

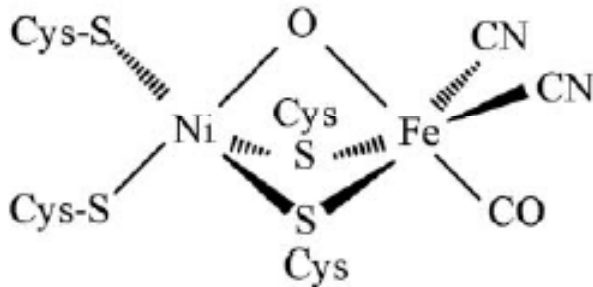
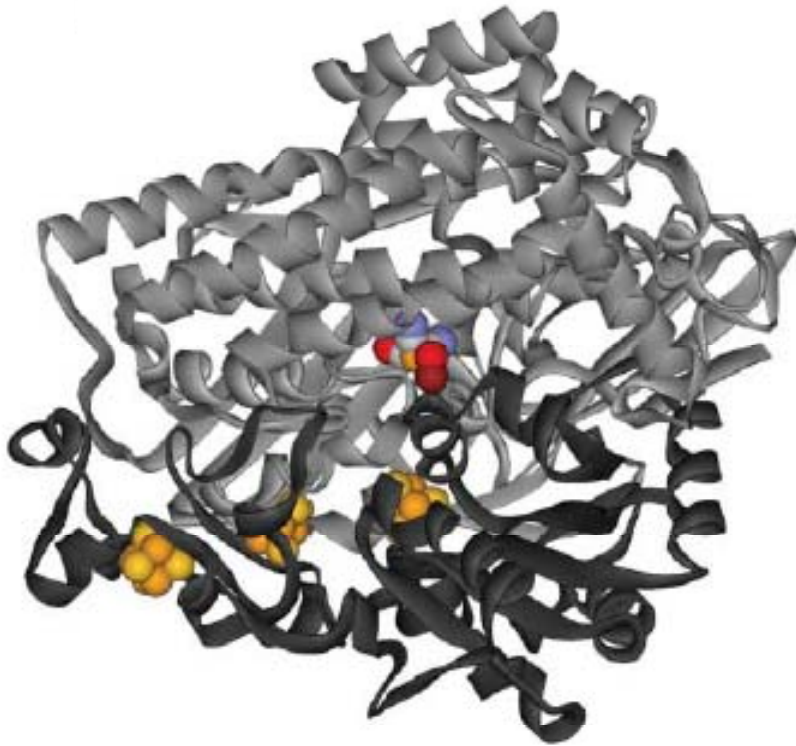


Production et étude d'hydrogénases multirésistantes Energie 2008

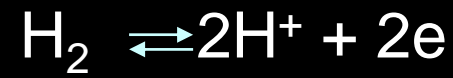
M.T. Giudici-Ortoni

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

Biocatalyseur: Les Hydrogénases



Biopile



Platine



Hydrogénases

Turn over
 $1\ 000\ \text{s}^{-1}$

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



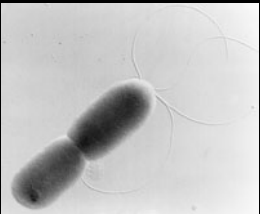
Laboratoire de Chimie Bactérienne
Marseille

Des Hydrogénases

Recherche de pointe
Génétique

Choix du biocatalyseur modèle

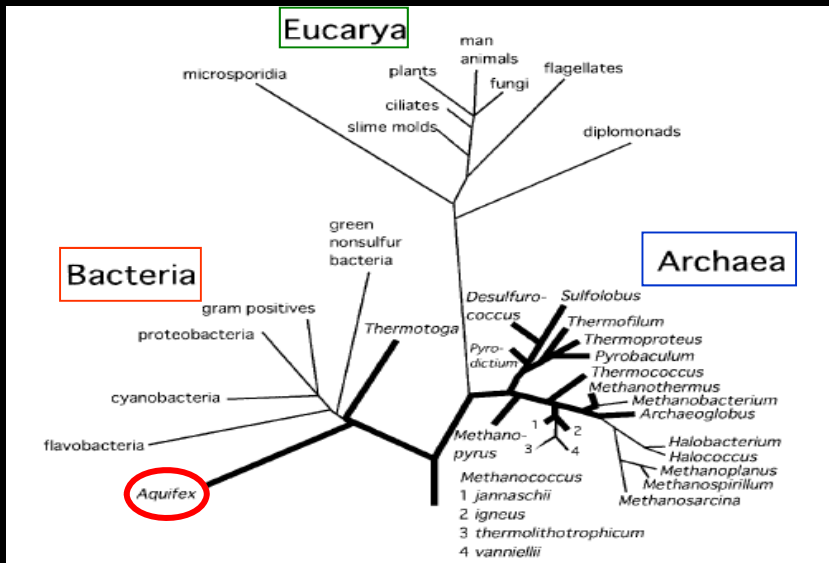
Aquifex aeolicus



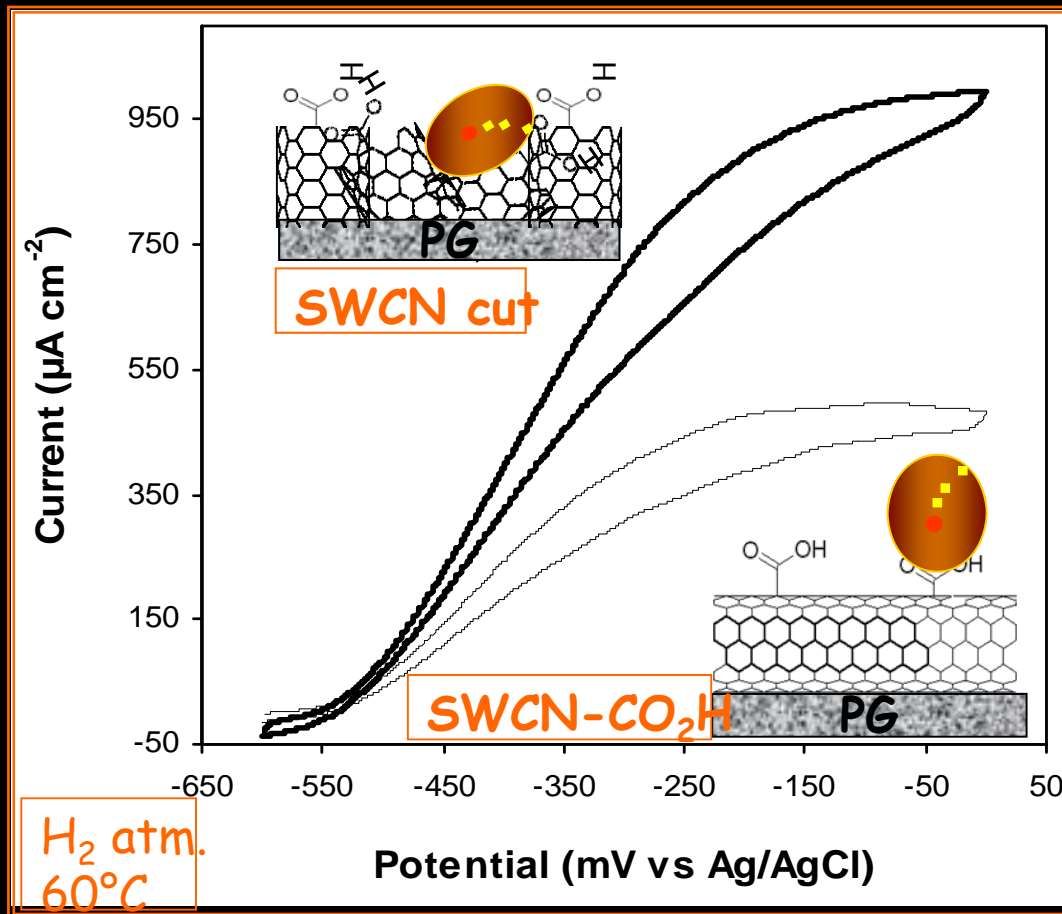
-Actif dans une large gamme de températures (20-90°C).

-Grande résistance à l'inactivation thermique.

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



Augmentation des hydrogénases connectées: utilisation des nanotubes de carbone



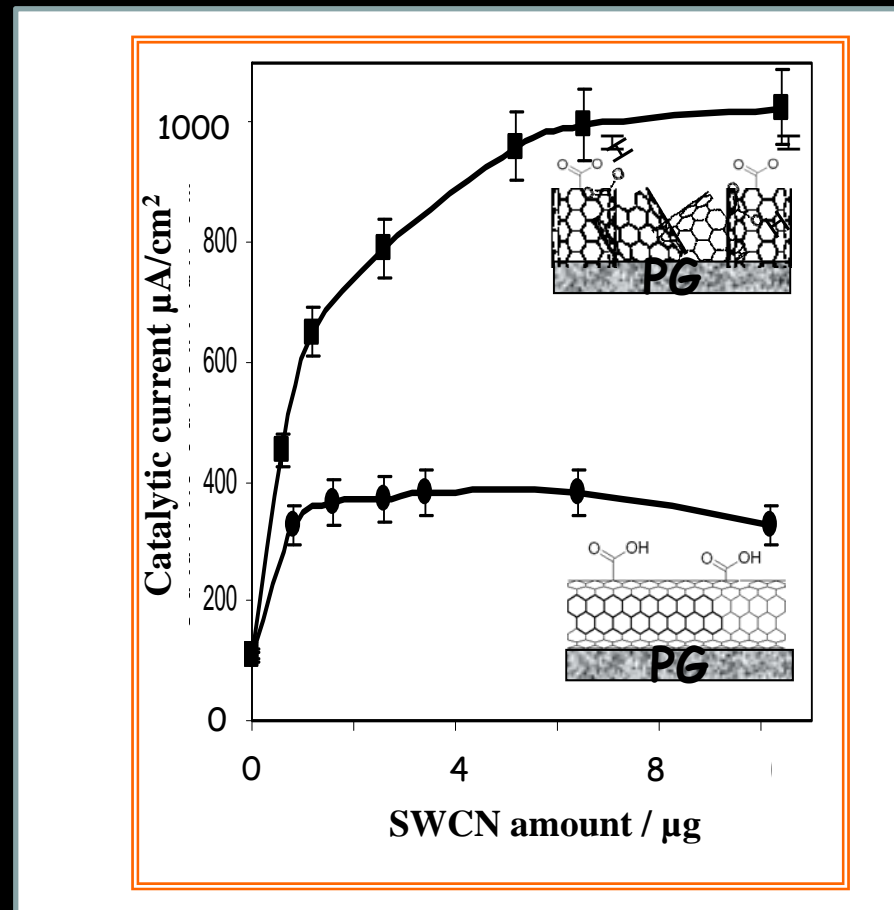
Tranfert d'électrons direct
(H₂ oxydation)



Cluster FeS distal est
directement
Connecté avec l'électrode

Comportement différent /
[NiFe] hydrogenase sensible à
O₂⁻

Augmentation des hydrogénases connectées: utilisation des nanotubes de carbone



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

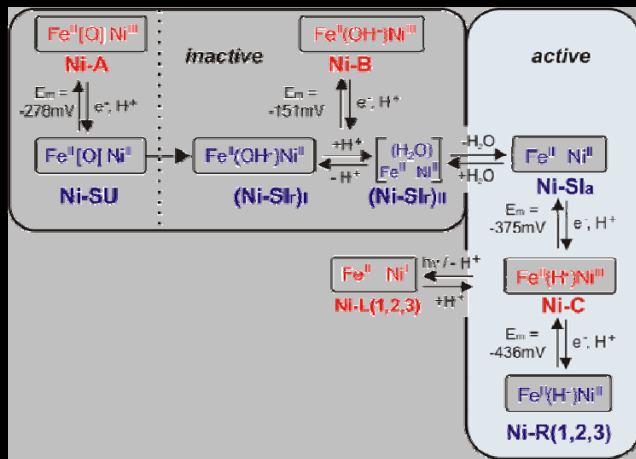
- Clonage des gènes et expression des hydrogénases solubles et membranaires d'*A. aeolicus* dans *Shewanella oneidensis*.
- Seule l'hydrogénase membranaire est produite mais en faible quantité (problème de maturation?).

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

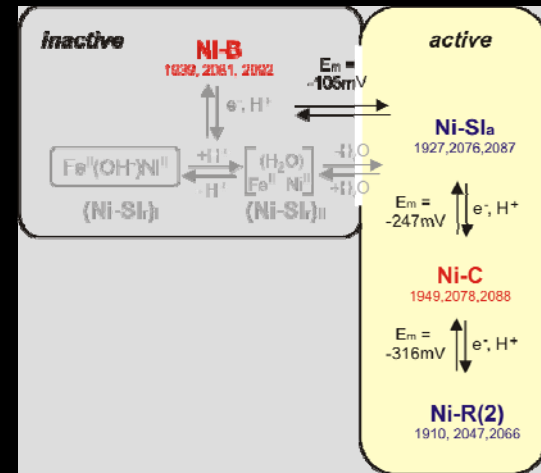
- Approche physiologique (croissance à différentes concentrations en O_2).
- Approches biochimiques (rôles des partenaires *ie* lipides, quinones, cytochrome).
- Approches physico-chimiques (FTIR, RPE, électrochimie).

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

Hase « classique »

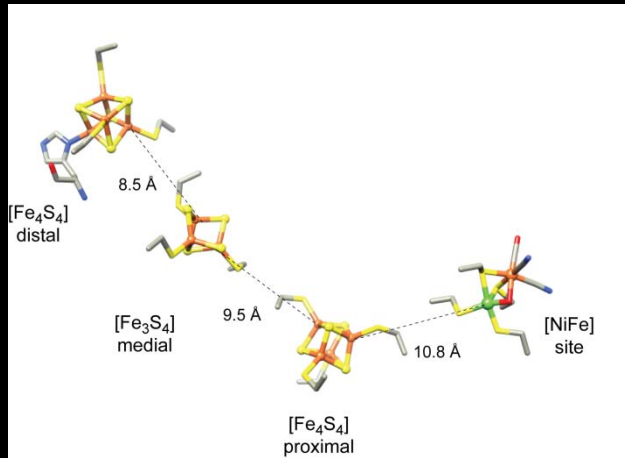


Hase Aquifex



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

```

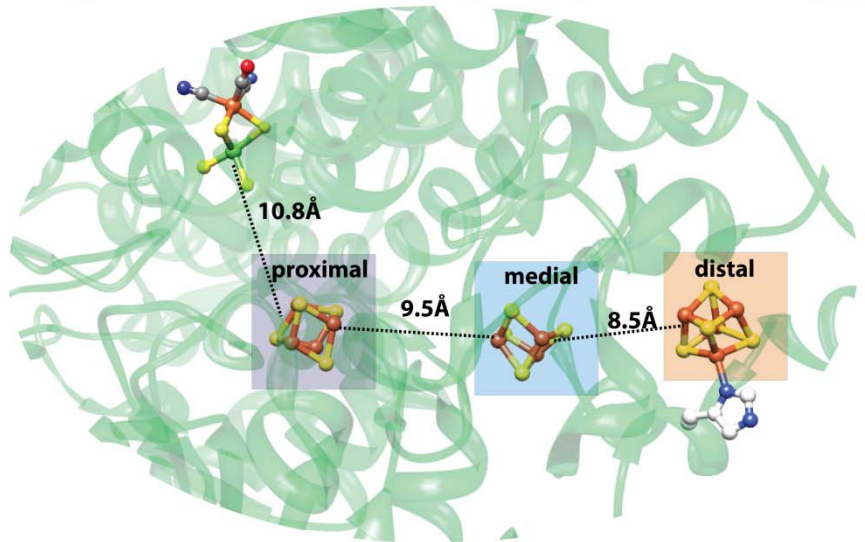
A. a. MBH  - - - - -METFWEVFKRHGVSRRDFLKFATTITGLMGLAPSMVPEVVRAMETKPRVPVLWIHGLECTCCSESFIRSATP
E. c. (Hyd-1) - - - - -MNNEETFYQAMRRQGVTRRSFLKYCSLAATSLGLGAGMAPKIAWALENKPRI PVVWIHGLECTCCTESFIRSAHP
R. e. MBH  - - - - -MVETFEYVMRRQGISRRSFLKYCSLATSLGLGPSFLPQIAHAMETKPRTPVLWLHGLECTCCSESFIRSAHP
A. v. MBH  - - - - - - - - -ARRPSV IWL SFQECTGC TESLTRAHAP
D. g.      - - - - -MKFCTAVAVAMGMGPAFAFAPKVAEALTAKKRPSVVYLHNAECTGCSESLLRTVDP
D. v. M.F  MK I S I GLGKEGVEERLAERGVSRRDFLKFCTAIAVTMGMPAFAPFAVARALMGPRRPSVVYLHNAECTGCSESVLRAFEP
D. f.      - - - - -LTAKHRPSVVWLHNAECTGCTEAAIRT IKP

A. a. MBH  LASDVVLSMISLEYDDTL SAAAGEAVEKHRERI IKEYWGNYLAVEGNPP-LGEDGMYCI IGGRPFVEILKESAEGAKAV
E. c. (Hyd-1) LAKDVI LSLISLDYDDTLMAAAGTQAEVFEDIITQYNGKYLAVEGNPP-LGEQGMFCISSGRPFIEKLRKRAAGASA I
R. e. MBH  LAKDVVLSMISLDYDDTLMAAAGHQAEALILEEIMTKYKGNYLAVEGNPP-LNQDGMSCI IGGRPFIEQLKYVAKDAKA I
A. v. MBH  TLEDLILDFISLDYHHTLQAASGEAAEARLQAMDENRQYLVIVDGSIPGPDANPGFSTVAGHSNYSILMETVEHAAAV
D. g.      YVDELILDVISM DYHETLMAGAGHAVEEALHEA IKG--DFVCVIEGGIP-MGDGGYWGKVGRRNMYDICA EVAPKAKAV
D. v. M.F  YIDTLILDTLSDLYHETIMAAAGDAAEAALAEAVNSPH-GFIAVVEGGIP-TAANGIYGKVANHTMLDICSRLPKAQAV
D. f.      YIDALILDITSLDYQETIMAAAGEAAEAALHQALEGKD-GYYLVVEGGLP-TIDGGQWGMVAGHPMIETT KKA AKAKGI

A. a. MBH  IAWGSCASWGC VQAAKPNPTTAVPIDKVIKD--KPIIKVPGCPPIAEVM TGVIMYMLVDFRIPPLDSQGRPKMFYGNRIH
E. c. (Hyd-1) IAWGTCASWGC VQAARPNPTQATPIDKVIDT--KPIIKVPGCPPIPDVMSAITYMVTFDRIPDVRMGRPLMFYGRIRIH
R. e. MBH  ISWGSCASWGC VQAAKPNPTQATPVHKVIDT--KPIIKVPGCPPIAEVM TGVITYMLTFDRIPELDROGRPKMFYSQRIRIH
A. v. MBH  IAVGTCAAFGGLPQARPNTGAMSVMDLVRD--KPINVPGCCPIIPMVI TGVIAHYLVFGRLPELDGYGRPLAFYQGSIRIH
D. g.      I AIGTCATYGGVQAAKPNPTGTGVVNEALGKLGKVAINIAGCPPNPMNFVGTVVHLLT-KGMPELDKQGRPV MFFGETVH
D. v. M.F  IAYGTCATFGGVQAAKPNPTGAKGVNDALKHLGVKAINIAGCPPNPNLVGTIVYYLKNKAAPELDSLNRPTMFFGQTVH
D. f.      ICIGTCSAYGGVQAAKPNPSQAKGVSEALG--VKTINIPGCCPPNIN FVGAVVHVLT-KGIPDLDSNGRPKLFYGLVH

A. a. MBH  DTCYRRSFFNAGQFVEQFDDEGAKKGWCLYKVGCRGPTTYNSCGNMRWYNGLSYPIQSGHGCI GCAENNFWDNGPFYER I
E. c. (Hyd-1) DKCYRRAHFADAGEFVQSWDDDAARKGYCLYKMGCKGPTTYNACSTRWN DGVSFPIQSGHGCLGCAENGFWRGFSFYSRV
R. e. MBH  DKCYRRPHFDAGQFVEEWDDESARKGFCLYKMGCKGPTTYNACSTRWN EGT SFP IQSGHGCI GCSEDFWDKGSFYDRL
A. v. MBH  DRCYRRPFYDKGLFAESFDDEGAKQGWCLYRLGCKGPTTYNACATMKWN DGT SWPVEAGHPCLGCSEPFWDAGGFYEPY
D. g.      DNC PRLKHFEAGEFATSFGSPEAKKGYCLYELGCKGPD TYN NCPKQLFNQ-VNWPVQAGHPICACSEPNFWDLYSPFYS
D. v. M.F  EQC PRLPHFDAGEFAPSFSESEARKGWCLYELGCKGPTVMN NCPK I KFNQ-TNWPVDAGHPICGCSEPDFWDAMT P FYQN
D. f.      DNC PRLPHFEASEFAPSF DSEAKKGFCLYELGCKGPTVYNNCPKVLFNQ-VNWPVQAGHPCLGCSEPDFWD TMT P FYEQ
    
```

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



Conclusions et perspectives

- Optimisation des conditions d'expression hétérologue en vue de création de nouvelles enzymes (recherche voie maturation).
- Optimisation de l'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).
- 5 publications.
- ANR Bioénergie 2010-2014

Métabolisme énergétique de bactéries extremophiles

Dr M.T. Giudici-Orticoni



Dr M. Bruschi

Dr M. Guiral

Dr M. Ilbert

Dr E. Lojou

P. Infossi

M. Salssine

(CDD Energie)

L. Prunetti (PhD student)

S. Benomar (PhD student)

C. Aussignarde (PhD student)

A. Ciaccafava (PhD student)

M. Roger MII

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

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

