



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

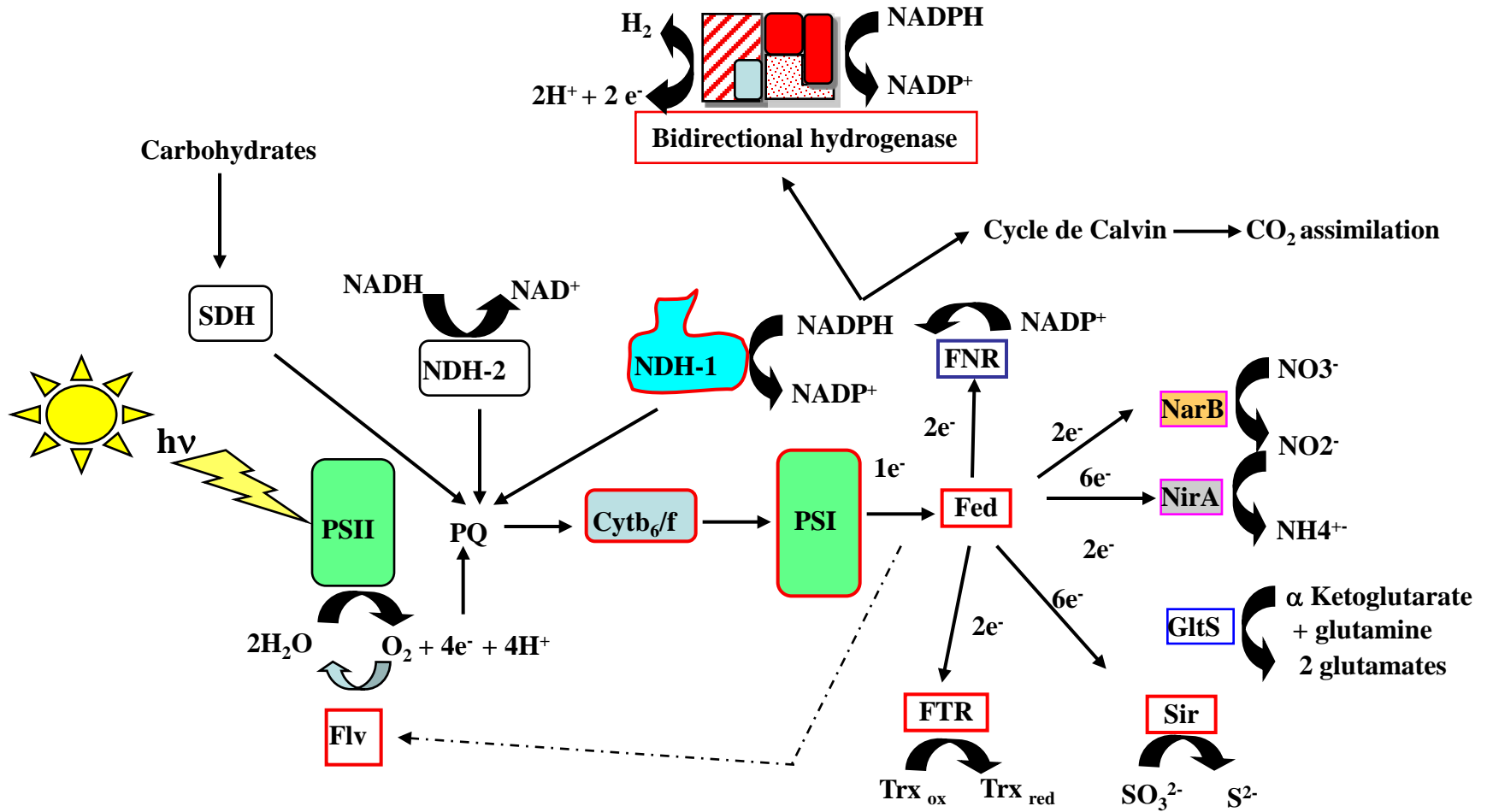
UMR6191 (Cadarache)

**Biologie Végétale
et
Microbiologie Environnementale**

Responsable scientifique partenaire 2:

Laurent COURNAC

Photo bioproduction d'H₂



Reprogrammation du métabolisme cyanobactérien

pour une meilleure bio-production d'hydrogène à partir d'énergie solaire



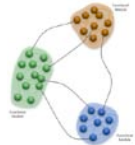
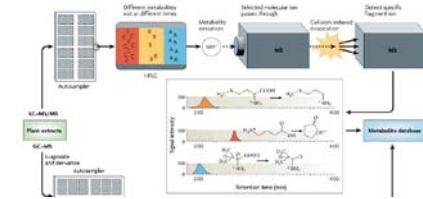
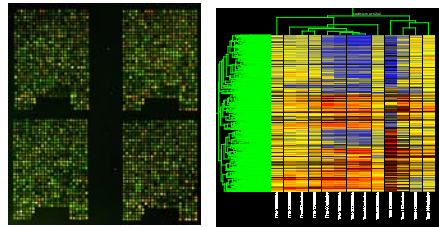
Objectifs: Compréhension

- du rôle de l'hydrogénase dans le métabolisme global cyanobactérien
- de l'influence des conditions environnementales sur la production d'hydrogène
- de l'influence d'une production accrue d'hydrogène sur diverses voies métaboliques qui peuvent limiter le niveau de cette production comme : la synthèse et l'assemblage de l'hydrogénase le métabolisme énergétique et carboné..

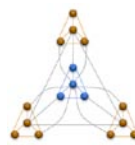


Approches utilisées: Biologie intégrative

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



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



Cyanobactéries: des organismes à fort impact sur la biosphère

(pour revue: Cassier-Chauvat, 2002)

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

A l'origine de l'atmosphère oxygénique de la planète et du chloroplaste des plantes

- **Organismes photosynthétiques les plus abondants** (colonisent la plupart des écosystèmes)
30 à 40% de la production d'O₂ et de la consommation du CO₂ par les océans
- Composante majeure du phytoplancton : **base de la chaîne alimentaire**
- **Production H₂, biofuels, plastiques**, nanoparticules, molécules anti-oxydantes, anti-cancéreuses, etc..
- **Ressource de biodiversité** : très grande diversité morphologique et physiologique



Cyanobacteria: biotechnological value

Cyanobacteria : living fossils for biotechnology (Cassier-Chauvat and Chauvat 2002)

Aerial view of cyanobacterial farms in Hawaiï & California



QuickTime™ et un décompresseur TIFF (non compressé) sont requis pour visionner cette image.

Fish food



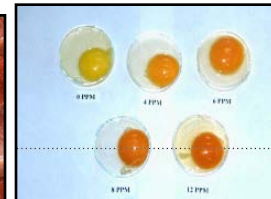
Human food and health

vitamins & antioxidants

Natural colorants



QuickTime™ et un décompresseur TIFF (non compressé) sont requis pour visionner cette image.



Additional use of cyanobacteria:

- Anticancer
- Biofuel, H₂
- Bio-plastics (PHA, PHB)
- Bioremediation



Prized chinese "fat choy" and "black moss"



QuickTime™ et un décompresseur TIFF (non compressé) sont requis pour visionner cette image.

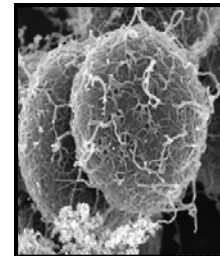
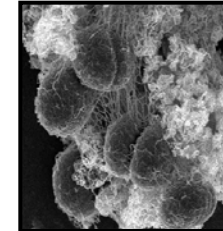
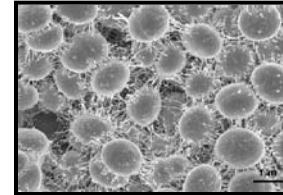
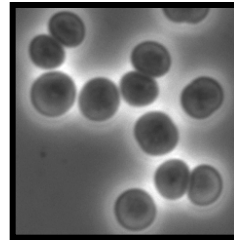


Synechocystis: un organisme modèle pour la Biologie Intégrative (I)

Physiologie

- **Unicellulaire**, sphérique

- **Biofilms**, Exopolysaccharides



(Zeyons *et al.* 2009)

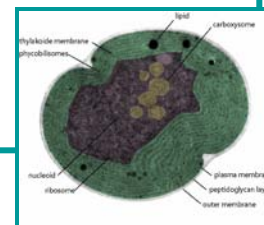
- **Photosynthèse oxygénique**: Appareil photosynthétique très semblable à celui des **plantes**

Hétérotrophe facultative: peut croître en absence d'activité photosynthétique

- **Production d' H_2** grâce à une **hydrogénase**

- **Production de PHB (bio-plastique)**

QuickTime™ et un décompresseur TIFF (non compressé) sont requis pour visionner cette image.



Synechocystis: un organisme modèle pour la Biologie Intégrative (II)

Génomique fonctionnelle

- **Petit génome**: (3,57 Mb; 3200 gènes) **entièrement séquencé**

(Kaneko *et al.* 1996 <http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>)



- **Facilement manipulable** avec les **vecteurs réplicatifs développés par partenaire I**

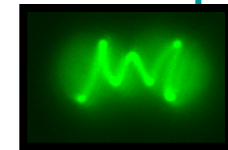
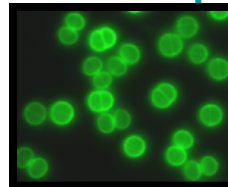
(Mermet -Bouvier *et al.* 1993, Marraccini *et al.* 1993)

Régulation transcriptionnelle: analyse fine des promoteurs

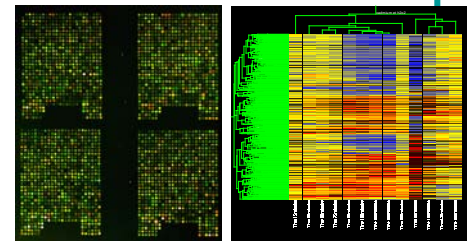
(Marraccini *et al.* 1994 Figge *et al.* 2000 & 2001; Mazouni *et al.* 1998 & 2003; Domain *et al.* 2004)

Analyse structure-fonction (Poncelet *et al.* 1998; Pieulle *et al.* 2000, Marteyn *et al.* 2009)

Localisation sub-cellulaire (Mazouni *et al.* 2004; Marbouty *et al.* 2009 a, b, c)

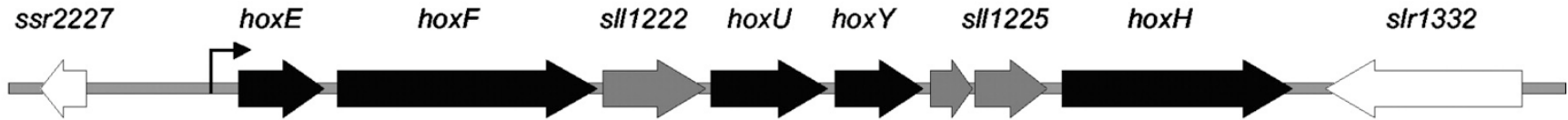


- **Puces à ADN : transcriptome**: (Domain *et al.* 2004; Houot *et al.* 2007)



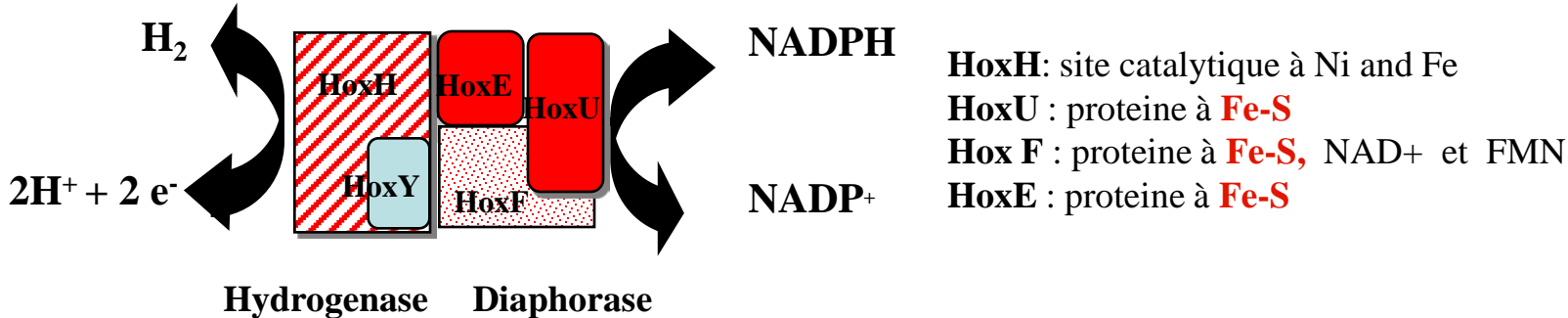
(Houot *et al.* 2007)

L'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* est composée de 5 sous-unités codées par l'opéron *hox*



(Appel and Schulz 1996 and Tamagnini et al 2007 for review)

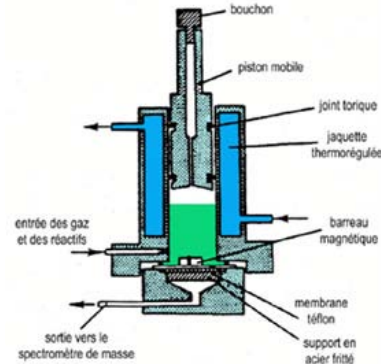
Bidirectional hydrogenase



Les gènes *hyp* (A,B,C,D,E,F) impliqués dans la biosynthèse/maturation du site Ni-Fe sont dispersés dans le génome

Les gènes impliqués dans l'assemblage des centres Fe-S dans l'hydrogenase sont encore inconnus

Analyse du fonctionnement de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* (Partenaire 2 UMR 6191)



**Phase liquide – Injection à travers une membrane – Détection par spectrométrie de masse
Enregistrement continu des concentrations gazeuses (MIMS) : mesures en temps réel**

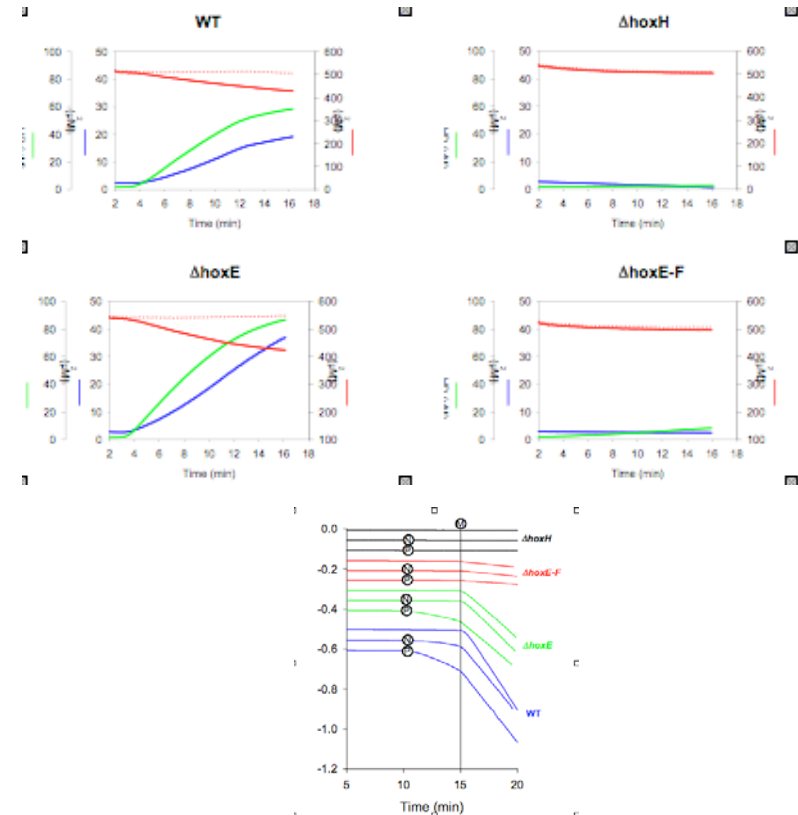
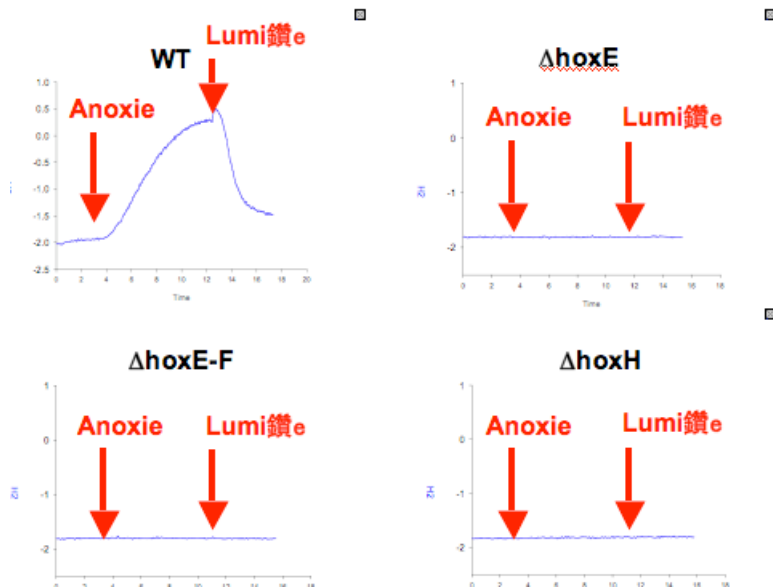
- Mesure d'une large gamme de gaz ayant une importance 'physiologique'**
- Traçage isotopique (échange D_2/H pour mesure activité de l'hydrogénase)**

Analyse du fonctionnement de l'hydrogenase et de la production d'H₂

Optimisation des conditions expérimentales pour production d'H₂ reproductible, continue et stable:
Anaérobie en présence de glucose et à l'obscurité: permet un dégagement d'H₂ continu sur plus 1/2 heure:

Analyse du fonctionnement de l'hydrogénase:

Le NADPH joue un rôle d'activateur de l'enzyme, tandis que le NADH sert de pouvoir réducteur et transfère les électrons vers la partie catalytique.



Analyse du métabolisme en conditions de production d'H₂

(partenaire 1 URA 2096)

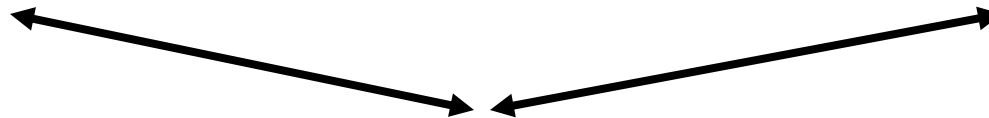
Approche ciblée

- Facteurs de transcriptions
- Assemblage de l'hydrogenase active
- anti-oxydantes

Approche aléatoire

(sans *a priori* de fonction)

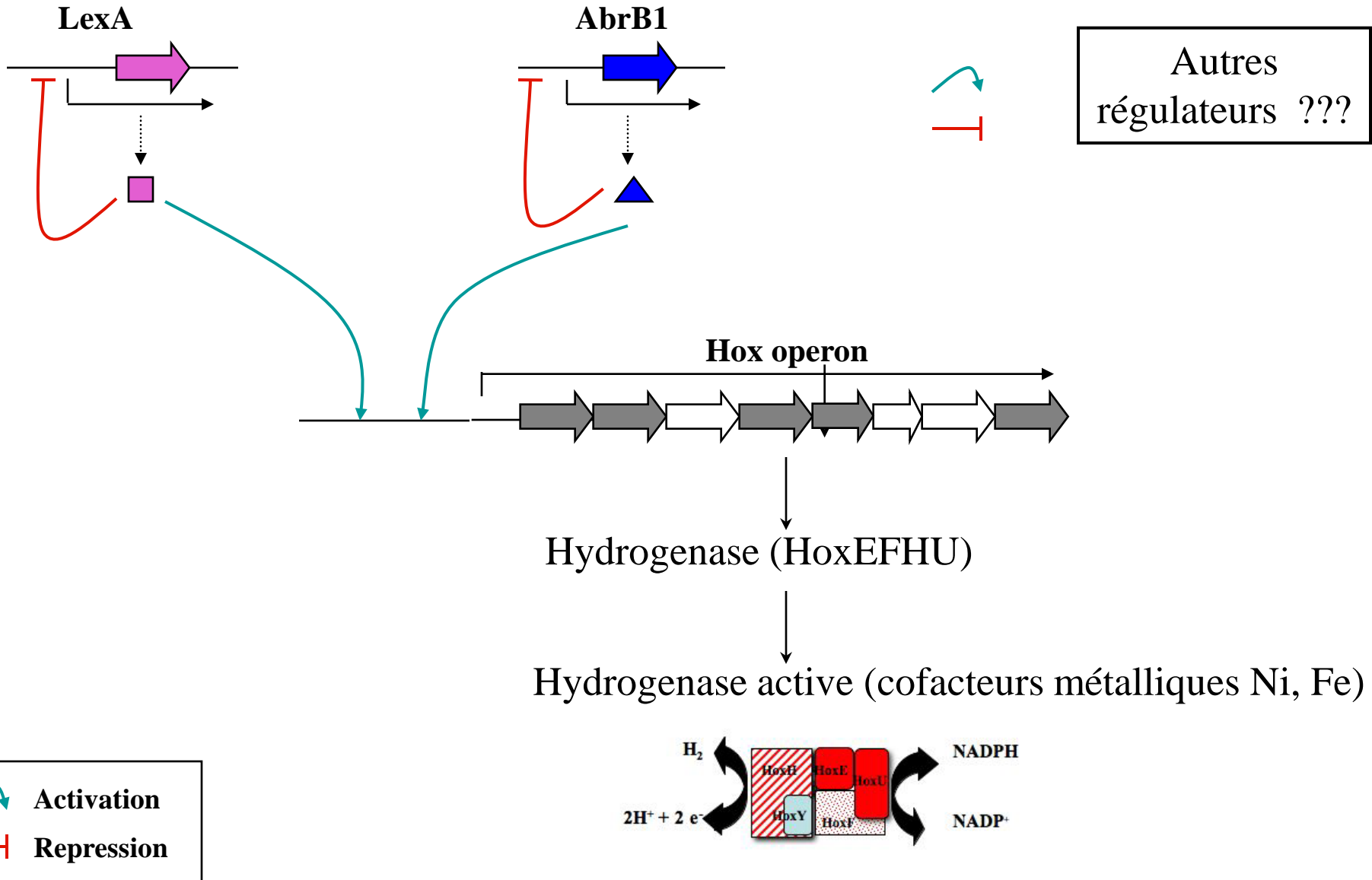
- Transcriptome (WT et mutants)
- Métabolome ((WT et mutants)



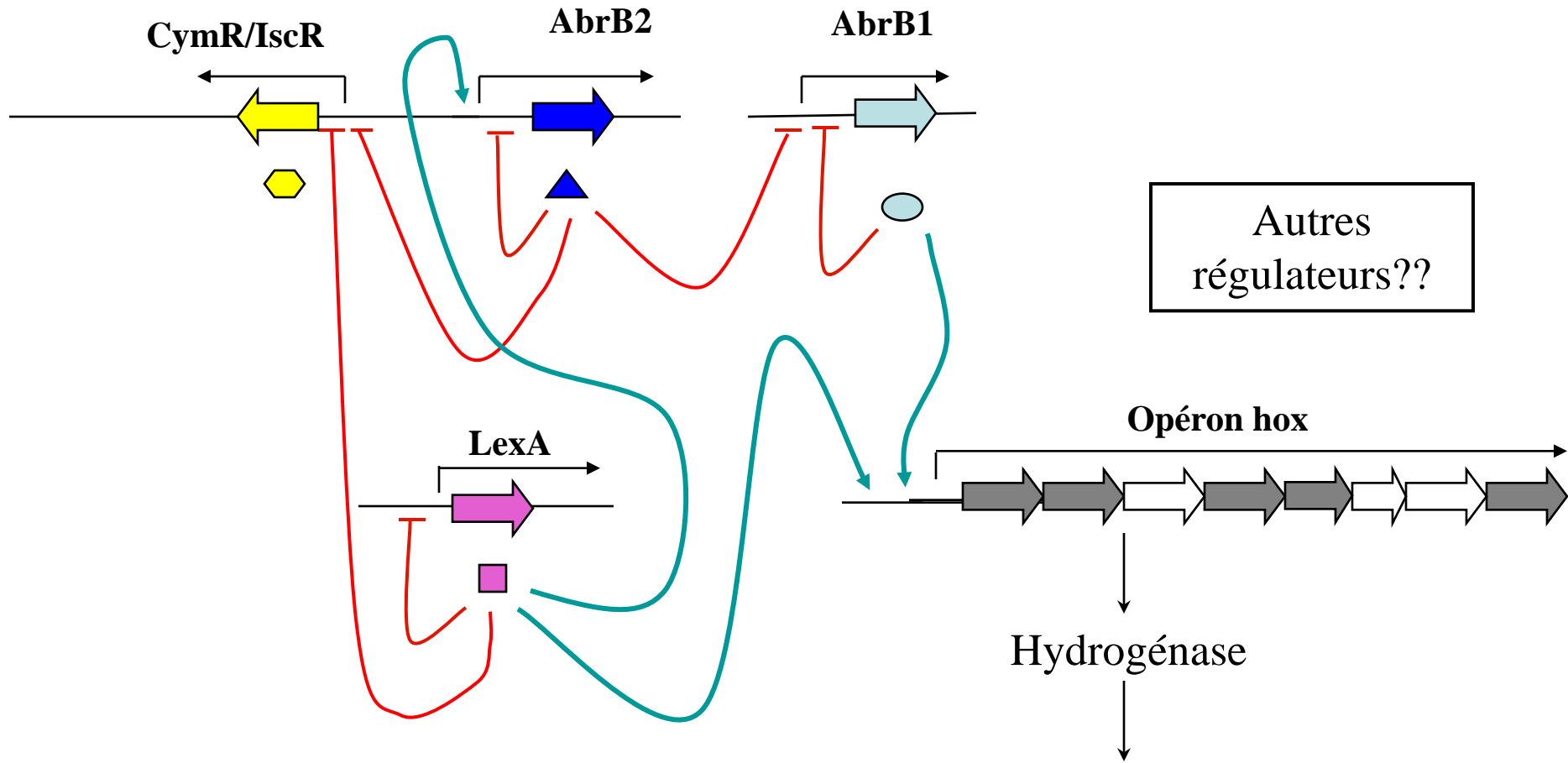
Analyse des circuits métabolique autour production H₂

Inactivation, mutagénèse et/ou sur-expression des gènes
Analyse phénotypique des souches mutantes par les techniques 'omics'
Dosage d'activité

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



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



Hydrogenase active avec ces cofacteurs métalliques



Mise en évidence d'une relation entre la production H_2 et l'assimilation du carbone et de l'azote

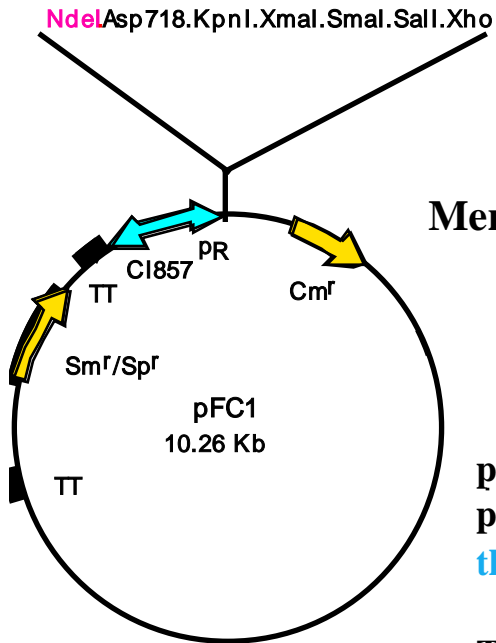
LexA régule l'assimilation du carbone

AbrB1 régule l'assimilation du carbone et de l'azote

AbrB2 régule l'assimilation du carbone et intervient dans la régulation de l'homéostasie du fer

Surproduction d'AbrB1 et LexA

Grâce à notre vecteur d'expression contrôlé par la température

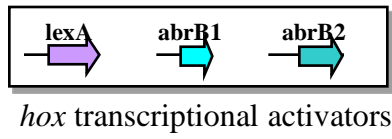


Mermet Bouvier and Chauvat 1994

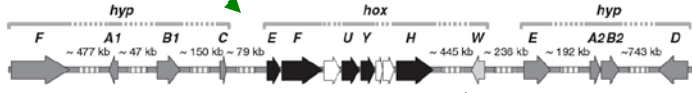
pFC1 possesses the broad host range replication machinery of the RSF1010 plasmid, and the **regulatory signals** of the bacteriophage lambda that comprises **the strong p_R promoter controlled by the temperature sensitive c_I857 repressor**

The studied gene (protein coding sequence) cloned in the pFC1 restriction site ***NdeI*** (CATATG) to reconstitute the ATG translation initiator codon is thereafter expressed proportionally to the growth temperature

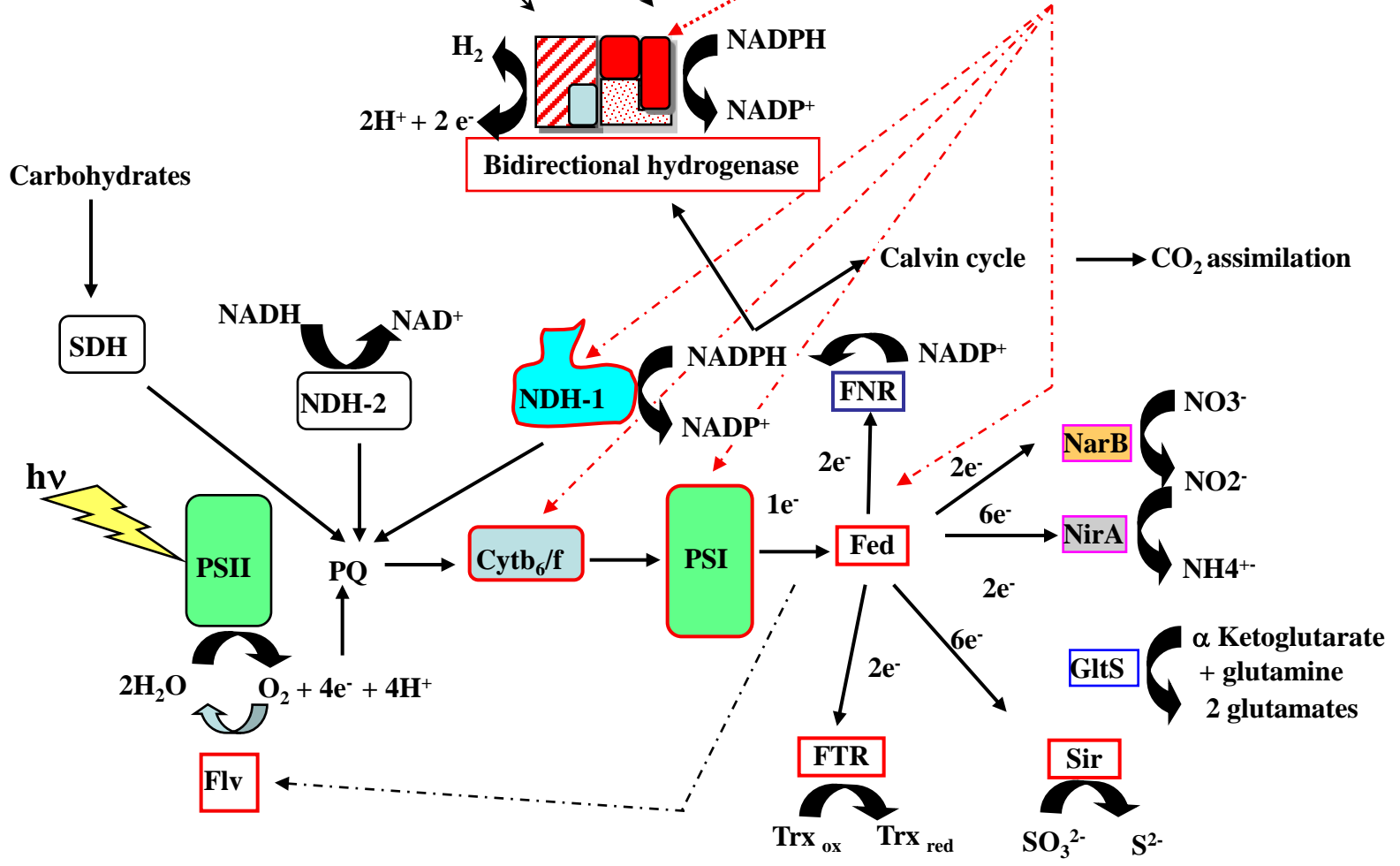
- **strongly at 39-40°C**
- **moderately at 33-34°C**
- **not at all below 30°C**



Regulation of *hox* genes expression and redox metabolic pathway
LexA, AbrB, etc..



Fe and S homeostasis, and Fe-S assembly





Analyse globale du métabolome *Synechocystis* avec LC-ESI/LTQ ORBITRAP (collaboration C.Junot & E.Ezan iBiTec-S)

Outil analytique:

Liquid Chromatographie - Mass Spectrometry (LC - MS)

- Analyse des molécules intactes: masse moléculaire
- Spectres de fragmentation: identifier les métabolites
- Analyse de composés non volatiles et/ou thermosensibles

Couplage HPLC:

Grande variété de colonnes chromatographiques en fonction des propriétés physico chimiques des métabolites à analyser

Source d'ionisation: Electrospray (ESI)

Analyseur à ultra haute résolution: LTQ ORBITRAP

- Détecte métabolite de faible masse avec une haute résolution
- Précision en masse ~ 1 ppm
- Approches globales, identification

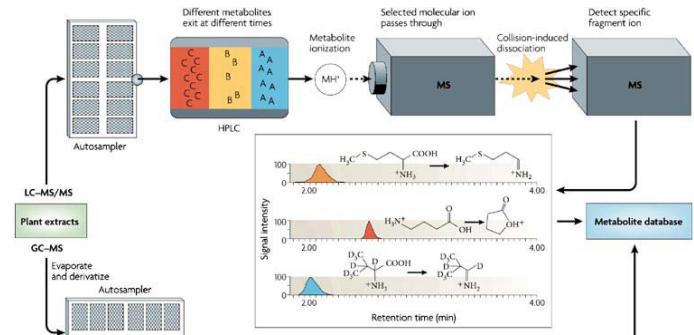
Orbitrap



Instrument hybride associant une trappe d'ions linéaire et un analyseur Orbitrap.

Il combine les avantages de l'Orbitrap - très hautes précision de mesure de masse et résolution - et d'une trappe linéaire - acquisition MSn et très grande sensibilité.

LC/MS ORBITRAP



QuickTime™ et un décompresseur TIFF (non compressé) sont requis pour visionner cette image.

Développement d'un protocole d'extraction et d'analyse des métabolites de *Synechocystis*

Cultures dans diverses conditions physiologiques

Extraction rapide des métabolites

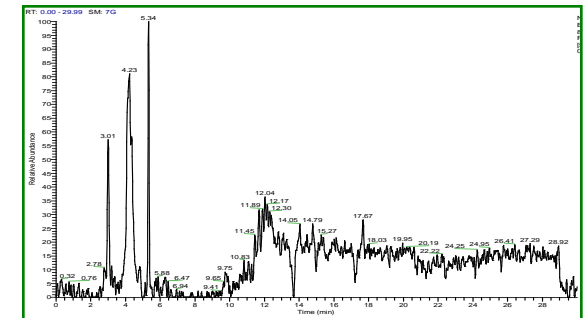
Colonne HPLC et analyse

LTQ ORBITRAP et analyse MS

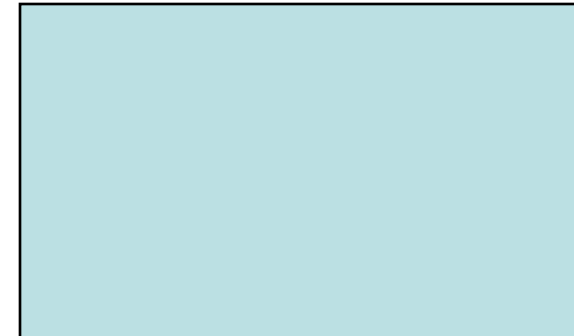
LTQ-ORBITRAP et analyse MS
Extraction des pics (logiciel XCMS)

Identifications des métabolites, (Aide à l'assignation grâce à l'interrogation bases de données KEGG, HMDB, etc)

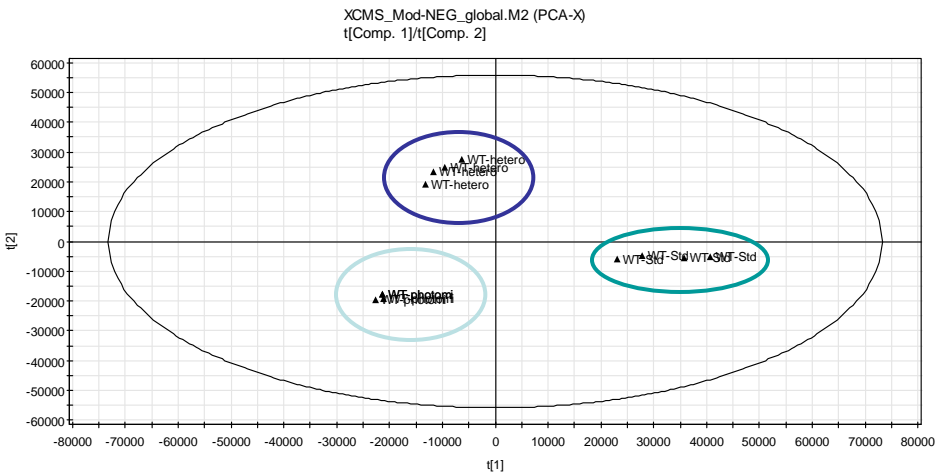
Analyse finale (élimination du bruit de fond, seuil de détection etc...).



Choix de la colonne HPLC:
rétention des métabolites

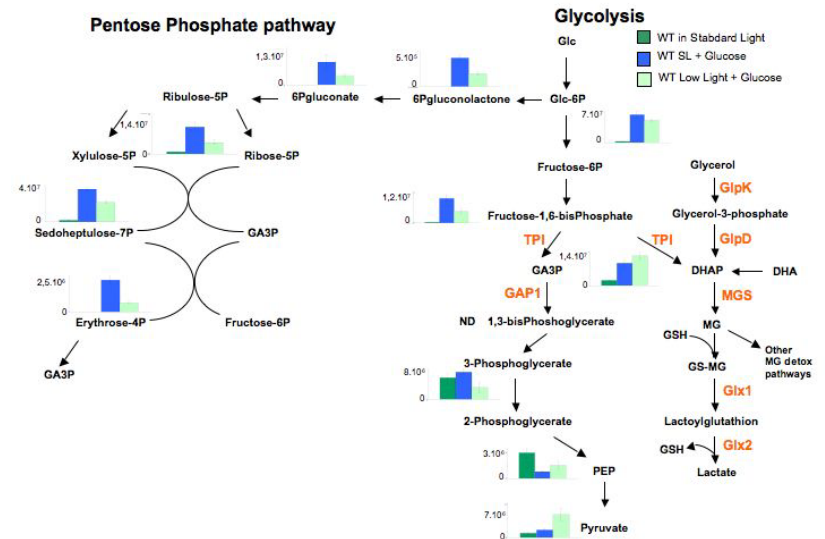


Exemple : influence du glucose sur le métabolome *Synechocystis*



- PS/Photo-autotrophie (lumière standard)
- Lumière standard + glucose
- Faible lumière + glucose

Analyse des métabolites du catabolisme du glucose dans 3 conditions de cultures



Comparaison des proportions des divers métabolites présents dans les différentes conditions de cultures



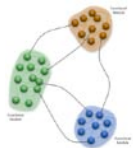
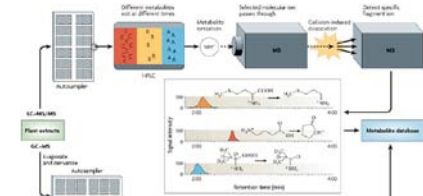
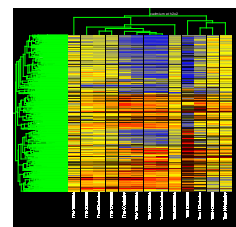
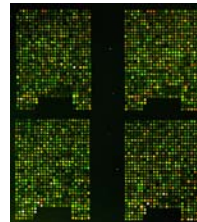
Objectifs: Compréhension

- du rôle de l'hydrogénase dans le métabolisme global cyanobactérien
- de l'influence des conditions environnementales sur la production d'hydrogène
- de l'influence d'une production accrue d'hydrogène sur diverses voies métaboliques qui peuvent limiter le niveau de cette production comme : la synthèse et l'assemblage de l'hydrogénase le métabolisme énergétique et carboné..



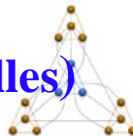
Approches utilisées: Biologie intégrative

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



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

Obtention Financement ANR Bioenergie 2009-2013 (IBiTEcS Saclay + BIP Marseilles).
Bourse de Thèse programme PhD irtelis CEA



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.**

CASSIER-CHAUVAT Corinne

CHAUVAT Franck

AUDE Jean Christophe

FARCI Sandrine

NARAINSAMY Kinsley

SAENKHAM Panatda

DUTHEIL Jeremy

UMR6191 (Cadarache)

**Biologie Végétale et
Microbiologie Environnementales**

COURNAC Laurent

GUEDENEY Geneviève

RICHAUD Pierre

BILLON Emmanuelle

Carrier Patrick

AUROY Pascaline

