industrie sont peu modifiées, mais les deux approches, rationnelle et edisonnienne, produiront certainement des enzymes mieux adaptées aux tâches qu'on leur confie. Par ces mêmes méthodes, on étudie d'ailleurs la transformation d'enzymes ordinaires en extrémozymes artificielles.

Michael MADIGAN est professeur de microbiologie à Carbonsdale (Illinois). Barry MARRS est directeur de la Société *Photosynthetic Harvest*.

M.W.W. ADAMS et R.M. KELLY, *Enzymes Isolated from Microorganisms That Grow in Extreme Environments*, in *Chemical and Engineering News*, vol. 73, n° 51, pp. 32-42, 18 décembre 1995.

Extremophiles, numéro spécial de *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews*, vol. 18, nos 2-3, mai 1996.

K.O. STETTER, *Hyperthermophiles in the History of Life*, in *Evolution of Hydrothermal Ecosystems on Earth (and Mars?)*, sous la direction de Gregory R. Bock et Jamie A. Goode, John Wiley & Sons, 1996.

Michael T. MADIGAN, John M. MARTINKO et Jack PARKER, *Brock Biology of Microorganisms*, huitième édition, Prentice Hall, 1997.
