

PR08-2.5-2: REPROGRAMHYDROGEN



Reprogrammation du métabolisme cyanobactérien pour une meilleure bio-production d'hydrogène à partir de l'énergie solaire

URA2096 (Saclay)

**Systèmes Membranaires,
Photobiologie,
Stress et Détoxication.**

Responsable scientifique partenaire 1:

Corinne CASSIER-CHAUVAT

UMR6191 (Cadarache)

**Biologie Végétale
et
Microbiologie Environnementale**

Responsable scientifique partenaire 2:

Laurent COURNAC



Objectifs du projet REPROGRAMHYDROGEN

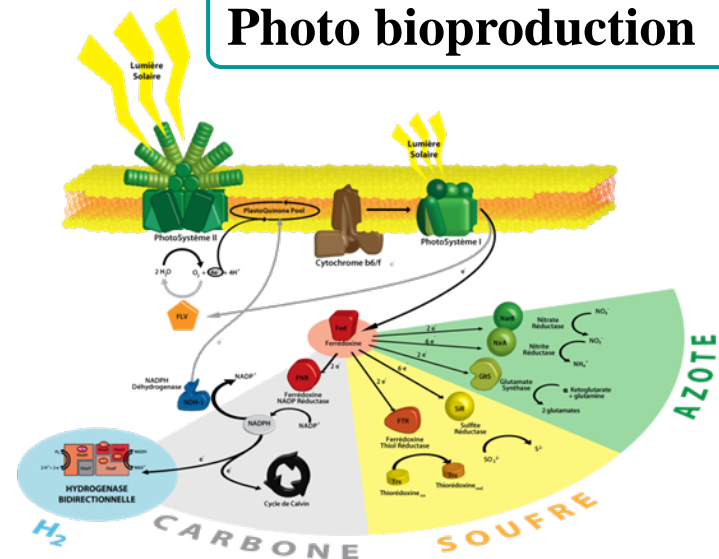
**Meilleure compréhension de la machinerie de photoproduction d' H_2
l'hydrogénase: "le moteur et son alimentation"**

- son fonctionnement
- son rôle dans le métabolisme global cyanobactérien
- influence des conditions environnementales sur la production d' H_2
- l'influence d'une production accrue d' H_2 sur diverses voies métaboliques qui peuvent limiter le niveau de sa production.



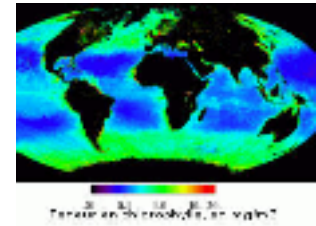
Elaboration de stratégies de reprogrammation métabolique nécessaires à une production d' H_2 forte et durable

Photo bioproduction d' H_2



Les cyanobactéries ou algues bleues vertes: des organismes à fort impact sur la biosphère

(Cassier-Chauvat and Chauvat 2002)



- Organismes photosynthétiques les plus abondants de la planète
Colonisent la plupart des écosystèmes aquatiques et terrestres
(mers, océans, rivières, lacs, eaux saumâtres, sols même désertiques...)



- A l'origine de l'atmosphère oxygénique de la planète qu'elles continuent à renouveler
30 à 40% de la production d'O₂ par les océans

Fixation de 25 giga tonnes de CO₂ par an



- Composante majeure du phytoplancton : **base de la chaîne alimentaire**

- **Organismes pionniers**





Potentiel biotechnologique des cyanobactéries

'Cyanobacteria : living fossils for biotechnology'

(Cassier-Chauvat and Chauvat 2002)



Fermes à cyanobactéries

Utilisation des cyanobactéries

✓ Alimentation animale & humaine

✓ Cosmetics

✓ Source de "médicaments"

- Anticancer, Antiviral (anti HIV)
- Vitamins & *antioxydant molecules**

✓ Bioremediation

✓ Biofuels (*our projects**)

H₂, Ethanol*, Ethylene*,
Butanol & bio-diesels*

✓ Bio-plastics (PHA, PHB)



Robustes & Compétitives (pH11)

Pas de surfaces cultivables utilisées

Pas nécessité d'eau douce

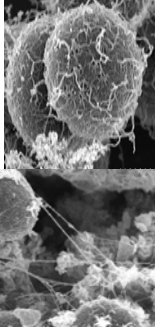
Pas d'ajouts:

- Engrais
- Pesticides, herbicides,



(Dismukes 2008; Kulshreshtha 2008; Angermayr 2009; Williams 2009 etc...)

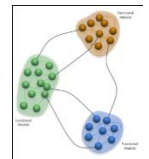
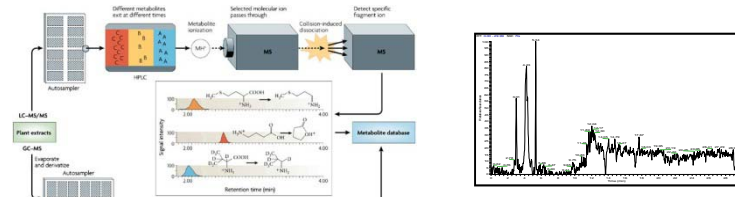
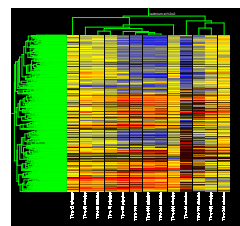
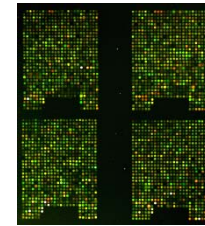
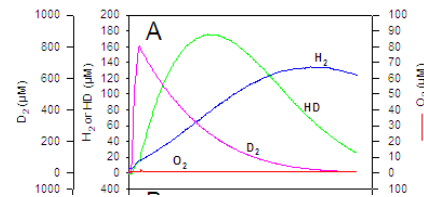
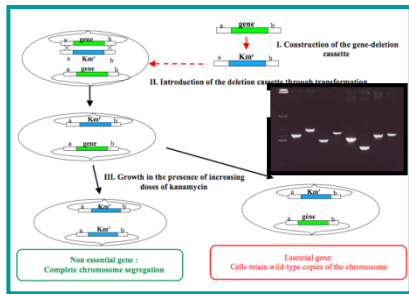
Synechocystis PCC6803 : Cyanobactérie utilisée dans ce projet



- ✓ Unicellulaire, euryhaline, capable de former des biofilms
- ✓ Photosynthèse oxygénique, capable de pousser en hétérotrophie, avec urée
- ✓ Production naturelle de molécules d'intérêt: molécules anti-oxydantes, PHB, EPS, etc...
- ✓ Propriétés électrogéniques dépendante de la lumière
- ✓ **Hydrogénase bidirectionnelle (réversiblement inactivée par O₂)**
- ✓ Petit génome séquencé facilement manipulable grâce aux stratégies développées au LBI Saclay

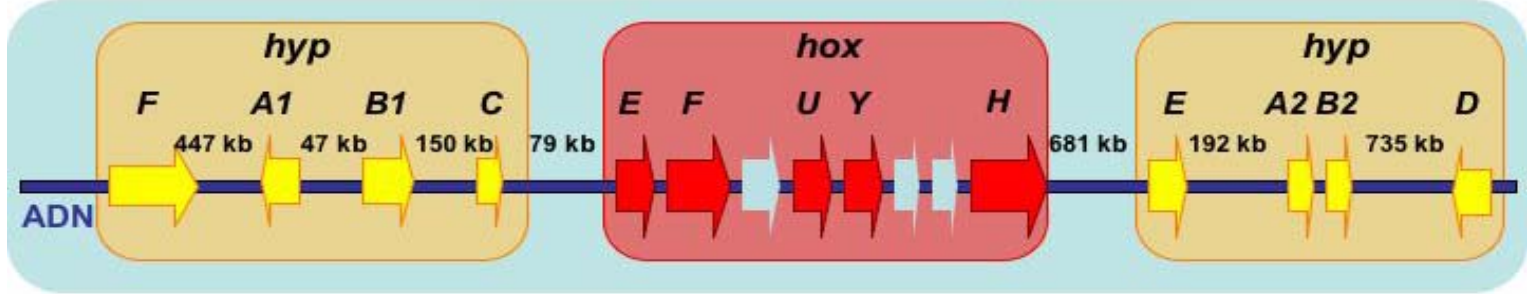
Approches utilisées: Biologie intégrative (CNRS-CEA Saclay et Cadarache)

Génomique fonctionnelle, Mesures dégagement H₂, Dosage enzymatiques, Transcriptome, Métabolome, Bioinformatique, etc..

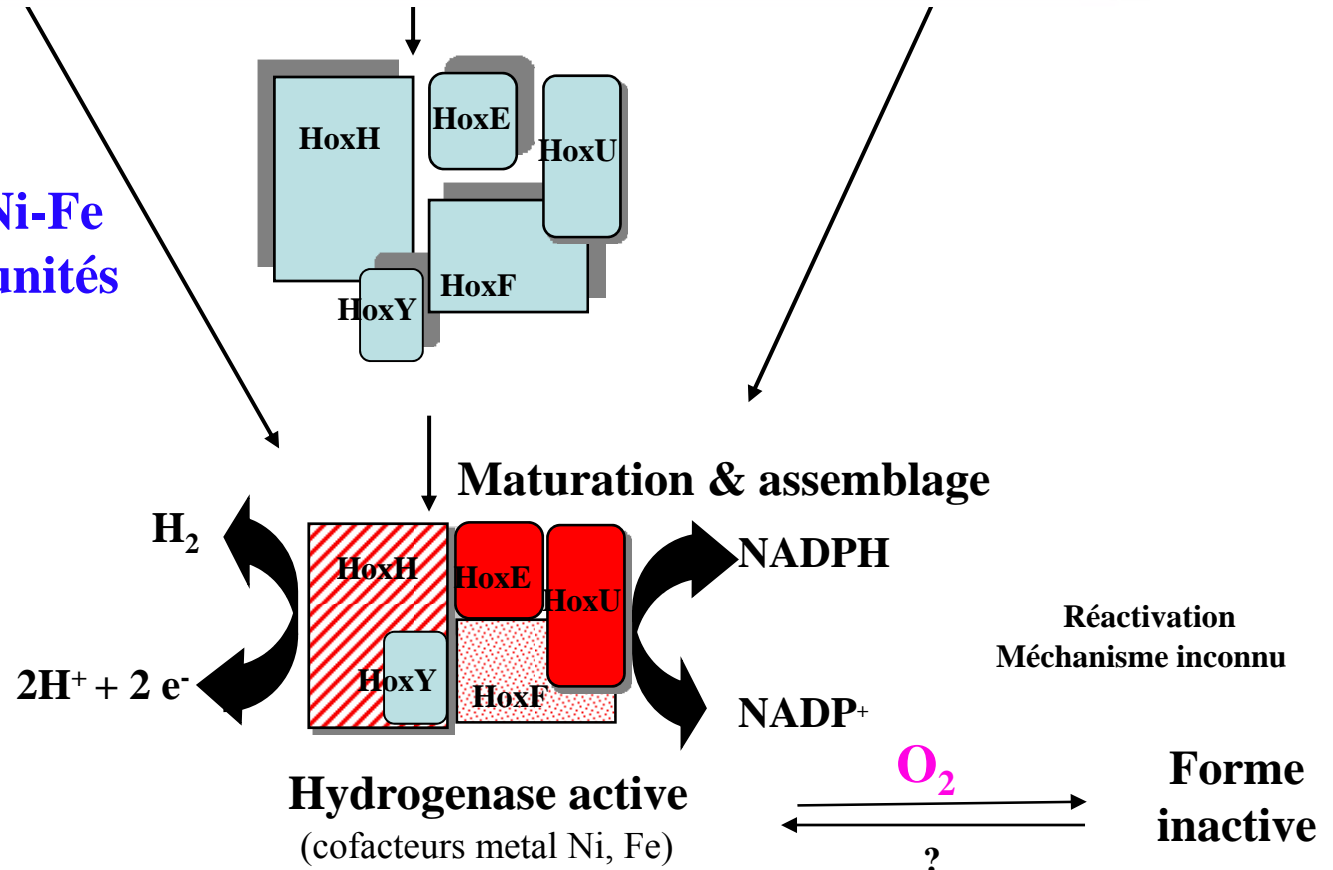


La machine de production d'H₂ est complexe, peu abondante, fragile

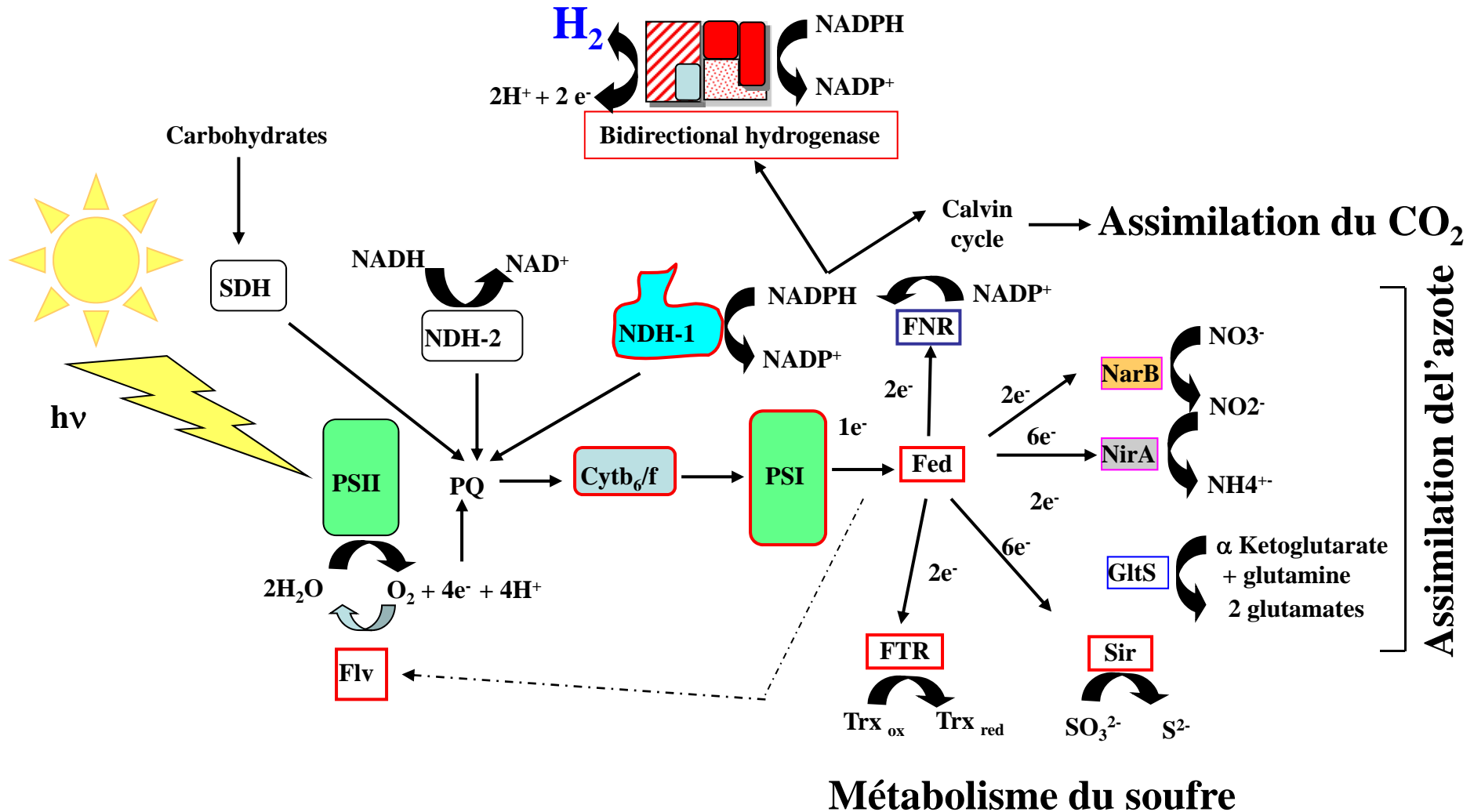
Les genes *hyp* impliqués dans la biosynthèse/maturation de l'hydrogénase NiFe ne sont pas "clusteriser" avec *hox*



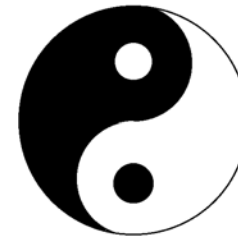
L'hydrogénase à Ni-Fe comprend 5 sous-unités



La machine de production d'H₂ est complexe et mal alimentée: circuit branché, peu d'électrons disponibles pour production d'H₂



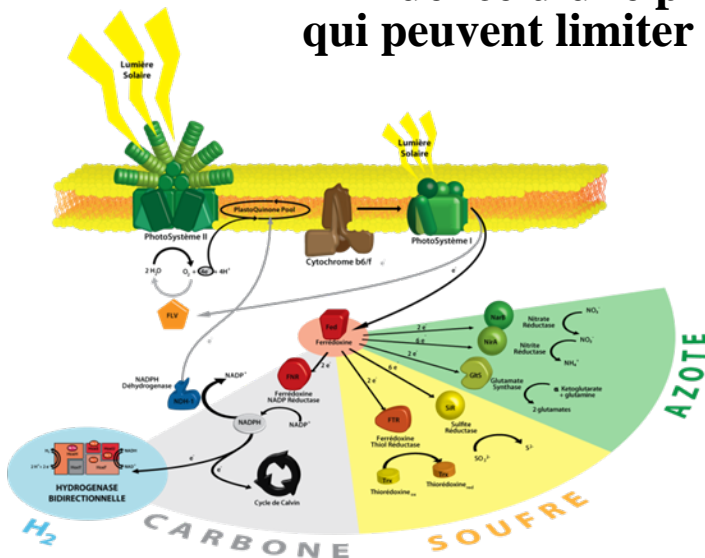
Comprendre



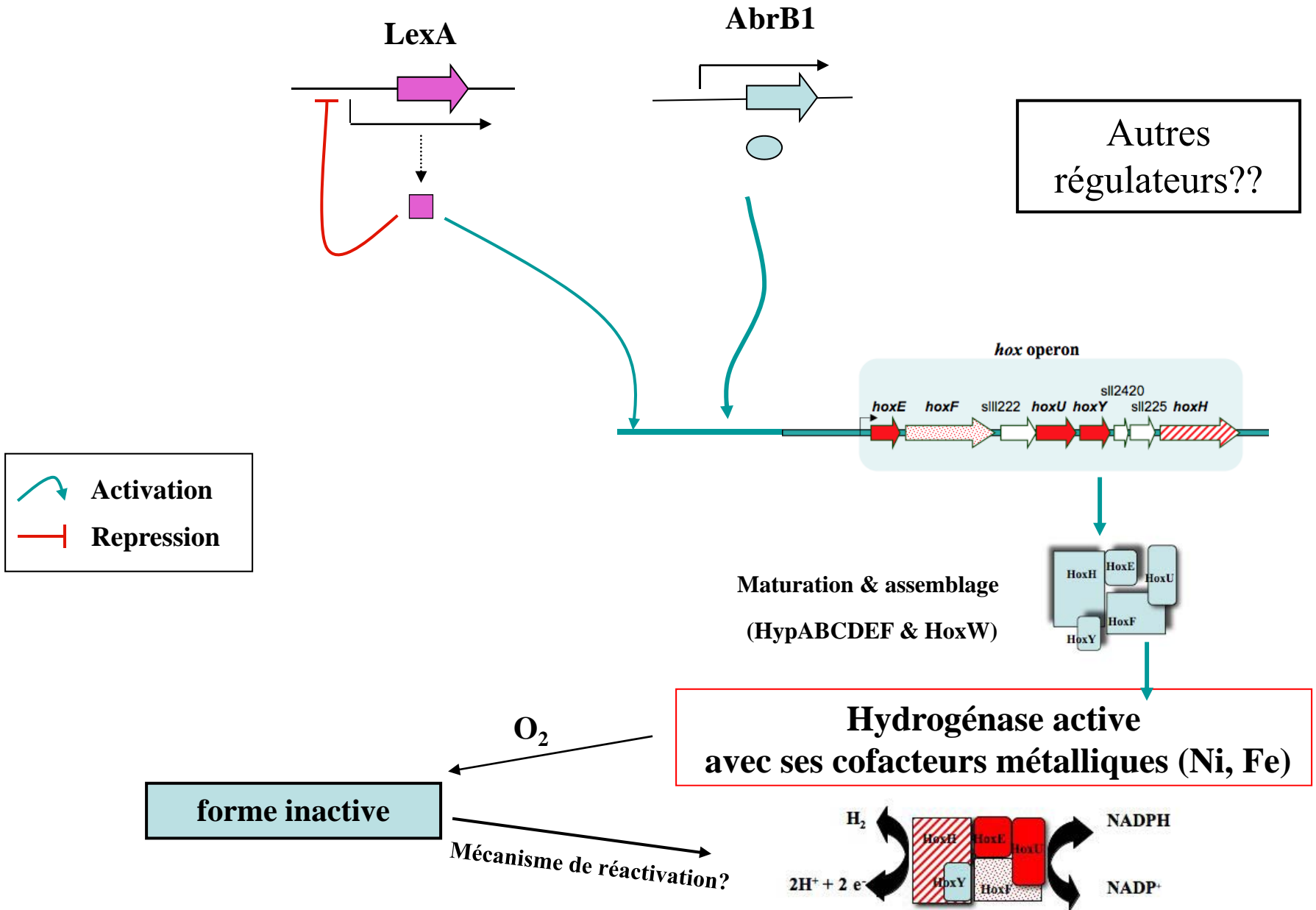
Améliorer

Meilleure compréhension de la machinerie de photoproduction d' H_2 l'hydrogénase: “le moteur et son alimentation”

- son fonctionnement
- son rôle dans le métabolisme global cyanobactérien
- influence des conditions environnementales sur la production d' H_2
- l'influence d'une production accrue d' H_2 sur diverses voies métaboliques qui peuvent limiter le niveau de sa production.



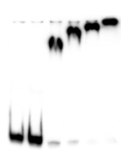
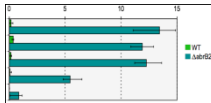
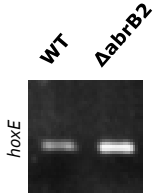
Activateurs transcriptionnels de l'opéron *hox* connus au début du projet



Caractérisation d'un nouveau régulateur de la production H₂

(manuscrit en préparation)

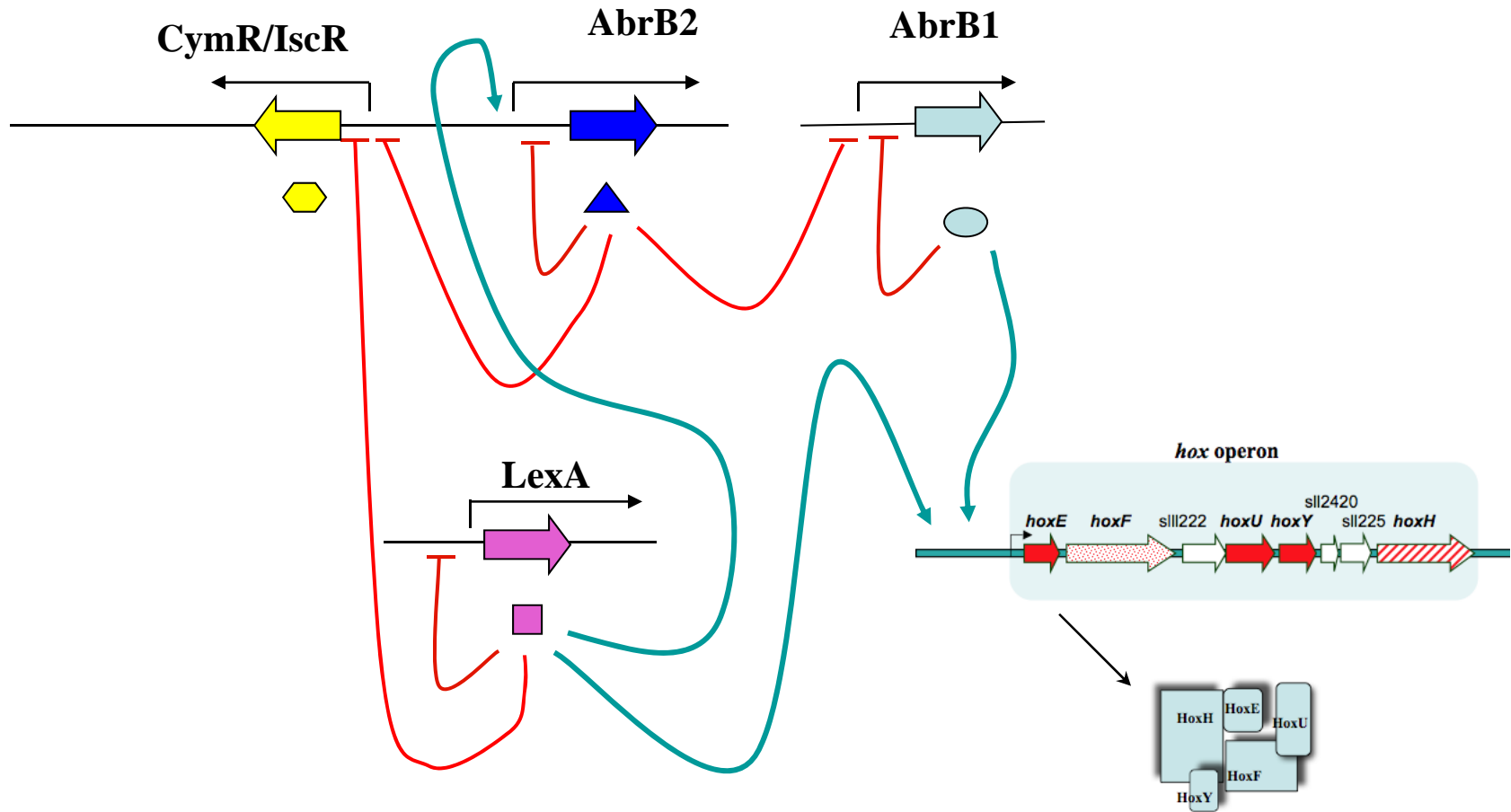
- AbrB2 influence **négativement** la quantité de l'ARNm *hox* mRNA level (semi-quantitative RT-PCR)
- AbrB2 **régule négativement** le promoteur de l'operon *hox* (Hydrogenase) (CAT Assays)
- AbrB2 se lie **directement** sur le promoteur *hox* (Gel-Shift)
- L'activité hydrogénase est **augmentée** dans le mutant Δ *abrB2* (H₂ measurements)



Mise en évidence d'un réseau complexe de régulation

- LexA **active** l'expression d'*abrB2* et de *hox* (CAT Assay)
-
- AbrB2 **régule négativement** le promoteur d'*abrB1* (CAT Assay, RT PCR, Puces ADN)
- AbrB2 **régule négativement** le promoteur de *cym^R* (CAT Assay) régulateur du métabolisme du S

Mise en évidence d'un réseau complexe de régulation qui contrôle l'expression de l'opéron *hox*

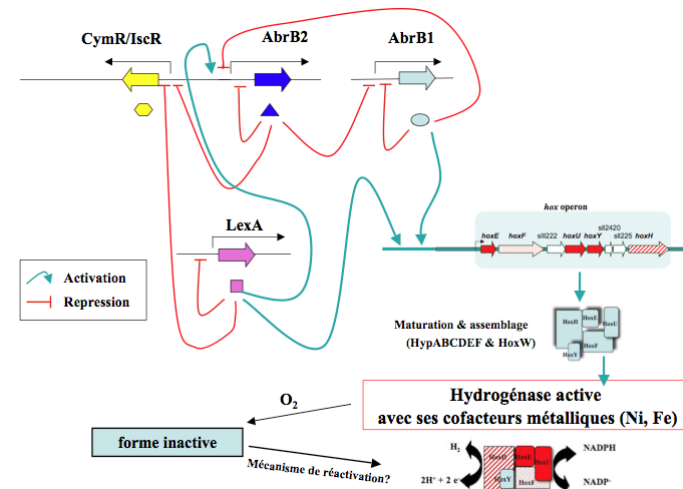


Hydrogenase active avec ces cofacteurs métalliques



Proposition :

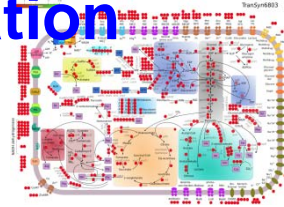
Surproduire les activateurs de *hox* (AbrB1 et LexA)
dans une souche qui ne possède pas AbrB2 (represseur)
pour produire plus de “machine”



Résultats

La surproduction d'AbrB1 dans une souche qui ne possède pas AbrB2
augmente la production d' H_2

Vers l'élaboration de stratégies de reprogrammation



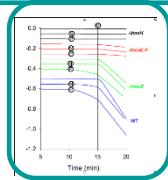
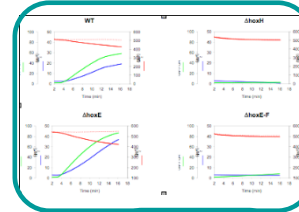
Meilleure compréhension du fonctionnement de l'hydrogénase et de production H₂:

Plusieurs voies métaboliques sont nécessaires au bon fonctionnement

Mise en évidence que:

Le NADPH joue un rôle d'activateur de l'enzyme,

Le NADH sert de pouvoir réducteur et transfère e⁻ vers la partie catalytique

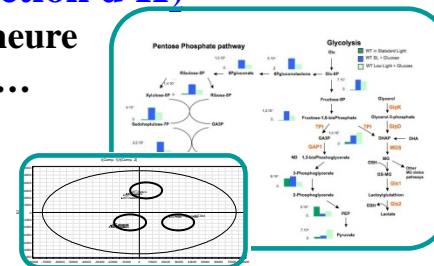


Développement d'une analyse des métabolites présents dans diverses conditions

(Narainsamy *et al.* à soumettre à Metabolomics)

Analyse des réponses cellulaires (transcriptome et métabolome): en cours dans des conditions (milieux de cultures et/ou mutants conduisant à une production d'H₂,

- Anaérobie en présence de glucose et à l'obscurité: dégagement d'H₂ continu sur plus 1/2 heure
- Augmentation des concentrations de Ni/Fe, lumière, source d'azote, carence en soufre etc...
- Mutants surproduisant hydrogénase (ΔAbrB2)



Connection entre production H₂ et le métabolisme central (C, N, S)

Les régulateurs de l'expression de l'hydrogénase (LexA, AbrB1, AbrB2etc..) régulent l'assimilation du C, N, S, Fe

Perspectives du projet

Elaboration de stratégies de reprogrammations métaboliques nécessaires à une production d'H₂ forte et durable

Surproduction de la machinerie dans contexte génétique et conditions de cultures qui permettent de mieux 'l'alimenter'

Poursuite de la collaboration entre les deux équipes du projet

Obtention Financement ANR Bioenergie 2009-2013

(IBiTEcS Saclay + BIP Marseille)

PR08-2.5-2: REPROGRAMHYDROGEN



**Reprogrammation du métabolisme cyanobactérien
pour une meilleure bioproduction d'hydrogène à partir d'énergie solaire**

URA2096 (Saclay)

**Systèmes Membranaires,
Photobiologie,
Stress & Détoxication.**

UMR6191 (Cadarache)

**Biologie Végétale et
Microbiologie Environnementales**

CASSIER-CHAUVAT Corinne

CHAUVAT Franck

AUDE Jean Christophe

FARCI Sandrine

NARAINSAMY Kinsley

SAENKHAM Panatda

DUTHEIL Jeremy

SAKR Samer

COURNAC Laurent

GUEDENEY Geneviève

RICHAUD Pierre

BILLON Emmanuelle

Carrier Patrick

AUROY Pascaline



dépasser les frontières

