

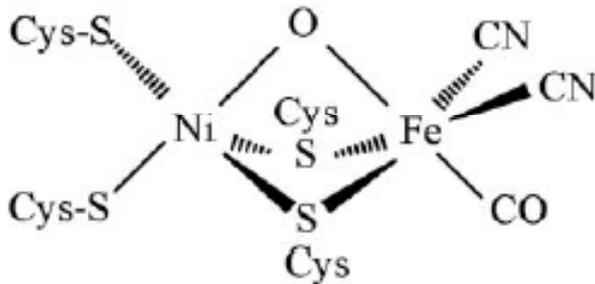
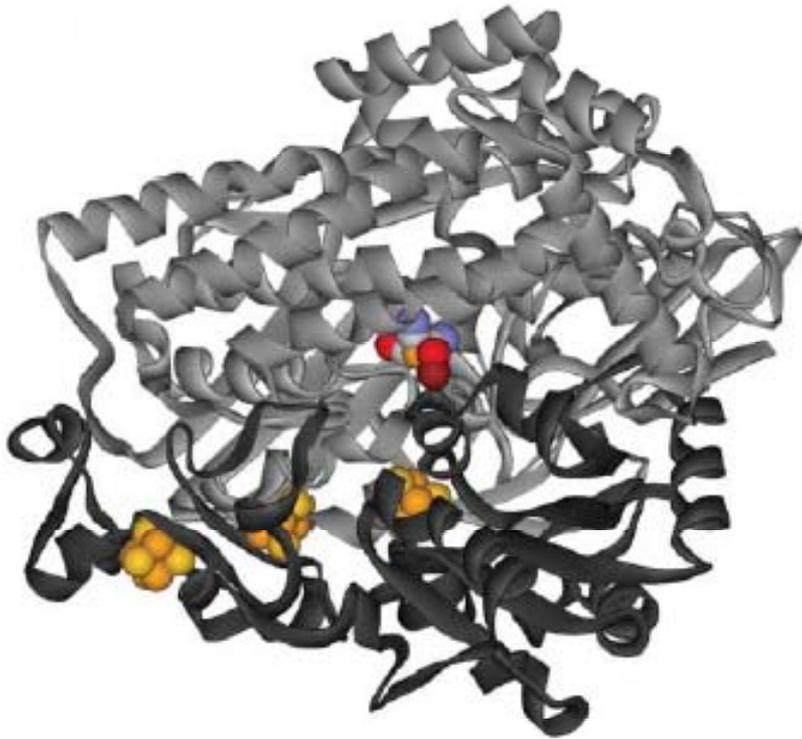


# Production et étude d'hydrogénases multirésistantes Energie 2008

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, O<sub>2</sub>, 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



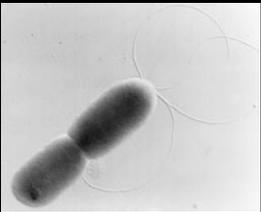
Laboratoire de Chimie Bactérienne  
Marseille

Des Hydrogénases

Recherche de pointe  
Génétique

# Choix du biocatalyseur modèle

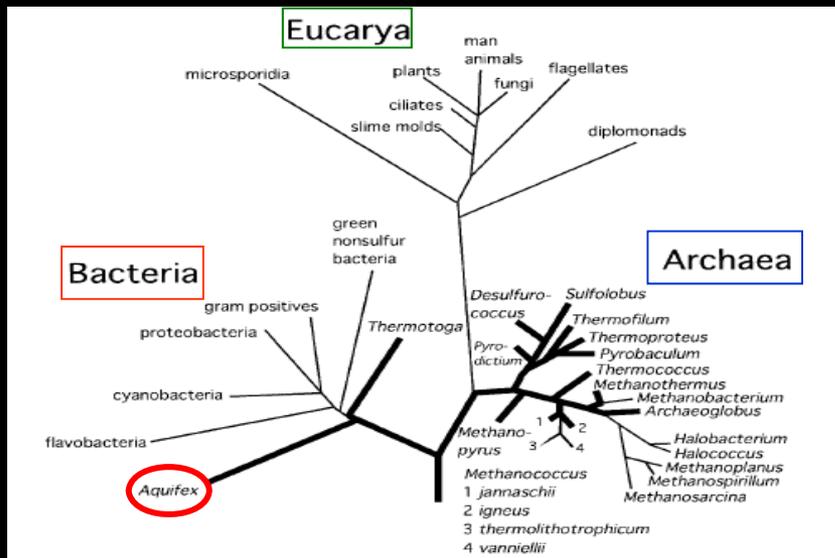
## *Aquifex aeolicus*



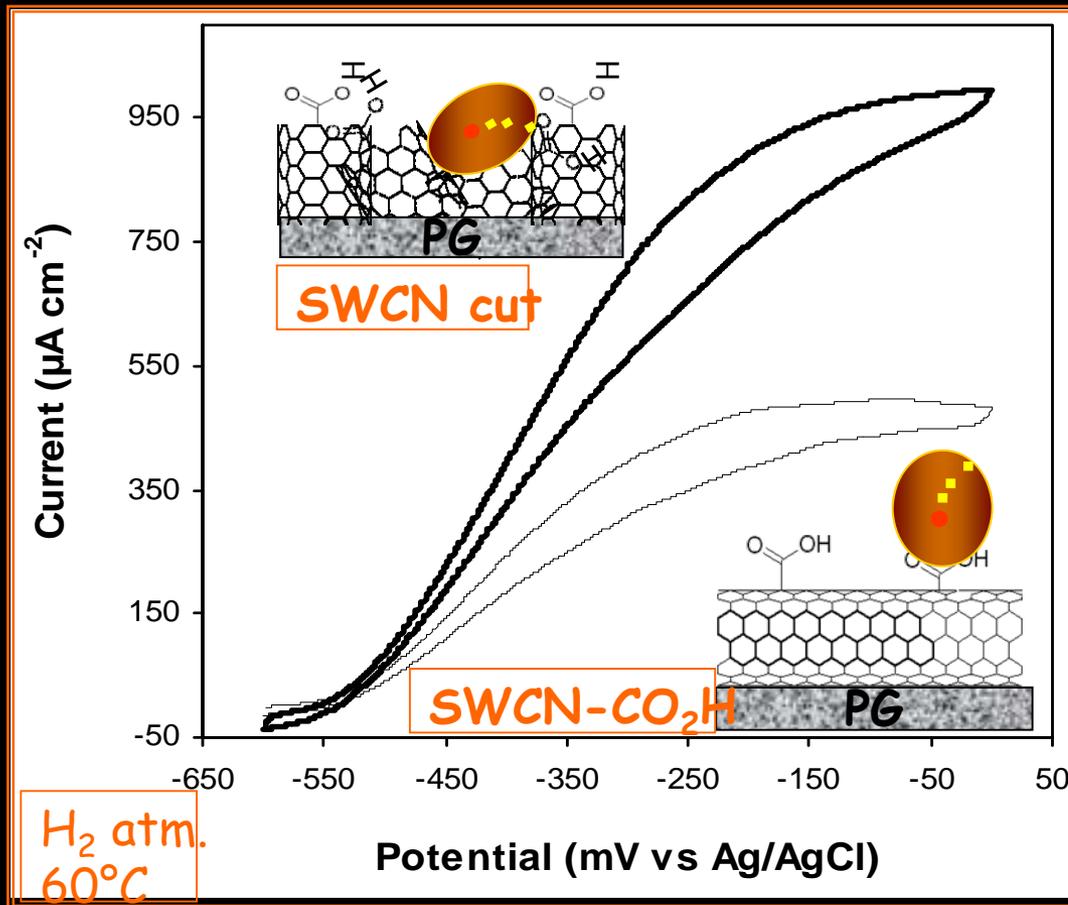
-Actif dans une large gamme de températures (20-90°C).

-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



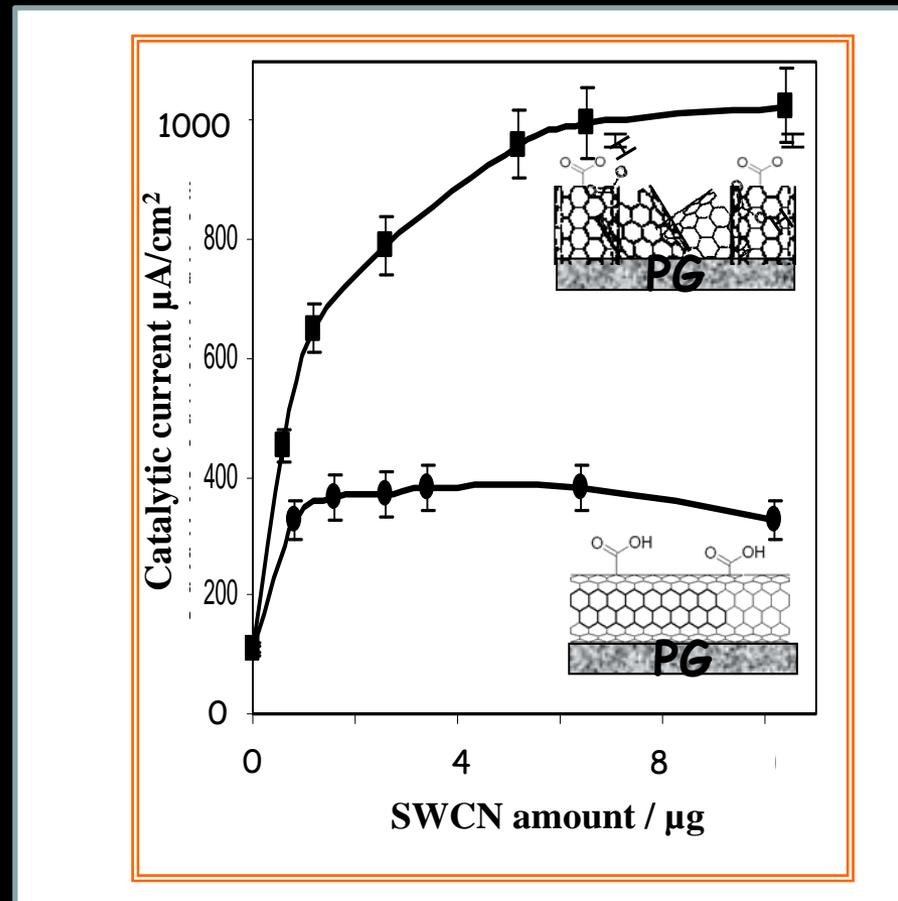
Tranfert d'électrons direct  
(H<sub>2</sub> oxydation)



Cluster FeS distal est  
directement  
Connecté avec l'électrode

Comportement différent /  
[NiFe] hydrogenase sensible à  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>

# 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

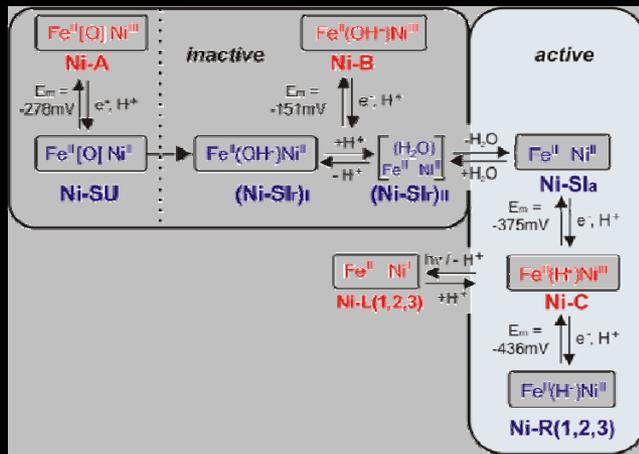
- Clonage des gènes et expression des hydrogénases solubles et membranaires d'*A. aeolicus* dans *Shewanella oneidensis*.
- Seule l'hydrogénase membranaire est produite mais en faible quantité (problème de maturation?).

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

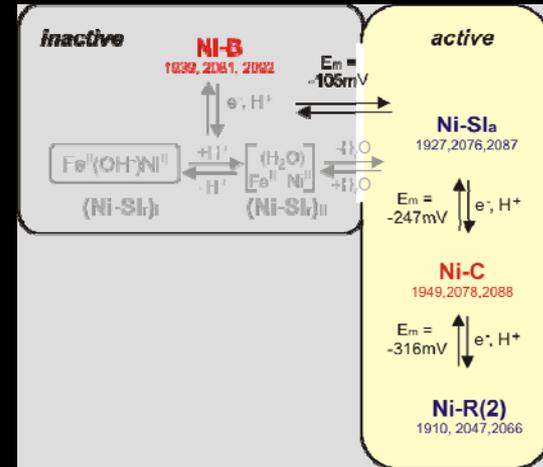
- Approche physiologique (croissance à différentes concentrations en  $O_2$ ).
- Approches biochimiques (rôles des partenaires *ie* lipides, quinones, cytochrome).
- Approches physico-chimiques (FTIR, RPE, électrochimie).

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

Hase « classique »

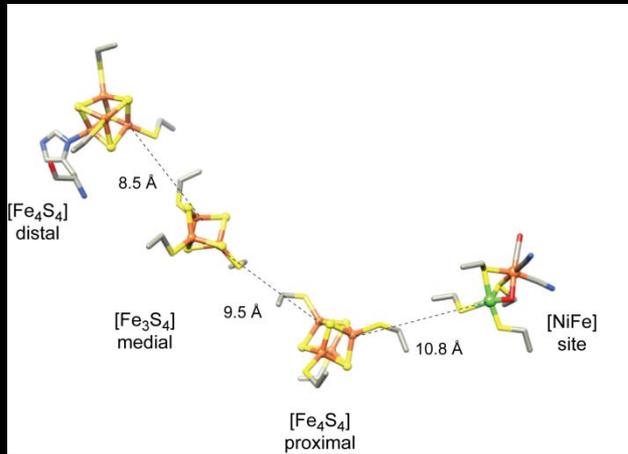


Hase Aquifex



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> <sup>22</sup>	<i>D. vulgaris</i> <sup>30</sup>	<i>R. eutropha</i> H16/ <i>R. eutropha</i> CH34 <sup>40</sup>	<i>A. vinosum</i> <sup>40</sup>
HP	+232	nd	nd	+160/+240	nd
[Fe <sub>3</sub> S <sub>4</sub> ] <sup>1+/0</sup>	+68	-35, -70	-70	+25/+100	-10
[Fe <sub>4</sub> S <sub>4</sub> ] <sup>2+/1+</sup> Proximal	+87	-350	-350	-60/+50	nd
[Fe <sub>4</sub> S <sub>4</sub> ] <sup>2+/1+</sup> Distal	-78	-350	-350	-180/-80	nd

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

```

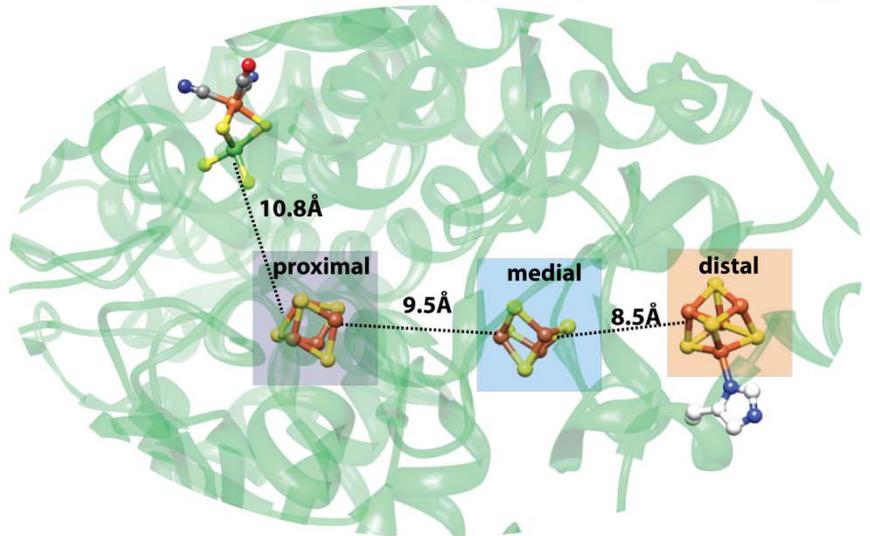
A. a. MBH  - - - - -METFWEVFKRHGVSRRDFLKFATTITGLMGLAPSMVPEVVRAMETKPRVPVLWIHGLECTCCSESFIRSATP
E. c. (Hyd-1) - - - - -MNNEETFYQAMRRQGVTRRSFLKYCSLAATSLGLGAGMAPKIAWALENKPRI PVVWIHGLECTCCTESFIRSAHP
R. e. MBH  - - - - -MVETFYEVMMRRGGISRRSFLKYCSLATSLGLGPSFLPQIAHAMETKPRTPVLWLHGLECTCCSESFIRSAHP
A. v. MBH  - - - - - - - - -ARRPSV IWL SFQECTGC TESLTRAHAP
D. g.      - - - - -MKFCTAVAVAMGMGPAFAFAPKVAEALTAKKRPSVVYLHNAECTGCSESLLR TVDP
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  YIDTLILDTLSLDYHETIMAAAGDAEEALAEAVNSPH-GFIAVVEGGIP-TAANGIYGKVANHTMLDICSRLPKAQAV
D. f.      YIDALILDTISLDYQETIMAAAGEAAEAALHQALEGKD-GYYLVVEGGLP-TIDGGQWGMVAGHPMIETT KKA AKAKGI

A. a. MBH  IAWGSCASWGC VQAAPNPTTAVPIDKVIKD--KPIIKVPGCPPIAEVM TGVIMYMLVDFRIPPLDSQGRPKMFYGNRIH
E. c. (Hyd-1) IAWGTCASWGC VQAARNPQTQATPIDKVIDT--KPIIKVPGCPPIPDVMSAITYMVTFDRIPDVRMGRPLMFYGRIRIH
R. e. MBH  ISWGSCASWGC VQAAPNPTQATPVHKVIDT--KPIIKVPGCPPIAEVM TGVITYMLTFDRIPELDRQGRPKMFYSQRIH
A. v. MBH  IAVGTCAAFGGLPQARPNTGAMSVMDLVRD--KPVINVPGCCPIPMVITGVI AHYLVFGRLPELDGYGRPLAFYQGSIVH
D. g.      IAI GTCATYGGVQAAPNPTGTGVVNEALGKLGKVAINIAGCPPNPMNFVGTVVHLLT-KGMPELDKQGRPV MFFGETVH
D. v. M.F  IAYGTCATFGGVQAAPNPTGAKGVNDALKHLGVKAINIAGCPPNPNLVGTIVYYLKNKAAPELDSLNRPTMFFGQTVH
D. f.      ICIGTCSAYGGVQAAPNPSQAKGVSEALG--VKTINIPGCCPPNIN FVGAVVHVLT-KGIPDLDSNGRPKLFYGLVH

A. a. MBH  DTCYRRSFFNAGQFVEQFDDEGAKKGWCLYKVGCRGPTTYNSCGNMRWYNGLSYPIQSGHGCI GCAENNFWDNGPFYER I
E. c. (Hyd-1) DKCYRRAHFADAGEFVQSWDDDAARKGYCLYKMGCKGPTTYNACSTRWN DGVSFPIQSGHGCLGCAENGFWRGFSFYSRV
R. e. MBH  DKCYRRPHFDAGQFVEEWDDESARKGFCLYKMGCKGPTTYNACSTRWN EGT SFP IQSGHGCI GCSEDFWWDKGSFYDRL
A. v. MBH  DRCYRRPFYDKGLFAESFDDEGAKQGWCLYRLGCKGPTTYNACATMKWNDGTSWPVEAGHPCLGCSEPFWDAGGFYEPY
D. g.      DNC PRLKHFEAGEFATSFGSPEAKKGYCLYELGCKGPD TYNCPKQLFNQ-VNWPVQAGHPICACSEPNFWDLYSPFYS
D. v. M.F  EQC PRLPHFDAGEFAPSFSESEARKGWCLYELGCKGPTVMNCPKIKFNQ-TNWPVDAGHPICGCSEPDFWDAMTFFYQN
D. f.      DNC PRLPHFEASEFAPSF DSEAKKGFCLYELGCKGPTVYNNCPKVLFNQ-VNWPVQAGHPICGCSEPDFWD TMTFFYEQ
    
```

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

