



Production d'hydrogénases multirésistantes Energie 2008

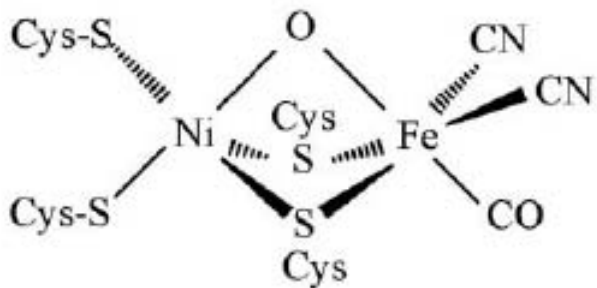
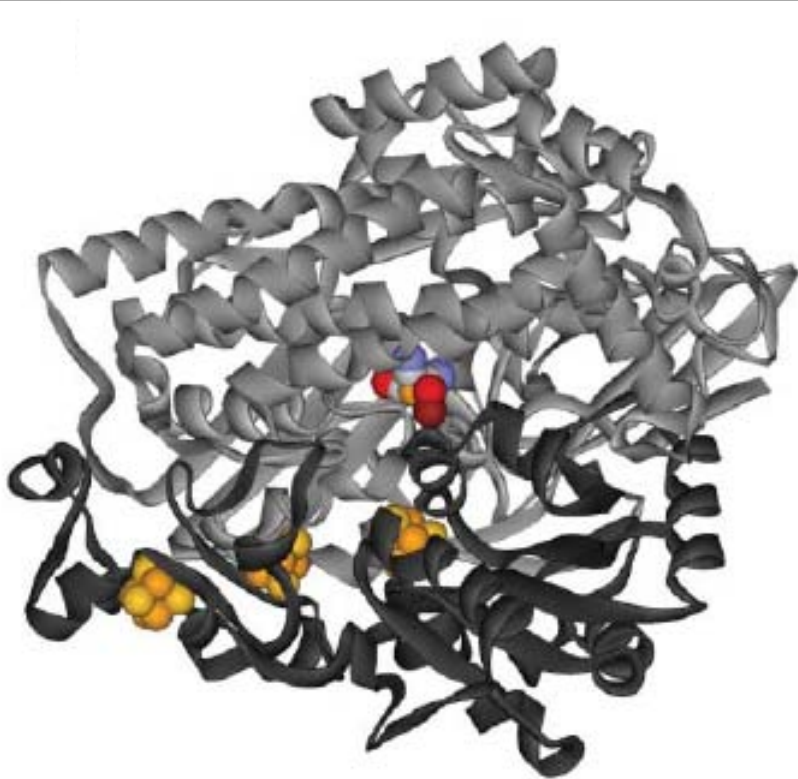
M.T. Giudici-Ortoni

Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, IMM-CNRS, Marseille

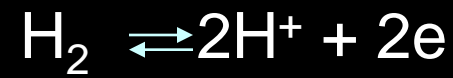
Hydrogène et Bactérie

- Métabolisme très répandu et ancien
- Hydrogène vecteur énergétique
- Grande diversité d'organismes

Biocatalyseur: Les Hydrogénases



Biopile



Platine



Hydrogénases

Turn over
1 000 s⁻¹

Biodégradables

Utilisation gaz reformage

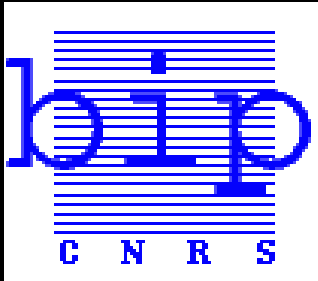
Verrous Technologiques

- Sensibilité des hydrogénases à la température, pH, oxygène
 - « molecular-engineer » enzymes
 - enzymes naturellement résistantes aux environnements extrêmes
- Vectorisation du biocatalyseur

PROHYD

- **Objectifs:** production et/ou création de biocatalyseurs (multi)résistants à différents facteurs physicochimiques (pH, T, O₂, Sulfure...).
- **Stratégie:** Utilisation de biocatalyseurs naturellement résistants, détermination des raisons de ces résistances, développement d'un système d'expression non limitant.
- **Financement** sur 2 ans , 50 keuros (+10)

PROHYD



Laboratoire de Bioénergétique
et Ingénierie des Protéines
Marseille

**Maîtrise des
sélection,
production,
biophysique,
Immobilisation**



Laboratoire de Chimie Bactérienne
Marseille

Des Hydrogénases

**Recherche de pointe
Génétique**

Choix du biocatalyseur modèle

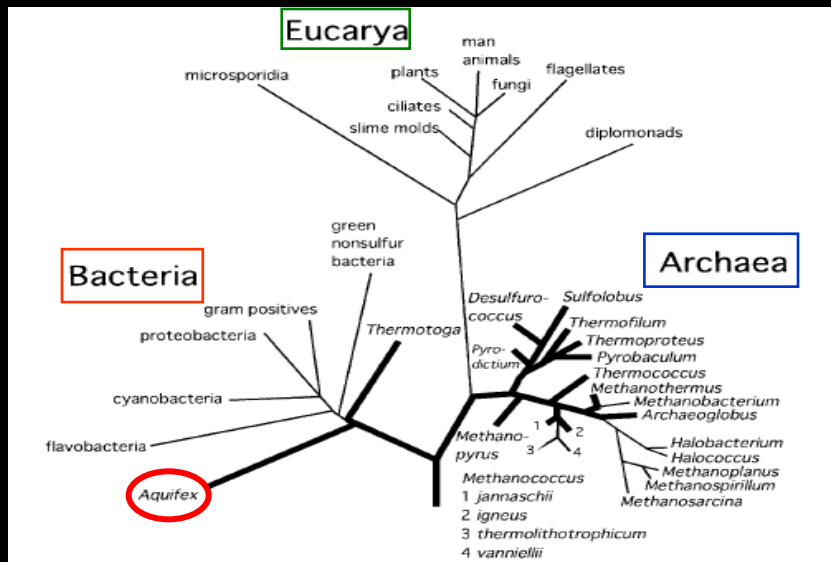
Aquifex aeolicus



-Actif dans une large gamme de températures (20-90 C).

-Grande résistance à l'inactivation thermique.

- Pas d'inhibition par le CO, les sulfures, tolérant à l'oxygène.

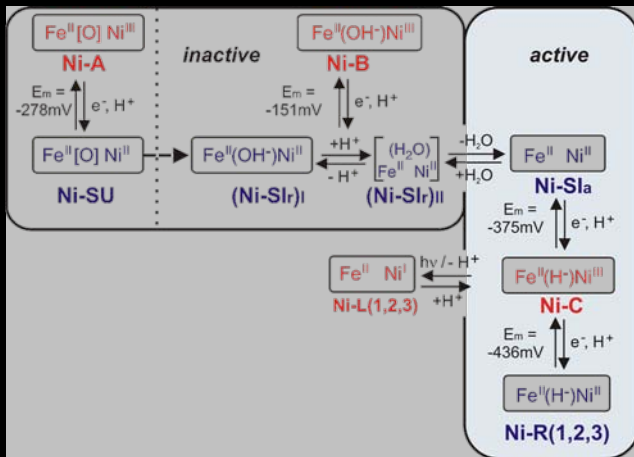


Bases de la multirésistance des hydrogénases d'*A. aeolicus*

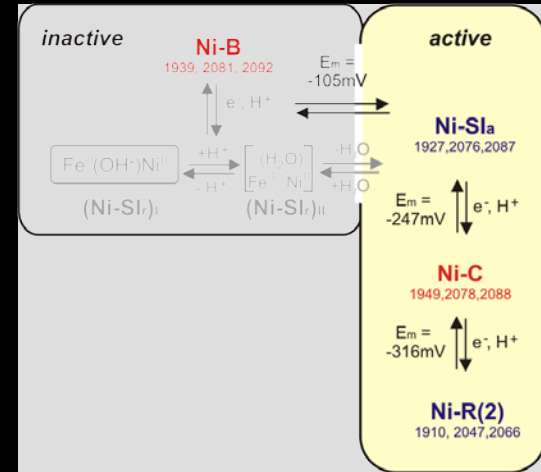
- Approche physiologique (croissance à différentes concentrations en O_2).
- Approches biochimiques (rôles des partenaires *ie* lipides, quinones, cytochrome).
- Approches physico-chimiques (FTIR, RPE, électrochimie).

Bases moléculaires de la résistance à l'oxygène: Etude du centre actif

Hase « classique »

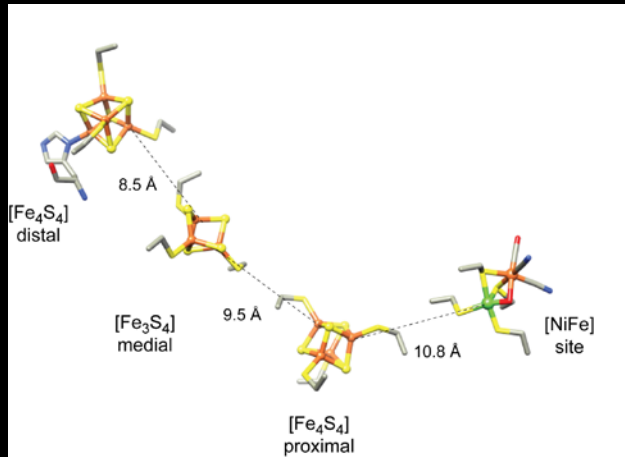


Hase Aquifex



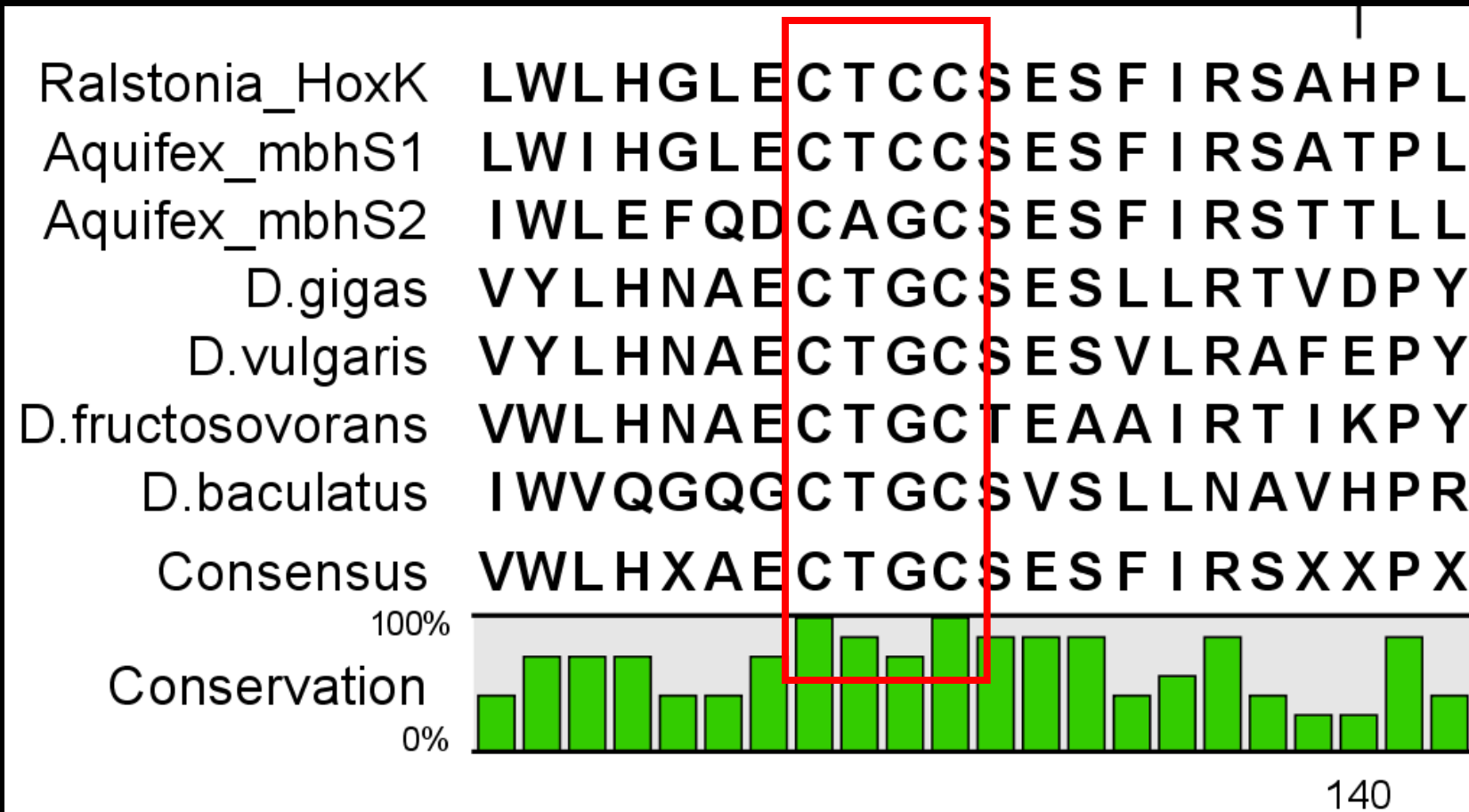
Il n'existe pas d'espèce inactivée par l'oxygène chez A.a bien que l'oxygène puisse accéder au centre actif

Bases moléculaires de la résistance à l'oxygène: Etude des centres Fe-S



| Redox centre | Midpoint potential, mV vs NHE | | | | |
|--|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--|---------------------------------|
| | <i>A. aeolicus</i> | <i>D. gigas</i> ²² | <i>D. vulgaris</i> ³⁰ | <i>R. eutropha</i> H16/ <i>R. eutropha</i> CH34 ⁴⁰ | <i>A. vinosum</i> ⁴⁰ |
| HP | +232 | nd | nd | +160/+240 | nd |
| [Fe ₃ S ₄] ^{1+/0} | +68 | -35, -70 | -70 | +25/+100 | -10 |
| [Fe ₄ S ₄] ^{2+/1+} Proximal | +87 | -350 | -350 | -60/+50 | nd |
| [Fe ₄ S ₄] ^{2+/1+} Distal | -78 | -350 | -350 | -180/-80 | nd |

Bases moléculaires de la résistance à l'oxygène: Etude des centres Fe-S



Modification du centre FeS proximal,
mise en évidence d'une nouvelle espèce

Choix du système d'expression et du mode de détection

- *Shewanella oneidensis*
 - la bactérie connue dont les capacités respiratoires sont les plus étendues.
 - hydrogénases présentes.
 - une bactérie facile à cultiver.
 - nombreux outils génétiques.
- Mode de détection
 - électrochimie sur cellule entière.
 - détection d'activité sur gel d'acrylamide couplée à une identification par spectrométrie de masse.

Production hétérologue

- Clonage des gènes et expression des hydrogénases solubles et membranaires d'*A. aeolicus* dans *Shewanella oneidensis*.
- Seule l'hydrogénase membranaire est produite mais en faible quantité (problème de maturation?).

Conclusions et perspectives

- Détermination des bases moléculaires du fonctionnement des hydrogénases d'*A. aeolicus* en conditions extrêmes.
- Optimisation des conditions d'expression hétérologue en vue de création de nouvelles enzymes (recherche voie maturation).
- Immobilisation des hydrogénases d'*A. aeolicus* sur des électrodes pour une utilisation dans les biopiles. (PR Interaction hydrogénase - électrodes pour la bioconversion de l'hydrogène E. Lojou).
- 2 publications soumises.

Métabolisme énergétique de bactéries extremophiles

Dr M.T. Giudici-Ortoni



Dr M. Bruschi C. Castelle (PhD student)
Dr M. Guiral L. Prunetti (PhD student)
Dr M. Ilbert S. Benomar (PhD student)
Dr E. Lojou C. Aussignarde (PhD student)
G. Leroy A. Ciaccafava (PhD student)
P. Infossi M. Abbed (MII Sfax)
M. Salssine (CDD Energie)

V. Mejean, C. Jourlin
(LCB IMM Marseille)

Evolution des voies bioénergétiques

Dr W. Nitschke

M. Pandelia
W. Lubitz,
Max-Planck Institut
Mülheim an der Ruhr, Allemagne

Centre de Fermentation (IMM)

M. Bauzan

Centre de Protéomique (IMM)

R. Lebrun, S. Lignon

